

FACULTAT DE VETERINARIA
UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

**ESTUDI EN ANIMALS TRANSGÈNICS DEL PAPER DE LA
GK EN EL CONTROL DE L'HOMÈOSTASI DE LA
GLUCOSA. IMPLICACIONS EN LA TERÀPIA GÈNICA DE
LA DIABETIS MELLITUS.**

TURA FERRÉ MASFERRER

Memòria presentada per la llicenciada TURA FERRÉ
MASFERRER per a optar al grau de Doctor en
Bioquímica.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la
direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert, en el
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la
Facultat de Veterinària.

FÀTIMA BOSCH i TUBERT

TURA FERRÉ MASFERRER

Maig 1998

ABREVIATURES

ADP	adenosina-5'-difosfat
ATP	adenosina-5'-trifosfat
BETA	transactivador de la caixa E de la cèl·lula β
BSA	albúmina sèrica bovina
cAMP	adenosina-5'-monofosfat cíclica
cDNA	DNA còpia
Con	control
cpm	comptes per minut
CRE	element de resposta a l'AMP cíclic
dATP	desoxiadenosina-5'-trifosfat
dCTP	desoxicitidina-5'-trifosfat
dGTP	desoxiguanosina-5'-trifosfat
dTTP	desoxitimidina-5'-trifosfat
DNA	àcid desoxirribonucleic
dpm	desintegracions per minut
EDTA	etilendiaminotetraacètic
FSH	hormona estimulant del folicle
GIP	polipèptid inhibidor gàstric
GK	glucoquinasa
GLP	pèptid semblant al glucagó
Glut	transportador de glucosa
^3H	triti
HCG	gonadotropina coriònica humana
HCG	gonadotropina codi
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperacina etanosulfat
HK	hexoquinasa
HNF	factor nuclear de l'hepatòcit
^{125}I	iode 125
IDX	proteïna homeobox dels illots i el duodè
IgG	immunoglobulina G
INS-1	cèl·lules d'insulinoma
Ins-GK	gen quimèric promotor d'insulina -cDNA de glucoquinasa
IPF	factor del promotor de la insulina
Kb	Kilobases

KDa	Kilodaltons
K_m	constant de Michaelis-Menten
KRB	tampó Krebs-Ringer
LH	hormona luteinizant
MODY	diabetis de forma madura que afecta individus joves
NAD(P)/NAD(P)H	nicotinamida-adenina-dinucleòtid fosfat oxidat/reduit
NAD ⁺ /NADH	nicotinamida-adenina-dinucleòtid oxidat/reduit
NEFA	àcids grassos no esterificats
³² P	fósfor 32
Pax	proteïna homeobox de domini aparellat
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDX	proteïna homeobox del pàncreas i el duodè
PEPCK	fosfoenol piruvat carboxiquinasa
PGI	fosfoglucosa isomerasa
PMSG	gonadotropina sèrica d'euga gestant
PMSG	gonadotropina sèrica d'euga gestant
PP	polipèptid pancreàtic
RIA	radio immuno assaig
RNA	àcid ribonucleic
mRNA	RNA missatger
RNasa	ribonucleasa
SDS	dodecilsulfat sòdic
STF	factor de transcripció de la somatostatina
TAE	tampó Tris-acetat-EDTA
TE	tampó Tris-EDTA
Tg	transgènic
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
U	unitats internacionals d'activitat enzimàtica
UI	unitats internacionals
Vmax	velocitat màxima
vol	volum

I. INTRODUCCIÓ GENERAL

1. HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA
2. TRANSPORT DE LA GLUCOSA
3. FOSFORILACIÓ DE LA GLUCOSA
 - 3.1. L'ENZIM GLUCOQUINASA
 - 3.1.1. Regulació nutricional i hormonal a llarg termini
 - 3.1.2. Regulació a curt termini de l'activitat glucoquinasa
 - 3.2. PAPER DE LA FOSFORILACIÓ EN ANIMALS TRANSGÈNICS
4. EL SENYAL DE LA GLUCOSA
5. PAPER DEL MÚSCUL ESQUELETIC
 - 5.1. EL PROMOTOR MLC
6. LA DIABETIS MELLITUS
 - 6.1. LA DIABETIS MELLITUS DEPENDENT D'INSULINA
 - 6.2. LA DIABETIS MELLITUS NO DEPENDENT D'INSULINA
 - 6.2.1. Lipotoxicitat

PART I: SOBREEXPRESSIÓ DE LA GLUCOQUINASA EN FETGE DE RATOLI

INTRODUCCIÓ

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS QUE SOBREEXPRESSEN GLUCOQUINASA

1.1. CONSTRUCCIÓ DEL GEN QUIMÈRIC PEPCK/GK

1.2. GENERACIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS

2. ESTUDI DELS EFECTES PROVOCATS PER LA SOBREEXPRESSIÓ DE LA GK EN ELS ANIMALS TRANSGÈNICS

2.1 ANALISI DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN QUIMERIC PEPCK/GK

2.2 ANALISI DE L'ACTIVITAT GLUCOQUINASA

2.3 ESTUDI DEL METABOLISME HEPÀTIC

2.4 EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE LA GK EN
HEPATÒCITS EN CULTIU PRIMARI

2.5 ANÀLISI DE LA GLUCÈMIA I INSULINÈMIA

2.6 TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

3. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ CRÒNICA DE LA GK EN FETGE

3.1 ESTUDI DE LA TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA A LLARG TERMINI

3.2 ESTUDI DELS PARAMETRES SERICS EN ANIMALS VELLS

3.3. DETERMINACIÓ DE GLUCOSA-6-P I I GLUCOGEN EN FETGE DE ANIMALS VELLS

3.4 ESTUDI HISTOPATOLÒGIC DEL FETGE

PART II: CONTRARESTACIÓ DEL PROCÉS DIABÈTIC PER LA SOBREEXPRESSIÓ DE GLUCOQUINASA EN FETGE D'ANIMALS TRACTATS AMB ESTREPTOZOTOCINA. IMPLICACIONS EN LA TERÀPIA DE LA DIABETIS TIPUS 1

INTRODUCCIÓ

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN EL FETGE D'ANIMALS DIABÈTICS

2. ESTUDI DEL METABOLISME GLUCÍDIC EN EL FETGE D'ANIMALS DIABÈTICS

2.1 ESTUDI DEL CONTINGUT DE GLUCOSA-6-FOSFAT I GLUCOGEN

2.2 DETERMINACIÓ DE PIRUVAT I CONTINGUT DE LACTAT

2.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PEPCK

3. ESTUDI DEL METABOLISME LIPÍDIC I CETOGÈNIC EN EL FETGE DE RATOLINS TRANSGÈNICS

4. ESTUDI DELS PARÀMETRES SÈRICS EN RATOLINS DIABÈTICS

PART III: SOBREEXPRESSIÓ DE GLUCOQUINASA EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

INTRODUCCIÓ

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN GLUCOQUINASA EN MÚSCUL

1.1. CONSTRUCCIÓ DEL GEN QUIMÈRIC MLC/GK

1.2. GENERACIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS

1.3 ANALISI DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN QUIMERIC MLC/GK

1.4 ANALISI DE L'ACTIVITAT GLUCOQUINASA

2. ESTUDI DEL METABOLISME GLUCIDIC EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC

2.1. ACTIVITAT GLUCOQUINASA, CONTINGUT DE GLUCOSA-6-

FOSFAT I GLUCOGEN

3.. ESTUDI DELS EFECTES SISTEMICS PROVOCATS PER L'EXPRESSIÓ DE LA GK EN ELS ANIMALS TRANSGÈNICS

3.1 ANÀLISI DE LA GLUCÈMIA

3.2 TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

CONCLUSIONS GENERALS

II. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS UTILITZATS

1.1 ANIMALS

1.2 SOQUES BACTERIANES Y VECTORS PLASMÍDICS

1.3 REACTIUS Y MEDIS DE CULTIU

1.4 SONDES

1.5 ANTICOSSOS

2. MÈTODES UTILITZATS

2.1 OBTENCIÓ Y ANÀLISI DE DNA

2.1.1 Preparació de DNA plasmídic

2.1.2. Manipulació enzimàtica del DNA

2.1.3. Aïllament i purificació de fragments de DNA

2.1.3.1. Gels d'agarosa

2.1.3.2. Purificació de fragments de DNA per GeneClean^{MR}

2.1.3.3. Purificació de fragments de DNA per electroelució

2.1.4. Construcció de molècules híbrides de DNA

2.1.4.1. Subclonatge de fragments de DNA

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

2.1.5. Marcatge radioactiu del DNA

2.2. TÈCNICA D'OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS

2.2.1. Preparació del DNA

2.2.2. Recol.lecció dels oòcits fecundats

2.2.3. Preparació per a la microinjecció

2.2.4. Microinjecció del oòcits fecundats

2.2.5. Transferència a la femella receptora

2.3. DETECCIÓ DELS ANIMALS TRANSGÈNICS

2.3.1. Obtenció de DNA genòmic

2.3.2. Anàlisi de DNA per Southern Blot

2.3.3. Establiment de línies de transgènics

2.4. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE RNA

2.4.1. Extracció de RNA total

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

2.4.3. Anàlisi de RNA per Northern Blot

2.5. ANÀLISI DELS ANIMALS

2.6. OBTENCIÓ D'HEPATÒCITS EN CULTIU PRIMARI

2.7. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SERICS

2.7.1. Determinació de metabolits en el sèrum

2.7.1.1. Glucosa

2.7.1.2. Triglicèrids

2.7.1.3. Àcids grassos no esterificats (NEFAs)

2.7.1.4. β -Hidroxibutirat

2.7.2. Determinació d'hormones

2.7.2.1. Insulina

2.8. ESTUDI DEL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN EL FETGE.

2.8.1. Determinació d'activitats enzimàtiques hepàtiques

2.8.1.2. Activitat glucoquinasa

2.8.1.3. Activitat piruvat quinasa

2.8.2. Determinació de metabòlits

2.8.2.2. Determinació de glucogen

2.8.2.3. Determinació de lactat

2.9. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES TOTALS

2.10. CORBA DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

2.13. PREPARACIÓ I ANALISI DE PROTEÏNES

2.13.1. Preparació d'extractes protèics

2.13.2. BCA Protein Assay Reagent

2.13.3. Separació electroforètica

2.13.4. Electrotransferència i immunodetecció de proteïnes

2.14. ANÀLISI HISTOLÒGICA DEL FETGE

2.15. CÀLCUL ESTADÍSTIC

III. BIBLIOGRAFIA

IV. APENDIX

I. INTRODUCCIÓ GENERAL

1. HOMEÒSTASI DE LA GLUCOSA

La glucosa és la principal font d'energia per a totes les cèl·lules de mamífer. La concentració extracel·lular de glucosa es manté dins d'un rang normal, tot i les grans variacions en la taxa d'utilització de la glucosa i la seva disponibilitat exògena. Aquest control es realitza mitjançant un equilibri entre el flux de glucosa dintre i fora de l'espai extracel·lular a través de la secreció coordinada d'insulina i glucagó.

En estat de dejuni, la captació de la glucosa es dona principalment en teixits independents d'insulina, especialment en cervell. La captació basal de la glucosa es manté en equilibri amb la producció de glucosa per part del fetge a través de la gluconeogènesi i de la glucogenolisi. Durant la ingesta, aquest delicat balanç és pertorbat, i el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa depèn de tres processos que poden ocórrer simultàniament d'una manera coordinada. 1) En resposta a l'augment de la concentració plasmàtica de glucosa, s'estimula la secreció d'insulina per part de les cèl·lules β del pàncreas. 2) La combinació de l'increment en la glucèmia i en la insulinèmia promou la captació de glucosa pels teixits esplàcnics (fetge) i perifèrics (múscul, teixit adipós). 3) La inhibició de la secreció de glucagó induïda per insulina suprimeix l'alliberació hepàtica de glucosa. Així, alteracions funcionals a nivell de les cèl·lules β , fetge, múscul i teixit adipós podrien conduir a un trastorn en l'homeòstasi de la glucosa i al desenvolupament d'intolerància a la glucosa o, bé a diabetis mellitus no dependent d'insulina (o diabetis tipus 2).

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

2. TRANSPORT DE LA GLUCOSA

La glucosa és utilitzada per a dues funcions bàsiques a tots els tipus cel·lulars: per a la producció d'ATP (de forma oxidativa i no oxidativa) i per a la formació de macromolècules en les reaccions anabòliques.

La capacitat de transportar glucosa a través de la membrana plasmàtica és una característica comú de gairebé totes les cèl·lules, des d'un simple bacteri fins a cèl·lules altament especialitzades com ara les neurones. Aquest transport el realitzen membres de dues famílies de proteïnes de membrana. La primera família està representada pel cotransportador intestinal de Na⁺/glucosa, SGLT1, que utilitza el gradient electroquímic de sodi per a transportar glucosa en contra del seu gradient de concentració. SGLT1 és responsable de la captació de glucosa i galactosa tant de la llum del intestí prim com de la seva reabsorció en la nefrona.

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

En l'actualitat han estat descrits sis transportadors d'aquesta família. Els gens que els codifiquen s'han anomenat GLUT1-5 i GLUT7. Per contra, GLUT6 és un pseudogen que no s'expressa a nivell de proteïna (Kayano et al 1990).

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

Taula I. TRANSPORTADORS DE GLUCOSA EN MAMIFERS

Nom	Localització principal	Funció
SLGT1	Intestí prim Ronyó	Transport actiu de glucosa dependent de Na ⁺ en l'intestí prim Reabsorció de glucosa filtrada en el tub proximal del ronyó
GLUT1	Placenta, cervell, ronyó i còlon	Captació basal de glucosa i transport a través de les barreres entre els teixits i la sang
GLUT2	Fetge, cèl.β pàncreas Intestí prim, ronyó	Entrada i sortida de glucosa dels hepatocits i transport de les cèl.β pàncreas Alliberació de glucosa absorbida a través de la superfície basolateral de les cèl.lules epitelials.
GLUT3	Diversos teixits en humans. Restringit a cervell en altres espècies	Captació basal de glucosa Captació de glucosa en cèl.lules de cervell
GLUT4	Múscul esquelètic, Cor i Adipòcits	Captació de glucosa estimulada per insulina
GLUT5	Intestí prim (jejú)	Captació de fructosa

La característica estructural principal d'aquestes proteïnes és la presència de 12 segments α -hèlix transmembrana connectats per segments hidrofílics, tal i com es pot predir segons l'anàlisi hidropàtica (Mueckler et al., 1985). Els extrems amino i carboxiterminal es localitzen a nivell intracel·lular. D'altra banda, sembla ésser que l'extrem carboxiterminal determina la localització cel·lular del transportador després de la seva síntesi. Cada una de les isoformes presenta funcions específiques en els teixits on s'expressen degut a les diferents propietats fisiològiques i bioquímiques. Les isoformes es diferencien principalment per la seva afinitat per la glucosa.

El transportador Glut1 presenta una alta afinitat per la glucosa i una Km de 3 mM. L'expressió d'aquest transportador a la majoria de les cèl·lules els hi permet assegurar-se un aport mínim de glucosa.

El transportador Glut2 es caracteritza per la seva baixa afinitat per la glucosa i la seva elevada Km (15 mM). Aquesta característica li confereix una elevada capacitat de transport, directament proporcional a les diferents concentracions fisiològiques del sucre. En les cèl·lules β del pàncreas, el Glut2 juntament amb l'enzim glucoquinasa, actuarien com a "sensor de glucosa". Per contra, en el fetge regularien els nivells de glucosa circulants. Tant a intestí prim com a ronyó, el Glut2 s'expressa en la membrana basolateral de les cèl·lules, captant glucosa de la dieta o reabsorbint-la, respectivament.

La isoforma Glut3 es troba en diferents tipus cel·lulars, però és el transportador més abundant en cèl·lules neuronals. La glucosa és l'única font d'energia d'aquestes cèl·lules. Aquest transportador té una Km per la glucosa molt baixa, el que permet l'entrada de glucosa dins la neurona fins i tot en condicions d'hipoglucèmia molt marcada

Glut4 es diferencia de la resta d'isoformes perquè en absència d'insulina no es troba a la superfície sinó que es localitza en vesícules intracel·lulars. La insulina activa la translocació del Glut4 a la membrana citoplasmàtica i causa una estimulació ràpida i reversible en el transport de glucosa en múscul i en teixit adipós (Simpson i Cushman, 1986).

El transportador Glut5 es la isoforma més divergent de totes. Això es coherent amb el fet que principalment transporta fructosa (Burant et al , 1992). Es localitza en la membrana apical dels enteròcits intestinals i és la via principal de captació de fructosa de la dieta. També s'expressa en elevada concentració en la membrana plasmàtica de l'espermatozou.

3. FOSFORILACIÓ DE LA GLUCOSA

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

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

S'ha suggerit que el transport de glucosa i les hexoquinases podrien formar complexes de multisubunitats per canalitzar el transport i la fosforilació, proporcionant les exigències metabòliques necessàries per a cada teixit (Bell et al, 1993). Així doncs, cada una de les isoformes podria coexpressar-se amb un transportador de glucosa específic formant un complex, com per exemple hexoquinasa I i Glut1;

hexoquinasa II i Glut4; o glucoquinasa i Glut2. La manera en que aquests dos processos estan acoblats en funció de la concentració intracel.lular de la glucosa, sembla ésser crucial en la utilització específica de la glucosa en cada teixit (Printz et al, 1997)

Taula II. HEXOQUINASES EN MAMIFERS

Nom	Localització principal	Km glucosa (mM)	Funció
HK I	Ubíqua Cervell, ronyó	0.04	Responsable amb el Glut1 i Glut4 de la fosforilació de glucosa independentment d'insulina
HK II	Múscul, Adipós	0.13	Fosforilació de glucosa estimulada per insulina
HK III	Nucli cel.lular	0.02	Expressió constitutiva
GK	Fetge Cèl.β pàncreas	5	Regulador dels nivells de glucosa circulants Sensor de glucosa

3.1. L'ENZIM GLUCOQUINASA

La glucoquinasa (GK) és l'hexoquinasa predominant en les cèl·lules parenquimals de fetge i en les cèl·lules β del pàncreas. També està present en cèl·lules neuroendocrines del tracte gastrointestinal i en la pituitària anterior (Hughes et al., 1991; Liang et al., 1991) i, més recentment, en cèl·lules α i δ dels illots de Langerhans (Heimberg et al., 1996; Toyoda et al., 1997).

La característica més remarcable del gen de la GK és la presència de dos promotors alternatius responsables de l'inici de transcripció d'aquest gen. Aquest fet implica dos enzims diferents segons el lloc de transcripció sigui en hepatòcits o en cèl·lula β . El promotor més distal és funcional en les cèl·lules β (Magnuson i Shelton, 1989) mentre que el promotor proximal funciona solament en el fetge (Magnuson et al., 1989). El gen de la GK és un gen de seqüència única que conté 11 exons. Tant a fetge com a pàncreas, els exons 2-10 són idèntics, però no succeeix el mateix amb el primer exó. En el fetge, l'exó1 (1L) està situat adjacent a la resta d'exons mentre que en la cèl·lula β l'exó1 (1 β) està separat en l'extrem 5' com a mínim 22Kb en rata i 26Kb en humans (Iynedjian, 1993). Aquesta divergència es tradueix en una diferència de 15 aminoàcids entre les dues proteïnes. La presència de diferències en el primer exó implica la utilització de promotors diferents en cada cèl·lula. Aquest ús de diferents promotors està d'acord amb les diferències requerides en la regulació per tal proveir les distintes funcions fisiològiques de la GK en el fetge i en la cèl·lula β .

3.1.1. Regulació nutricional i hormonal a llarg termini

Els canvis nutricionals i l'estimulació hormonal afecten de forma diferent al gen de la GK a partir dels seus promotors alternatius. Les propietats cinètiques de la GK i la regulació dels nivells de proteïna per insulina i glucagó permeten que aquest enzim presenti un paper clau en la regulació i integració del metabolisme de la glucosa a fetge (Pilkis i Graner, 1992). Per contra, en la cèl·lula β funciona com un component crític en l'aparell sensor de la glucosa, que modularia la secreció d'insulina en resposta a canvis en les concentracions de glucosa circulants (Newgard i McGarry, 1995; Newgard, 1996).

Els nivells de l'activitat GK en el fetge de rata i d'altres mamífers varien amb l'estat nutricional de l'animal. L'activitat GK disminueix durant el dejuni i es restableix

amb realimentació amb glucosa (DiPietro i Weinhouse, 1960; Sharma et al , 1963). Existeixen canvis molt marcats en la quantitat de RNA missatger (mRNA) en aquestes condicions (Iynedjian et al, 1987; Minderop et al, 1987). En canvi, en els illots de Langerhans els nivells de mRNA es mantenen constants durant el dejuni perllongat. Aquests resultats suggereixen que el gen de la GK hepàtica és regulat per senyals nutricionals mentre que el gen de la GK de pàncreas no respon a aquests estímuls. Així doncs, la GK de fetge es comporta com un típic enzim adaptatiu mentre que en la cèl.lula β s'expressa de manera constitutiva.

La insulina i el glucagó són els principals reguladors de la GK hepàtica. La insulina és un dels principals estimuladors de la GK i no depèn de la concentració de glucosa extracel.lular. En rates diabètiques on la transcripció del gen de la GK està suprimida, l'administració d'insulina incrementa 20 vegades la transcripció del gen en els 45 minuts següents (Iynedjian et al, 1988, Magnuson et al, 1990). El glucagó via AMPc (segon missatger) té l'efecte contrari, a més aquest efecte inhibitor és dominant sobre l'efecte estimulador de la insulina.

En la cèl.lula β , la glucosa ha de ser transportada i metabolitzada tant per la secreció d'insulina com per la síntesi *de novo* de l'hormona. Així, la insulina no té efecte sobre als nivells de la GK de pàncreas, on sembla que esta regulada per glucosa. El mecanisme pel qual la glucosa regula la GK de pàncreas no es coneix totalment, però els estudis que existeixen fins ara senyalen cap a una modulació a nivell post-transcripcional. Matschinsky et al han especulat que la glucosa per sí mateixa podria controlar la tasa de degradació de la GK, així com també l'activitat de l'enzim.

3.1.2. Regulació a curt termini de l'activitat GK

La GK és inhibida per àcids grassos de cadena llarga (Dawson i Hales, 1969). L'efecte inhibitor es immediat, però reversible instantàniament. Estudis cinètics suggereixen que l'àcid palmític i l'àcid oleic s'uneixen allostèricament a la molècula de GK produint un canvi conformacional en l'enzim, que fa disminuir la seva afinitat per glucosa.

La inhibició de l'activitat GK àcids grassos podria ser significativa *in vivo* en situacions on hi ha un augment important en la lipolisi com es dona durant el dejuni o en diabetis mellitus (Iynedjian, 1993)

Un altre mecanisme de la regulació a curt termini de l'activitat GK es la proteïna reguladora (Van Schaftingen et al 1992) que és capaç d'unir-se i inhibir la GK en presència de fructosa-6-fosfat. L'afinitat de la GK per la glucosa canvia quan interacciona amb la proteïna reguladora. La fructosa-1-fosfat antagonitza aquesta inhibició causant la dissociació del complex GK-proteïna reguladora. La massa molecular de la proteïna reguladora es de 62kDa i l'efecte que produeix juntament amb l'acid palmític en l'activitat GK es competitiva, suggerint que s'uneixen al mateix lloc (Detheux et al, 1993). En hepatòcits, tot i que la proteïna reguladora es troba en concentracions suficients per inhibir tota l'activitat GK, aquesta inhibició és incompleta (aprox un 70%), possiblement per la interacció del fòsfor inorgànic sobre aquest complex. La proteïna reguladora també es troba en la cèl.lula β però es desconeix el seu paper en la regulació de la GK (Printz et al, 1993)

3.2. PAPER DE LA FOSFORILACIÓ EN ANIMALS TRANSGÈNICS

En els últims anys, s'han desenvolupat models d'animal transgènic per tal de determinar el paper de la GK en el control de l'homeòstasi de la glucosa. El paper de la fosforilació de la glucosa en la regulació de la secreció d'insulina va ésser analitzada expressant el gen de l'HKB de llevat en cèl.lules β (Epstein et al, 1992). L'increment de l'activitat HK en els illots transgènics comporta un increment en els nivells d'insulina, una reducció dels nivells de glucosa sanguinària i un increment en la secreció d'insulina estimulada per glucosa (Epstein et al, 1992, Voss-McCowan et al., 1994). Per contra, l'activitat GK ha estat reduïda en ratolins transgènics que expressen un RNA antisentit de la GK amb un element ribozima sota el control del promotor de la insulina (Efrat et al, 1994). Aquests animals presenten una marcada reducció en l'activitat GK que induïx una disminució en la secreció d'insulina estimulada per glucosa en illots aïllats. Resultats similars s'han obtingut expressant exclusivament en la cèl.lula β un RNA antisentit de la GK (Ishihara et al., 1995). Aquests ratolins, presenten alteracions en el test de tolerància a la glucosa en funció del background genètic. Així, ratolins transgènics amb el background C57BL/6, però no els C3H, mostren elevats nivells de glucèmia respecte els controls després del test de tolerància. Aquests resultats suggereixen que defectes en la secreció per part de la cèl.lula β , en combinació amb factors genètics indefinits, poden causar alteracions en l'homeòstasi de la glucosa en ratolins. D'altra banda, estudis amb ratolins transgènics pel locus del gen de la GK, presenten una reducció de la concentració de glucosa en sang sense que augmentin els nivells d'insulina plasmàtica (Niswender et al., 1997). Aquesta reducció condueix a un increment de l'eficiència en la utilització de la glucosa per part del fetge en funció del nombre de còpies per genoma.

El paper de la GK específica de la cèl.lula β en el desenvolupament de la diabetis va ésser analitzat en ratolins amb la disrupció de l'exó específic 1 β del gen de la GK (Terauchi et al., 1995). Els mutants heterozigots presenten una diabetis suau com a conseqüència de l'alteració de la secreció d'insulina en resposta a glucosa però amb una sensibilitat per la insulina normal. Els animals homozigots presenten diabetis severa i moren durant les primeres setmanes de vida. Illots aïllats dels ratolins deficientes en GK presenten defectes en la secreció d'insulina en resposta a la glucosa però no enfront d'altres secretagogs.

Per tal d'obtenir un model de diabetis tipus 2 MODY2, s'han generat ratolins transgènics deficients en GK tant en cèl.lula β com en fetge (Bali et al., 1995; Grupe et al., 1995). Els ratolins heterozigots amb només un alel per la GK mostren un fenotip similar a MODY2, ja que presenten un augment en la glucèmia i una reducció en la secreció d'insulina. A més, presenten també una disminució en la tolerància a la glucosa i un metabolisme hepàtic de la glucosa alterat. En canvi, els ratolins completament deficients en GK presenten una marcada hiperglucèmia i moren després de néixer.

També s'han generat ratolins transgènics que expressen GK sota el promotor d'insulina humana. Aquests animals han estat creuats amb els ratolins deficients de GK per tal de separar els efectes de la GK de la cèl.lula β de la de fetge (Grupe et al., 1995). Els resultats obtinguts mostren que els ratolins que expressen el transgen poden sobreviure en absència total de la GK hepàtica. A més a més, els ratolins transgènics que expressen GK en cèl.lula β i són heterozigots per la manca de GK mostren valors de glucèmia similars als controls. Això indica que l'expressió de GK en la cèl.lula β és suficient per mantenir la normoglucèmia en ratolins amb un sol alel funcional de GK en fetge.

4. EL SENYAL DE LA GLUCOSA

La regulació de l'expressió gènica per nutrients es un mecanisme important en l'adaptació dels mamífers al seu ambient nutricional. Els enzims involucrats en l'emmagatzement d'energia, els enzims glucolítics i lipogènics de fetge i teixit adipós, són especialment sensibles a canvis en la seva expressió en funció de l'estat nutricional (Girard et al, 1997). Existeixen evidències que suggereixen que la via del senyal de la glucosa sobre la maquinaria transcripcional comença quan la glucosa entra en la cèl.lula i es fosforilada.

En el teixit adipós, la insulina incrementa l'expressió dels enzims lipogènics de manera indirecta per estimulació en la captació de glucosa. En el fetge, la insulina també actua de manera indirecta en l'activació d'aquests gens a través de l'activació de la síntesi de GK i per tant incrementant la fosforilació de la glucosa. El consum de dietes alta en carbohidrats estimula la via lipogènica, mentre que el dejuni i el consum de dietes riques en lípids i pobres en carbohidrats tenen l'efecte contrari. El flux a través de la via lipogènica depen tant de la capacitat dels substrats lipogènics com dels cofactors com per exemple el NADPH produït per la via de les pentoses. La regulació en l'activitat dels enzims lipogènics es dona tant a curt com a llarg termini. La velocitat en la síntesi dels enzims glucolítics i lipogènics estan controlades a nivell transcripcional. En rates adultes, la inducció dels enzims lipogènics hepàtics i dels adipocits és ràpida i depen de la quantitat de carbohidrats de la dieta (Girard et al, 1997).

Estudis realitzats en cèl.lules en cultiu semblen indicar que l'activació de la GK és necessària per l'inducció de la glucòlisi i la síntesi de glucogen. En els promotors dels gens que codifiquen per alguns dels enzims involucrats en la glucòlisi i lipogènesi s'han localitzat elements de resposta a la glucosa (GLRE) formats per dues caixes E (E-boxes) imperfectes amb la seqüència CACGTG formant una seqüència palindròmica (Girard et al, 1997 ; Towle et al, 1997). En aquestes seqüències s'uneixen els factors de transcripció USF1 i USF2 (*upstream stimulatory factor*), que sembla que són necessaris per la resposta a glucosa (Kahn, 1997). La piruvat quinasa-L (L-PK) és un enzim clau que catalitza l'últim pas de la glucòlisi.

En el seu promotor s'han identificat aquests GLRE, així com també en els promotors dels enzims sintasa d'àcids grassos (FAS), Spot14 (S14), Acetil-CoA carboxilasa (ACC)

A més, s'ha observat que existeix una correlació positiva entre concentracions intracel·lulars de glucosa-6-fosfat i concentracions de mRNA de ACC, FAS, L-PK en fetge, teixit adipós i línies cel·lulars de pàncreas.

S'ha demostrat en hepatòcits en cultiu primari que la regulació de l'expressió dels gens involucrats en el control de la glucòlisi i lipogènesi requereixen la presència tant d'insulina com de glucosa (Vaulont et al, 1994; Girard et al, 1994). Després de l'ingesta d'aliments, en el fetge l'increment dels nivells de glucosa sanguínia estimula la inducció de la glucòlisi, glucogènesi i lipogènesi. En aquesta situació, la concentració d'insulina plasmàtica s'incrementa i les hormones contraregulatories com el glucagó, decreixen. La insulina activa aquestes vies actuant tant a nivell pretranscripcional com posttranscripcional. En cèl·lules d'hepatoma on l'activitat hexoquinasa és constitutiva, l'activació de la PK dependent de glucosa no requereix insulina. A més, aquesta situació pot ser reproduïda per l'analog no metabolitzable de la glucosa, 2-deoxiglucosa. En hepatòcits, l'efecte de la insulina en l'activació d'aquest gen també pot ser reproduïda per la fructosa a baixes concentracions. Aquest resultat és mediat per la fructosa-1-fosfat que suprimeix la inhibició de la proteïna reguladora sobre la GK causant la dissociació del complex. Per tant, el principal paper de la insulina en la resposta del gen L-PK per glucosa en hepatòcits podria donar-se estímulant la fosforilació de glucosa dependent de GK, és a dir, la síntesi de glucosa-6-fosfat

Tots aquests estudis evidencien que la glucosa-6-fosfat podria estar implicada en l'estimulació de l'expressió gènica en resposta a un increment en la glucosa sanguínia, actuant com a senyal i activant els gens lipogènics i glucolítics.

5. PAPER DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC EN L'HOMÈOSTASI DE LA GLUCOSA

El múscul esquelètic és el teixit perifèric més important involucrat en la captació de glucosa després d'una ingesta oral del sucre. Constitueix un 40 % de la massa corporal i s'ha descrit que la contribució en l'eliminació de glucosa després d'una ingesta d'aliments és d'un 75 % (16). Aquest teixit capta glucosa per difusió facilitada de manera tant dependent com independent d'insulina. A més, s'ha demostrat que expressa nivells relativament elevats de Glut4 (responsable del transport de glucosa estimulat per insulina) i nivells baixos de Glut1 (localitzat en la membrana plasmàtica i responsable de la captació basal de glucosa independent d'insulina). En condicions basals, Glut4 es localitza en vesícules intracel·lulars i es transloca a la membrana cel·lular en resposta a insulina. Aquesta translocació sembla ser el primer mecanisme pel qual la insulina estimula la captació de glucosa (88)

La ràpida conversió de glucosa a glucosa-6-fosfat, reacció catalitzada per membres de la família de les hexoquinases, manté els nivells de glucosa intracel·lulars molt baixos per tal d'assegurar la entrada de glucosa en la cèl·lula. Les hexoquinases I i II (HKI i HKII) són els isoenzims predominants en el múscul esquelètic. Glut4 i l'HKII constitueixen el primer pas en la utilització de glucosa estimulada per insulina. L'activitat enzimàtica així com els nivells de mRNA de HKII en el múscul esquelètic estan disminuïts quan els nivells d'insulina són baixos o quan el senyal d'insulina està alterat. D'altra banda, Glut1 i l'HKI són considerats els responsables de la captació basal del sucre.

Gran part de la glucosa que entra en les fibres musculars en resposta a la insulina és convertida en glucogen. La síntesi de glucogen està realment alterada en diabetis tipus 2 i en individus resistents a l'insulina amb una tolerància a la glucosa normal predisposats a desenvolupar diabetis tipus 2 (16). La glucogen sintasa (GS) és un enzim clau en el control de la formació de glucogen regulat per insulina. Animals transgènics que sobreexpressen GS en múscul esquelètic han demostrat que el transport de glucosa no és estrictament el pas limitant per la síntesi de glucogen (59) Els resultats obtinguts en aquests animals recolzen la conclusió que l'activació de la GS, així com el transport de glucosa, contribueixen a l'accumulació de glucogen en resposta a insulina en el múscul esquelètic.

5.1. EL PROMOTOR MLC

El gen de la cadena lleugera de la miosina (MLC) és específic de múscul que presenta dos promotors diferents i *splicing* alternatius que generen dos mRNAs que codifiquen per MLC1f i MLC3f. Aquests dos tipus de cadenes lleugeres s'expressen selectivament en fibres musculars de contracció ràpida encara que difereixen en la seva regulació al llarg del desenvolupament (Rao et al, 1996).

Analisi per transfecció en cèl·lules musculars han donat lloc a la caracterització dels dos promotors, així com a l'identificació d'un *enhancer* o seqüència activadora que activa tant els promotors MLC1f/3f com promotors heteròlegs.

Estudis amb animals transgènics demostren que un constructe que contingui 1.2Kb del promotor MLC1f més un fragment de 0.9Kb del *enhancer* distal del MLC reproduïx moltes de les característiques de l'expressió del gen endogen, que inclou una adequada regulació al llarg del desenvolupament, una elevada expressió en múscul, baixa expressió en teixits no musculars i una expressió selectiva en fibres de contracció ràpida. A diferència del gen endogen, i de manera sorprenentment, l'expressió del transgen té un gradient rostrocaudal, les bases d'aquest gradient d'expressió són desconegudes.

El promotor MLC1f és suficientment potent per induir elevats nivells d'expressió com ho demostren els estudis amb gens quimèrics MLC1/GLUT1 i MLC1f/GLUT4. Per aquest motiu aquest promotor es idoni per dirigir l'expressió de manera constitutiva de gens quimèrics exclusivament en fibres musculars.

6. LA DIABETIS MELLITUS

La homeòstasi de la glucosa es manté dins d'un rang normal mitjançant l'ajust entre la producció hepàtica de glucosa i la captació del sucre pels teixits perifèrics i el fetge. Aquest balanç es regulat per les cèl.lules β pancreàtiques mitjançant la secreció d'insulina. La diabetis mellitus es una malaltia caracteritzada per l'incapacitat de l'organisme de regular correctament la glucosa sanguínia, com a conseqüència de la deficiència d'insulina o per incapacitat de l'hormona d'actuar eficientment en teixits diana com el múscul, fetge o el teixit adipós. La diabetis mellitus es una de les malalties metabòliques més freqüents en clínica humana. Inclou un ampli ventall de síndromes amb diferents etiologies que arriben a afectar d'un 2 a un 6 % de la població mundial. Totes les formes de diabetis es caracteritzen pel desenvolupament de hiperglucèmia, que sembla ésser la responsable del desenvolupament de la patologia microvascular en la retina i en ronyó i de les complicacions neurològiques. La diabetis també incrementa el risc del desenvolupament de aterosclerosi prematura i augmenta la mortalitat per infart de miocardi, malaltia cerebrovascular i vascular perifèrica (Pickup i Williams, 1994). Es diferencien clínicament dos tipus de diabetis; la diabetis mellitus dependent d'insulina o tipus 1 i la diabetis mellitus no dependent d'insulina o tipus 2

6.1. LA DIABETIS MELLITUS DEPENDENT D'INSULINA O TIPUS 1

La diabetis mellitus dependent d'insulina o diabetis tipus 1 afecta d'un 5 a un 10 % de la població diabètica. Es manifesta generalment abans dels 30 anys, freqüentment durant l'adolescència, i es el resultat de la destrucció autoimmune de les cèl.lules β dels illots de Langerhans del pàncreas, donant com a resultat hiperglucèmia i cetoacidosi. Es desconeixen les causes que provoquen aquesta resposta immunitària, però sembla que en el desenvolupament de la malaltia interaccionen la susceptibilitat genètica i factors ambientals (Atkinson et al, 1994). Els símptomes que presenten els pacients no tractats són polidipsia, poliúria i polifàgia acompanyats d'una pèrdua de pes.

El tractament del pacient afectat de diabetis tipus I depen de manera dramàtica de l'administració de l'hormona, ja que la interrupció o manca de tractament resulten primer en una hiperglucèmia, després en coma i finalment en la mort del pacient. Aquest tractament no impedeix l'aparició a llarg termini de les complicacions secundàries de la malaltia.

6.2. LA DIABETIS MELLITUS NO DEPENDENT D'INSULINA O TIPUS 2

La diabetis mellitus no dependent d'insulina (NIDDM) o tipus 2 es la més comú, amb una incidència que afecta entre el 90-95% de la població diabètica. Es manifesta en individus adults i es caracteritza no per una deficiència d'insulina, si més no en els estadis inicials, sinó per la incapacitat de l'hormona d'actuar eficientment en teixits diana com múscul, fetge, o teixit adipós. Existeixen evidències que suggereixen que aquests defectes són el resultat d'una interrelació complexa entre un o més locus genètics i diversos factors ambientals, en particular la dieta i el nivell d'activitat física. És difícil determinar quins defectes són primaris i quins són conseqüències secundàries dels canvis metabòlics. A més, es desconeix on s'inicia el procés, tot i que existeixen quatre candidats: múscul esquelètic, fetge, teixit adipós, i cèl·lules β pancreàtiques. Tantmateix, el paper relatiu de cadascun dels teixits en la iniciació del procés està en discussió. La resistència a la insulina generalment precedeix a la hiperglucèmia, i es considera la causa primària de la diabetis tipus 2. Per tant, es creu que l'hiperinsulinèmia i l'hiperplasia d'illots associada són respostes compensatòries secundàries que permeten contrarestar la falta d'acció de la insulina

L'etiopatogènia de la diabetis tipus 2 ha estat àmpliament estudiada en els últims anys, però, degut a la gran heterogeneïtat que presenta aquesta malaltia, encara no s'han esbrinat els mecanismes bioquímics i moleculars que la produeixen. No obstant, s'ha de considerar la influència genètica, com ho demostra l'elevada incidència d'aparició de l'enfermetat en els bessons univitel·lins, que és pràcticament de 100 per cent (Barnett et al., 1987). Encara que la relació familiar és ben evident, la forma de transmissió hereditària és desconeguda en l'ampli marge de la població diabètica

Existeix un subtipus de diabetis tipus 2 anomenada MODY (maturity-onset diabetes of the young) caracteritzada per la seva aparició en la primera o segona dècada de vida i que presenta una herència autosòmica dominant. Aquests subtipus de diabetis resulta de la mutació en almenys tres gens diferents en el cromosoma 20 (MODY1), en el 7 (MODY2), i en el 12 (MODY3). Pacients afectats amb MODY2 presenten mutacions puntuals en el gen de la glucoquinasa que condueix a una reducció en l'activitat enzimàtica i en la secreció d'insulina.

La diabetis tipus 2 està associada a l'obesitat, ja que aproximadament un 45% dels homes i un 70% de les dones amb diabetis tipus 2 són obesos. La resistència a la insulina associada a l'excés de pes provoca un increment en la demanda de secreció d'insulina que contribueix en l'exhauriment de la cèl.lula β per desembocar en una diabetis tipus 2. La diabetis tipus 2 podria ser considerada com un desordre en el metabolisme lipídic així com una pertorbació en la tolerància a la glucosa. És possible que l'increment en els nivells lipídics expliquin, si més no en part, no només la resistència a insulina sinó també una disfunció de la cèl.lula β (Prentki i Corkey, 1996)

6.2.1. Lipotoxicitat

El concepte de lipotoxicitat ha estat proposat recentment per explicar la progressiva disminució de la funció de la cèl.lula β com a causa en el desenvolupament de la intolerància a la glucosa fins a una diabetis tipus 2 oberta amb hiperglucèmia en dejú (DeFronzo, 1997). Degut a que molts dels principis de la lipotoxicitat se sobreposen amb els de glucotoxicitat, seria més adequat parlar de lipoglucotoxicitat.

Existeixen evidències que suggereixen que alteracions en el metabolisme lipídic presenten un paper important en la secreció d'insulina induïda per glucosa. Les rates obeses Zucker (fa/fa) han estat un model ideal per estudiar el mecanisme de la hipersecreció de la cèl.lula β en l'obesitat.

Aquests animals, així com en humans, presenten elevats nivells en la secreció basal d'insulina, una resposta a insulina exagerada i una relativa hiperlipidèmia. En aquestes rates en estat prediabètic s'observa un increment progressiu en els nivells plasmàtics d'àcids grassos lliures no esterificats (FFA) aproximadament dues setmanes abans de l'aparició de hiperglucèmia i de la pèrdua en la secreció d'insulina estimulada per glucosa. Aquests resultats en el model animal i la resistència a insulina que presenten semblen indicar que és la lipotoxicitat causa d'algunes de les anomalies de la cèl.lula β observada abans i després de l'aparició de la diabetis tipus 2.

Els èsters d'àcids grassos de cadena llarga semblen que són el senyal que desencadena la secreció d'insulina en la cèl.lula β .

En presencia de concentracions elevades de glucosa, la beta-oxidació s'inhibeix, i augmenta la concentració d'àcids grassos de cadena llarga provocant la secreció d'insulina. Indirectament, la glucosa contribueix a l'augment d'àcids grassos incrementant el malonil-CoA. Per contra, una exposició crònica a FFA o glucosa podria conduir a una disminució (downregulation) o fins i tot a una inhibició de la secreció d'insulina. Sembla ser que alteracions en el metabolisme lipídic intracel·lular podrien alterar l'expressió dels gens que codifiquen per proteïnes implicades en la secreció d'insulina estimulada per glucosa.

**PART I: SOBREEXPRESSIÓ DE LA
GLUCOQUINASA EN FETGE DE RATOLÍ**

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

La glucoquinasa (GK), o hexoquinasa IV, es l'enzim que regula la fosforilació de la glucosa a glucosa 6-fosfat en el fetge. Aquest enzim difereix de la resta d'hexoquinases de mamífer per la seva baixa afinitat per la glucosa, l'absència d'inhibició per glucosa-6-fosfat i la cooperativitat cinètica per la glucosa (Iynedjian 1993; Printz et al 1993). La baixa afinitat de la GK per la glucosa assegura una velocitat de fosforilació directament proporcional als nivells de glucosa sanguinària i als nivells cel·lulars. Els canvis que es produeixen en l'activitat GK corresponen principalment a canvis en la quantitat de proteïna. Els reguladors fisiològics més importants en l'expressió del gen de la GK són la insulina i el glucagó (via cAMP, el segon missatger). La insulina incrementa la transcripció del gen de la GK, mentre que AMPc té l'efecte contrari (Iynedjian 1993; Printz et al 1993). L'estimulació per insulina no depèn de la concentració extracel·lular de glucosa. D'altra banda l'activitat GK també pot ser regulada per la unió amb la proteïna reguladora de la GK que inhibeix la seva activitat (Van Schaftingen et al, 1994). L'efecte d'aquesta proteïna està reforçat per la fructosa-6-fosfat, i antagonitzat per fructosa -1-fosfat.

Després de la ingesta d'aliments, l'increment en els nivells de glucosa en sang condueix a una inducció de la glucòlisi, glucogènesi i lipogènesi en el fetge (Pilkis i Granner, 1992). En aquesta situació, la concentració d'insulina plasmàtica augmenta i els nivells de hormones contraregulatories com el glucagó disminueixen. La insulina estimula totes aquestes vies actuant tant a nivell post com pre-traduccionals. L'activació pre-traduccionals en els enzims glucolítics i lipogènics resulten principalment de l'activació de la transcripció. S'ha descrit en hepatòcits, que la regulació en l'expressió de molts dels gens involucrats en el control de la glucòlisi i lipogènesi requereix la presència tant d'insulina com de glucosa (Vaulont et al, 1994; Girard et al, 1994).

S'ha suggerit que el paper de la insulina en l'activació d'aquests gens podria donar-se a través de l'estimulació de la síntesi de GK, i això provocar un augment en la fosforilació de la glucosa a glucosa-6-fosfat (Vaulont et al, 1994; Girard et al, 1994). Aquest metabolit podria estar implicat en l'estimulació de l'expressió genica en resposta a un increment en la glucosa sanguinària. S'han identificat elements reguladors per glucosa/carbohidrats en els gens de la L-PK, S14 i FAS (Shih i Towel, 1992; Shih i Towel, 1994). Estudis realitzats *in vitro* en cèl·lules en cultiu semblen indicar que l'activació de la GK es necessària per la inducció de la glucòlisi i la síntesi de glucogen. D'altra banda, quan els nivells de glucosa són elevats, el fetge augmenta la captació del sucre i omple els dipòsits de glucogen. Quan aquests dipòsits estan saturats, es sintetitzen àcids grassos. Així, el rescat en l'activitat GK en cèl·lules d'hepatoma, que manquen en l'expressió de GK endògena, després de la infecció amb un vector retroviral contenint el gen de la GK, indueixen la utilització i acumulació de glucosa (Valera i Bosch, 1994). Així mateix, un vector que expressa GK de manera constitutiva cotransfectat amb el gen químic L-PK/cloramfenicol acetiltransferasa confereix una sensibilitat per glucosa independent d'insulina en hepatocits (Doiron et al, 1994), indicant que l'efecte de la insulina en l'activació dependent de glucosa del promotor de la L-PK es permetre la fosforilació de la glucosa a través de l'estimulació de la síntesi de GK. A més, en algunes cèl·lules d'hepatoma (Lefrançois-Martinez et al, 1994) on l'activitat hexoquinasa és constitutiva, l'activació dependent de glucosa de la L-PK no requereix insulina, i es reproduïble per l'analog de la glucosa no metabolitzable 2-deoxiglucosa. A més a més, en hepatocits l'efecte de la insulina en l'activació dependent de glucosa de l'expressió del gen L-PK és reproduïble per baixes concentracions de fructosa (Doiron et al, 1994; Lemaigre i Rousseau, 1994). La fructosa podria actuar a través de la fructosa-1-fosfat desinhibint l'activitat GK com a conseqüència de la dissociació del complex GK-proteïna reguladora (Van Schaftingen et al, 1994).

Les propietats cinètiques de la GK i la regulació dels nivells d'enzim per insulina i glucagó poden portar a una situació en la qual la GK tingui un paper clau en la regulació i la integració del metabolisme de la glucosa en fetge.

Per tal d'estudiar si l'activació de la GK es capaç de controlar la utilització i acumulació hepàtica de glucosa *in vivo*, es van generar ratolins transgènics que expressen GK en fetge en dejuni. En aquestes condicions, l'activitat de l'enzim es molt baixa i la glucòlisi i glucogènesi estan bloquejades (Ilyedjian 1993; Printz et al 1993). Així doncs, el restabliment de l'activitat GK ens permetria evaluar la contribució d'aquest enzim en el metabolisme de la glucosa a fetge. Per tal de dirigir l'expressió de la GK, varem utilitzar el fragment del promotor del gen de la PEPCK -450pb a +73pb, que s'ha demostrat que dirigeix l'expressió de gens quimerics principalment en fetge (Lemaigre i Rousseau, 1994; McGrane et al, 1990; Short et al, 1992; Valera et al, 1994)

Ens proposarem estudiar també les conseqüències a llarg termini dels elevats nivells en l'activitat GK causada per la sobreexpressió crònica de la glucoquinasa a fetge. Així com determinar si aquest increment crònic en la captació i utilització de la glucosa podria alterar l'homeòstasi de la glucosa.

Aquest estudi demostra que la GK és expressada en el fetge de ratolins transgènics mantinguts en condicions de dejuni, i que l'activació de la GK és el pas limitant en la utilització i l'acumulació de la glucosa. D'altra banda, hem observat que la sobreexpressió crònica d'activitat GK a fetge en aquests animals condueix a un increment de la lipogènesi hepàtica i a elevats nivells de triglicèrids sèrics, fet que podria donar lloc a un estat de resistència a la insulina, confirmant així el paper clau del fetge en el control del l'homeòstasi de la glucosa.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS QUE SOBREEXPRESSEN GLUCOQUINASA

Amb la finalitat d'estudiar els efectes de la sobreexpressió de la glucoquinasa en les cèl.lules hepàtiques, es van obtenir ratolins transgènics que expressaven el cDNA de la glucoquinasa dirigit pel promotor de la PEPCK

1.1. CONSTRUCCIÓ DEL GEN QUIMÈRIC PEPCK/GK

El gen quimèric utilitzat en aquest treball estava format pel promotor del gen P-enolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) de rata, un fragment del gen de la insulina humana i pel cDNA de rata de la glucoquinasa (Figura 1). El fragment del cDNA de la glucoquinasa contenia la seqüència sensera codificant i el senyal de poliadenilació.

Es va crear una nova diana *EcoRI* en el gen quimèric PEPCK/Insulina (Valera et al, 1994). Aquest gen quimèric es va utilitzar per tal de dirigir l'expressió a fetge així com per regular l'expressió del RNA missatger i la seva estabilitat.

L'estrategia utilitzada per obtenir el gen quimèric PEPCK/GK es va iniciar subclonant el fragment *BglII-SphI* del gen quimèric PEPCK/Insulina, que inclou el primer exó i l'inici de traducció del gen de la insulina humana, en el polylinker pSP72. Va ser necessari la destrucció d'aquest inici de traducció del gen de la insulina per tal de que l'inici fos en el gen de la glucoquinasa. Per destruir el senyal ATG d'inici de traducció, que estava continguda en una seqüència única de restricció *NcoI*, aquest fragment del gen de la insulina es va digerir amb *NcoI* i va ser tractat amb mung bean nucleasa per tal d'escindir l'extrem de cadena simple format per l'enzim de restricció. A continuació, es va introduir un polylinker *EcoRI* per tal de generar un nou lloc de subclonatge *EcoRI*. Això ens permetia introduir el fragment *EcoRI-EcoRI* del cDNA de la glucoquinasa. Finalment, el fragment *BglII-SphI* del gen de la insulina humana que contenia tot el cDNA de la glucoquinasa va ser reinsertat en el gen quimèric PEPCK/Ins. El plasmidi final va ser designat pPEPCK/GK (Figura 1).

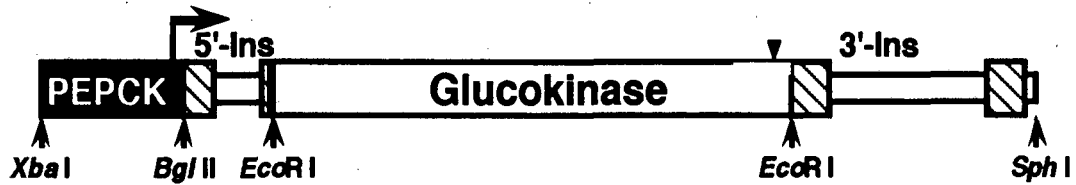


Figura 1. Representació esquemàtica del gen quimèric PEPCK/GK. El fragment de 4.5Kb *XbaI-SphI*, que conté el gen quimèric, va ser microinjectat en òvuls fertilitzats.

1.2. GENERACIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS

El gen quimèric PEPCK/GK es va microinjectar en oòcits fecundats i es varen obtenir nou línies fundadores que havien integrat el transgèn en el seu genoma. En els experiments realitzats al llarg d'aquests estudis, es van utilitzar ratolins de la F1 i F2 de dues línies de transgènics. Una de les dues línies PEPCK/GK-6 (TgA) havia integrat unes cinc còpies intactes del transgèn i l'altra línia PEPCK/GK-47 (TgB) havia integrat unes 20 còpies del gen quimèric PEPCK/GK quan es va analitzar per Southern blot. Es van utilitzar com a control ratolins germans dels transgènics.

2. ESTUDI DELS EFECTES PROVOCATS PER LA SOBREEXPRESSIÓ DE LA GK EN ELS ANIMALS TRANSGÈNICS

A partir de les línies de transgènics establertes, es va estudiar els efectes de la sobreproducció hepàtica de glucoquinasa. En primer lloc, es va estudiar l'expressió del gen quimèric així com l'activitat enzimàtica. També es va analitzar el metabolisme hepàtic tant en l'animal senser com en cèl.lules hepàtiques en cultiu primari. Es va determinar la concentració plasmàtica de glucosa i insulina, així com un estudi del comportament dels animals en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa *in vivo*.

2.1 ANALISI DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN QUIMERIC PEPCK/GK

Per determinar l'expressió del transgèn, es va obtenir RNA total de fetge de ratolins control i transgènics, mantinguts en condicions normals d'alimentació o dejunats 24 hores. L'estudi de l'expressió del gen de la GK es va realitzar mitjançant anàlisi de Northern blot.

Tant en animals control com en transgènics alimentats es va detectar, a l'hibridar amb la sonda del cDNA de la GK, un mRNA de 2.5 kb, com a resultat de l'expressió del gen de la GK endogen així com del transgèn, com a conseqüència de l'expressió del gen quimèric utilitzat (Iynedjian, 1993; Printz et al, 1993). La concentració de mRNA de GK detectat en el fetge dels animals transgènics alimentats era el doble que en el dels animals control (Figura 2). D'altra banda, en el fetge dels ratolins control dejunats es van detectar nivells molt baixos de mRNA de GK. En canvi, en els ratolins transgènics es van observar nivells molt alts del missatger, aproximadament un 70% respecte als ratolins control alimentats (Figura 2).

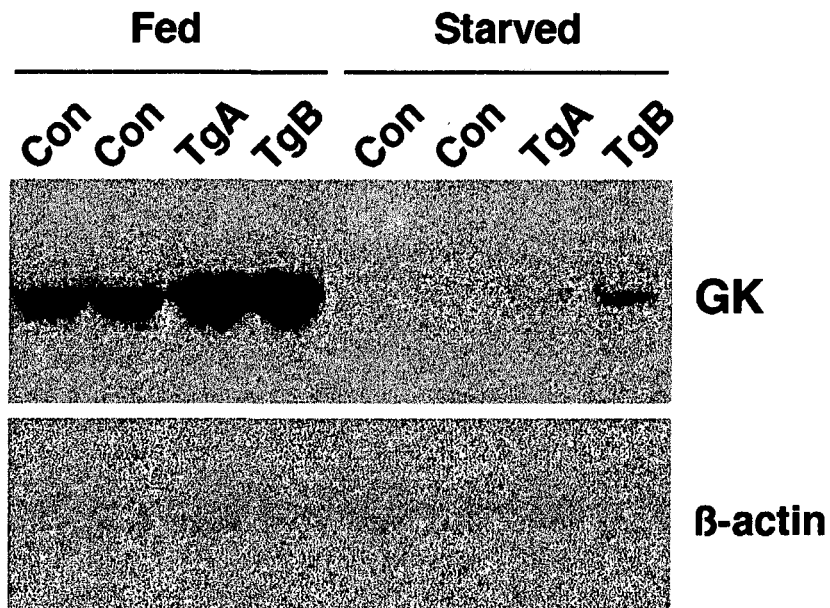


Figura 2. Expressió del transgèn. Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió del gen de la glucoquinasa en el fetge. Es va aïllar RNA total de fetge d'animals control i transgènics de les línies PEPCK/GK-6 (TgA) i PEPCK/GK-47 (TgB) alimentats amb una dieta estàndar de laboratori, i animals control i transgènics de les línies TgA i TgB dejunats 24 h. Es va hibridar amb una sonda de cDNA de glucoquinasa i amb una sonda de β -actina per normalitzar les desigualtats de càrrega.

2.2 ANALISI DE L'ACTIVITAT GLUCOQUINASA

Un cop comprovat que el transgèn s'expressava, es va determinar l'activitat GK hepàtica per verificar que l'augment en l'expressió de la GK en el fetge dels ratolins transgènics corresponia amb un increment de la seva activitat enzimàtica respecte als control. En el fetge dels animals transgènics alimentats l'activitat GK detectada va ser alta en totes dues línies. En la línia TgA, l'activitat GK era de 1.4 vegades superior i en la línia TgB va ser del doble a la dels animals control (Taula 1). L'activitat enzimàtica en el fetge dels animals control dejunats va ser d'un 80% menys que en els control alimentats. Tot i així, l'activitat GK en els animals transgènics dejunats TgA i TgB estava incrementada unes 4 vegades més que en els control dejunats i similar als control alimentats. Aquests resultats indicaven que el fetge dels ratolins transgènics dejunats era capaç de produir enzim actiu (Taula 1).

Encara que l'activitat hexoquinasa era més baixa en els ratolins dejunats que en els alimentats, no es van detectar diferències en l'activitat d'aquest enzim entre els ratolins control i els transgènics en les mateixes condicions d'alimentació (Taula 1).

Table 1. Hepatic glucose phosphorylation activities

	Glucokinase	Hexokinase
	(mU/mg prot)	
Fed		
Control	19,5 ± 1,2	2,05 ± 0,12
Tg A	32,6 ± 3,9	1,95 ± 0,10
Tg B	44,3 ± 4,8	2,27 ± 0,15
Starved		
Control	9,1 ± 1,0	1,22 ± 0,07
Tg A	24,1 ± 1,9	1,19 ± 0,04
Tg B	31,9 ± 2,2	1,15 ± 0,08

Taula 1. Activitat Glucoquinasa i Hexoquinasa. Resultats obtinguts a partir de 18 animals per cada condició. Les determinacions es varen realitzar a partir d'extractes de fetge segons es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM.

2.3 ESTUDI DEL METABOLISME GLUCÍDIC EN EL FETGE

Per tal de comprovar si el metabolisme hepàtic de la glucosa estava alterat, es van realitzar determinacions de les principals activitats enzimàtiques de la via glucolítica, així com el contingut hepàtic de diferents metabolits intermediaris del metabolisme de la glucosa.

La concentració intracel·lular de glucosa 6-fosfat en els animals control dejunats presentava una reducció del 75% comparant amb els control alimentats. En canvi, els animals transgènics dejunats presentaven nivells d'aquest metabolit de 2.5 vegades més elevats respecte els seus control i només una reducció del 25% comparant amb els

control alimentats (Taula 2). Tot i que els animals transgènics dejunats mostraven una activitat GK similar als controls alimentats, aquesta disminució en la glucosa 6-fosfat es podria explicar com una conseqüència dels baixos nivells sanguinis de glucosa en estat de dejuni, i per tant de disminució de substrat disponible per la GK.

En el nostre grup hem demostrat que les cèl·lules de hepatoma FTO-2B i H4IIE, que no són capaços d'acumular glucogen, al ser infectats amb un vector retroviral amb el gen quimèric PEPCK/GK que expressa GK, acumulen grans quantitats del polisacàrid (Valera i Bosch, 1994). De manera similar, els ratolins transgènics alimentats que expressen el gen quimèric PEPCK/GK acumulen més glucogen (unes dues vegades) que els ratolins control (Taula 2). En el fetge dels ratolins control dejunats es van detectar nivells molt baixos de glucogen, mentre que en els ratolins transgènics dejunats mostraven nivells de glucogen similars als controls alimentats, probablement com a resultat de l'increment de glucosa 6-fosfat (Taula 2). Durant el dejuni, la disminució d'insulina i l'increment de glucagó en els nivells sanguinis són capaços de mantenir la glucogen sintasa fosforilada i inactiva. Per altra banda, la glucosa-6-fosfat és un activador al·lostèric de la glucogen sintasa, a més de ser el substrat per a la síntesi de glucogen. De tota manera no es descarta un efecte en l'expressió dels gens claus en la regulació de la síntesi de glucogen mitjançant factors de transcripció específics, els quals podrien estar activats per l'increment de glucosa 6-fosfat, no es pot excloure. D'altra banda, l'expressió del gen quimèric PEPCK/GK permet restablir l'acumulació de glucosa en condicions de dejuni, i indiquen que l'activitat GK és el factor limitant per la síntesi de glucogen en les cèl·lules hepàtiques.

L'enzim L-piruvat quinasa (L-PK) és un dels principals enzims reguladors de la via glucolítica. Quan els ratolins control van ser dejunats l'activitat PK va ser aproximadament d'un 50% de la que es detecta en control alimentats. Per contra, en els transgènics dejunats l'activitat L-PK va ser també més elevada, unes dues vegades més, que en control dejunats i similar als controls alimentats (Taula 2). A més, l'activitat L-PK estava incrementada en els ratolins transgènics alimentats comparats amb els seus controls. Aquests resultats suggereixen que l'increment en glucosa 6-fosfat en els animals dejunats activen la L-PK, i això està d'acord amb articles previs que postulen que el principal efecte de la insulina en l'activació de la L-PK dependent de glucosa és estimular la síntesi de GK.

Table II. Hepatic glucose storage and utilization

	Glucose 6-P (nmol/g liver)	Glycogen (mg/g liver)	Pyruvate Kinase (U/mg prot)	Lactate (μ mol/g liver)
Fed				
Control	226 \pm 20	48 \pm 4	0,22 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02
Tg A	334 \pm 33	93 \pm 7	0,41 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02
Tg B	385 \pm 25	108 \pm 10	0,53 \pm 0,04	0,45 \pm 0,04
Starved				
Control	67 \pm 5	7 \pm 1	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
Tg A	155 \pm 9	31 \pm 3	0,22 \pm 0,01	0,21 \pm 0,02
Tg B	168 \pm 12	33 \pm 3	0,25 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02

Taula 2. Utilització i emmagatzemament de glucosa en el fetge de ratolins transgènics que expressen glucoquinasa. Resultats obtinguts a partir de 18 animals per cada condició. Les determinacions es varen realitzar a partir d'extractes de fetge obtinguts d'animals control i de transgènics, alimentats i dejunats segons es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM.

2.4 EFECTES DE LA SOBREEXPRESSION DE LA GK EN HEPATÒCITS EN CULTIU PRIMARI

L'activació de la L-PK provoca un increment en el seu producte, el piruvat, que pot seguir per la via de degradació oxidativa de la glucosa i entrar en el cicle de l'àcid cítric o bé ser reduït a lactat. Amb la finalitat d'estudiar l'efecte de la sobreexpressió de la glucoquinasa sobre la via glúcòlica, es va estudiar la producció de lactat a partir d'hepatòcits en cultiu primari. Els hepatòcits dels ratolins transgènics van ser cultivats durant 24-h en DMEM sense serum i en presència de glucosa 20 mM i es va detectar un increment de 3 vegades més en la producció de lactat comparat amb hepatòcits dels ratolins control (Figura 2A). En canvi, quan s'incuben amb glucosa 2 mM no es troben diferències significatives en la producció de lactat entre els hepatòcits dels ratolins control i transgènics (Figura 2B), degut a que la concentració de glucosa es molt més

baixa que la Km de la GK (6-12 mM). Aquest increment en la producció de lactat pels hepatòcits dels ratolins transgènics incubats en glucosa 20 mM podria estar relacionat amb el fet de que aquests hepatòcits expressin GK. A més, aquest enzim en presència de glucosa adquireix una conformació més activa degut a la seva cinètica cooperativa amb la glucosa.

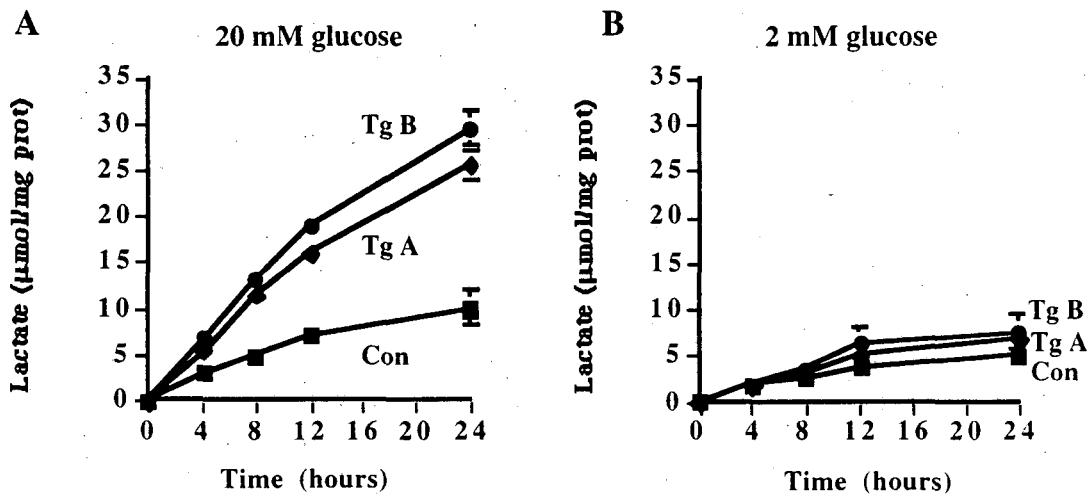


Figura 2. Producció de lactat per hepatòcits d'animals control (○, Con); i transgènics (●, TgB; i ◆, TgA). Hepatòcits en cultiu primari de ratolins alimentats incubats amb DMEM amb 20 mM (A) o 2 mM (B) glucosa. A cada temps indicat es recollia una mostra del medi d'incubació i es determinava la concentració de lactat segons es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són expressats com la mitjana de quatre experiments diferents \pm SEM.

2.5 ANÀLISI DE LA GLUCÈMIA I DE LA INSULINÈMIA

Els canvis en el metabolisme de la glucosa en el fetge dels ratolins transgènics que expressen el gen quimeric PEPCK/GK van ser també reflectits en els paràmetres sèrics. Els ratolins transgènics presentaven una disminució d'un 30% en la concentració de glucosa en sèrum i una reducció del 40% en els nivells de insulina comparant amb els seus ratolins germans no transgènics (Taula 3). Aquests resultats indicaven que l'increment en la activitat GK de fetge era capaç de incrementar la captació de glucosa i com a conseqüència reduir de la glucèmia. La sobreexpressió de la GK en el fetge d'aquests ratolins transgènics mimetitzen una situació de nivells alts d'insulina que comporta un increment en la captació de glucosa del torrent sanguini. Com a resposta a

la reducció de glucosa s'estableix una reducció en la secreció d'insulina per part de les cel·lules β pancreàtiques, que condueix a una disminució en la insulina circulant. De manera similar, es va demostrar que l'expressió en els ratolins transgènics del gen quimèric PEPCK/c-myc provoca un augment en la captació i utilització de la glucosa. En els ratolins transgènics dejunats de c-Myc, es va observar un increment tant en l'expressió com en l'activitat de tots dos enzims, tant de la glucoquinasa com de la piruvat quinasa. Aquests canvis en el metabolisme hepàtic van ser també paral·lels a una reducció important en els nivells sanguinis de glucosa i d'insulina (Taula 3). Aquests resultats són oposats a la situació dels ratolins transgènics que sobreexpressen el gen de la PEPCK en el fetge. Aquests ratolins presenten un increment en la gluconeogènesis, que provoca un elevat increment en la producció de glucosa hepàtica, causant hiperglucèmia i hiperinsulinèmia. Tenint en compte tots aquests resultats obtinguts, es demostra que el metabolisme de la glucosa en el fetge determina de manera significativa els nivells de glucosa i insulina sanguinària tant en els ratolins alimentats com en dejunats i està d'acord amb el paper clau del fetge en l'homeòstasi de la glucosa.

Table 3. Plasma levels of immunoreactive insulin and glucose

	Glucose, mg/dL	Insulin, ng/dL
Fed		
Control	164 ± 12	2,9 ± 0,4
Tg A	112 ± 10	1,7 ± 0,3
Tg B	105 ± 9	1,6 ± 0,3
Starved		
Control	89 ± 8	1,1 ± 0,3
Tg A	68 ± 7	0,6 ± 0,2
Tg B	64 ± 8	0,7 ± 0,3

Taula 3. Concentracions sèriques de glucosa i insulina de ratolins transgènics que expressen el gen quimèric PEPCK/GK. Es va determinar la concentració plasmàtica de glucosa i insulina de 18 animals control i 18 animals transgènics de cada línia alimentats o dejunats 24 h. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM.

2.6 TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

El test de tolerància a la glucosa és una de les proves utilitzades en clínica per al diagnòstic de resistència a la insulina lligada a diabetis insulinoindependent. El fet que els animals transgènics presentaven hipoglucèmia i hipoinsulinèmia suggeria que molt probablement el seu comportament no fos igual al d'un animal control. Al realitzar-se un test de tolerància a la glucosa en ratolins dejunats 24 hores, els ratolins transgènics, tant de la línia TgA com TgB, mostraven una reducció d'un 40% en els nivells de glucosa sanguínia comparant amb els control (Figura 3). L'increment en els nivells de glucosa circulant va ser transitori i gradualment van tornar els nivells basals, en 120 minuts en els ratolins transgènics i en 180 minuts en els control (Figura 3). Aquest increment en la eliminació de la glucosa observada en els ratolins transgènics que sobreexpressen el gen quimeric PEPCK/GK molt probablement sigui conseqüència de l'increment en la captació i utilització de la glucosa per part del fetge.

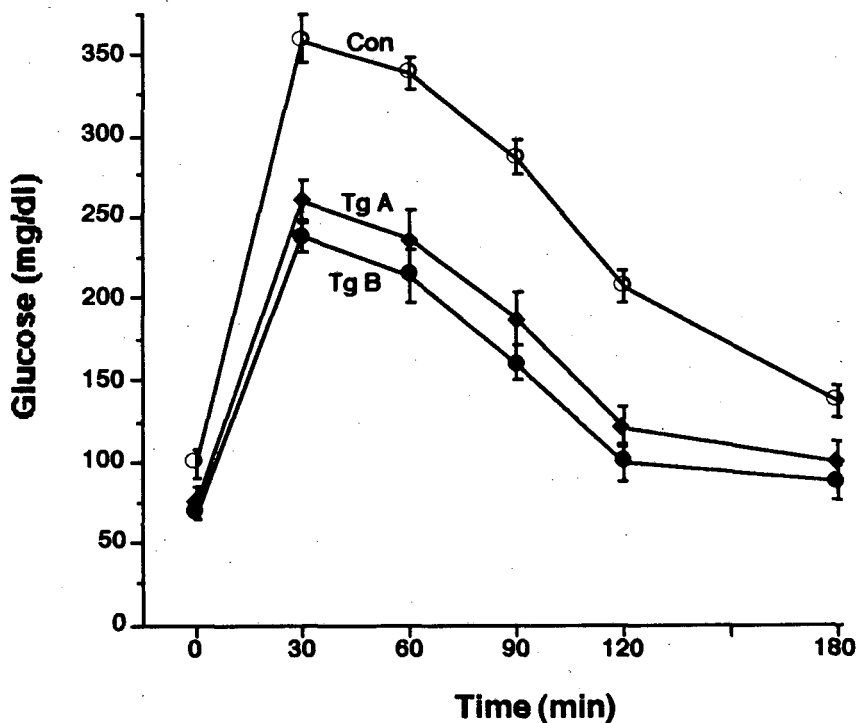


Figura 3. Test de tolerància a la glucosa. Ratolins control (○, Con) i transgènics (◆, TgA i ●, TgB) dejunats 24 h varen ser anestesiats i sotmesos a un test de tolerància a la glucosa. Es va administrar per via intraperitoneal 1mg de glucosa per gram de pes viu i a continuació es varen realitzar determinacions de la concentració de glucosa en sang al llarg del temps. Els resultats estan expressats com la mitjana \pm SEM de 10 ratolins transgènics i 10 ratolins control.

D'aquesta manera, la capacitat metabòlica del fetge podria ser capaç de controlar l'homeòstasi de la glucosa. L'increment en la captació de la glucosa perifèrica en ratolins transgènics que expressen el transportador de glucosa GLUT4 en el múscul esquelètic i/o en el teixit adipós o GLUT1 en el múscul esquelètic també permet augmentar la tolerància a la glucosa *in vivo*. El múscul esquelètic constitueix una gran part de la massa corporal, i ha estat considerat el principal teixit perifèric que es capaç d'eliminar la glucosa de la circulació sanguínia. Així, la captació de glucosa estaria augmentada degut a un increment en els transportadors de glucosa en aquest teixit. Aquest procés és deficient en els pacients amb diabetis tipus 2. En canvi, ratolins deficientes en GLUT4 no s'observa un sever defecte en l'homeòstasi de la glucosa ni desenvolupen diabetis tipus 2. Aquests ratolins deficientes en GLUT4 són capaços de compensar l'absència del transportador de glucosa en múscul esquelètic i en el teixit adipós, sense un increment en el transportador GLUT1, suggerint el paper clau del fetge. Pacients amb diabetis de forma madura que afecta individus joves (MODY) presenten mutacions puntuals heterozigotes en el gen de la GK, que causa una reducció en l'activitat enzimàtica així com una disminució en la secreció d'insulina. Per altra banda, no està clar si l'abnormal metabolisme de la glucosa per part del fetge contribueix a la malaltia MODY. Una disminució de l'activitat GK en les cèl·lules β en ratolins transgènics provoca una disminució en la secreció d'insulina en resposta a la glucosa, però en aquests animals no es troben diferències en la glucosa en dejuni ni en la tolerància a la glucosa. En canvi, la destrucció de la funció de la GK tant en la cèl·lula β com en el fetge dels ratolins transgènics estava associada amb una disminució de la tolerància a la glucosa i l'abnormal metabolisme de la glucosa a fetge. Aquests ratolins desenvolupen un fenotip similar als MODY, el que sembla indicar que aquesta malaltia resulta d'un metabolisme anormal tant en illots com en fetge. Tots aquests resultats obtinguts en els ratolins transgènics que sobreexpressen GK consoliden la hipòtesi que aquest enzim exerceix un paper central en l'homeòstasi de la glucosa *in vivo*.

3. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ CRÒNICA DE LA GK A FETGE

3.1 ESTUDI DE LA TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA A LLARG TERMINI

Per tal de determinar l'efecte de la sobreexpressió crònica de la GK en el fetge es va sotmetre als animals a un test de tolerància a la glucosa al llarg del temps. En animals joves havíem observat que els ratolins transgènics recuperaven els nivells de glucosa basal abans que els controls. Aquest increment en l'eliminació de la glucosa observada en els ratolins transgènics es podia explicar degut a l'augment en la captació i utilització de la glucosa per part del fetge. En animals de tres mesos d'edat s'observa com la línia TgB (línea amb major nombre de còpies) comença a presentar problemes en la recuperació dels nivells de glucosa basal respecte als controls, així com respecte als transgènics de la línia TgA (menor nombre de còpies) Finalment, als sis mesos s'observa com s'ha establert un test de tolerància completament alterat. Els transgènics TgB són incapaços de recuperar els nivells basals de glucosa. El test es va repetir al cap d'un any, obtenint-se els mateixos resultats. Per contra, els transgènics de la línia TgA al presentar un menor nombre de còpies, no modifiquen el seu comportament. Aquesta alteració en el test de tolerància suggereix que els animals transgènics amb més còpies que sobreexpressen GK desenvolupen un procés de resistència a la insulina.

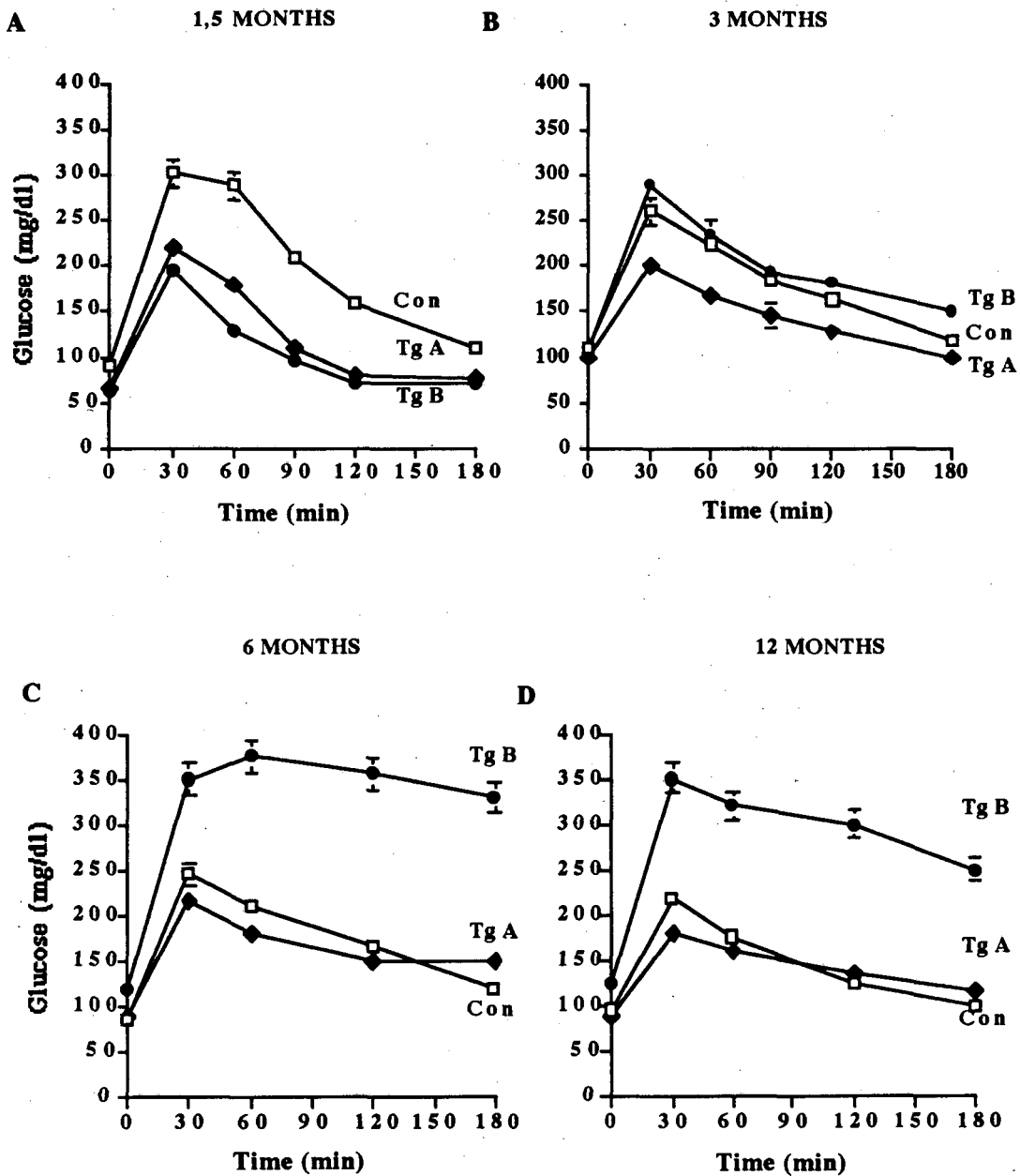


Figura 4. Test de tolerància a la glucosa. Ratolins control (□, Con) i transgènics (◆, TgA i ●, TgB) dejunats 24 h varen ser anestessats i sotmesos a un test de tolerància a la glucosa. Es va administrar per via intraperitoneal 1mg de glucosa per gram de pes viu i a continuació es varen realitzar determinacions de la concentració de glucosa en sang al llarg del temps. Els resultats estan expressats com la mitjana \pm SEM de 10 ratolins transgènics i 10 ratolins control.

3.2. ESTUDI DELS PARÀMETRES SÈRICS EN ANIMALS VELLS

Els resultats dels estudis realitzats en condicions basals (24h de dejuni) es mostren en la taula 1. Sota aquestes condicions hem comparat els valors dels paràmetres sèrics en animals joves versus vells. Els animals transgènics de la línia TgB presenta una suau hiperglucèmia i hiperinsulinèmia quan els animals tenen un any. Aquests animals també presenten un increment en la concentració de triglicèrids circulants (d'un 60 % respecte els controls) així com un increment en els nivells de àcids grassos no esterificats (NEFAs) (d'un 20% més respecte el control). Per contra, els ratolins transgènics amb menor nombre de còpies mostren un fenotip similar als controls.

Taula 4. Paràmetres sèrics en animals vells

	Glucosa (mg/dl)	Insulina (ng/ml)	Triglicèrids (mg/dl)	FFAs (mmol/L)
2 mesos				
Con	89 ± 8	1,1±0,3	86±4	1,44±0,14
TgA	66 ± 8	0,7±0,2	66±5	0,97±0,09
TgB	61 ± 7	0,6±0,2	63±5	0,92±0,10
12 mesos				
Con	88 ± 3	2,8± 0,2	120 ± 2	1,28 ± 0,05
TgA	76 ± 1	2,1 ± 0,2	116 ± 5	1,42 ± 0,02
TgB	102 ± 4	4,3 ± 0,7	191 ± 2	1,49 ± 0,01

Resultats obtinguts a partir de 15 animals per cada condició. Les determinacions es varen realitzar a partir de sèrum d'aquests animals.

3.3. DETERMINACIÓ DE GLUCOSA-6-P I GLUCOGEN EN FETGE D' ANIMALS VELLS

Els resultats obtinguts han estat realitzats amb la línia TgB. En condicions d'alimentació, aquests animals mostren un increment del 40% en la concentració de G-6-P però presenten una disminució de tres vegades en la concentració de glucogen. En condicions de dejuni la quantitat de G-6-P és del doble respecte els controls però presenten els mateixos nivells de glucogen.

Taula 5. Contingut de glucosa-6-P i glucogeno

	Glucosa-6-P (nmol/g fetge)	Glucogen (mg/g fetge)
Alimentat		
Con	472 ± 26	72 ± 7
TgB	661 ± 147	24 ± 3
Dejunat		
Con	41 ± 19	1,61 ± 0,5
TgB	81 ± 19	1,75 ± 0,7

Resultats obtinguts a partir de 15 animals per cada condició. Les determinacions es varen realitzar a partir d'extractes de fetge

3.4. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC DEL FETGE

Estudis histopatològics del fetge dels ratolins transgènics en condicions de dejuni mostren una espectacular acumulació de triglicèrids quan es tenyeixen amb oil red. Aquests resultats també depenen del nombre de còpies del transgen. Així, els animals de la línia TgB mostren més acumulació de triglicèrids respecte als transgènics de la línia TgA. Els controls no es tenyeixen amb oil red perquè no acumulen triglicèrids en fetge. El destí de la glucosa-6-P dins de l'hepatòcit depèn de les necessitats energètiques de l'animal. En períodes postprandials, la glucosa-6-P s'emmagatzema en forma de glucogen que serà utilitzat quan no hi hagi aport extern de sucre. Quan la capacitat d'acumular glucogen s'ha exhaurit, la glucosa es metabolitzada per formar productes glucolítics i lípids. Aquests lípids són transportats en forma de VLDL al teixit adipós per emmagatzemar-se.

**PART II: CONTRARESTACIÓ DEL PROCÉS
DIABETIC PER LA SOBREEXPRESIÓ DE
GLUCOQUINASA EN FETGE D'ANIMALS
TRACTATS AMB ESTREPTOZOTOCINA.
IMPLICACIONS EN LA TERÀPIA DE LA
DIABETIS TIPUS 1.**

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

El fetge presenta un paper clau en el manteniment de la homeostasi de la glucosa. Quan els nivells de glucosa plasmàtica són alts, el fetge capta glucosa i l'emmagatzema en forma de glucogen. Quan s'exhaureix la capacitat d'emmagatzament de glucogen, se sintetitzen àcids grassos (Pilkis i Granner, 1992). El transport i la fosforilació de la glucosa són els primers passos en la utilització de la glucosa. En el fetge, la glucosa es transportada per dos membres de la famílies de transportadors facilitats (Glut), Glut1 i Glut2 (Bell et al, 1993). En animals no diabetics, Glut2 proveeix glucosa als hepatocits a una velocitat que és 600 vegades superior a la velocitat de fosforilació de les hexoquinases, i 100 vegades superior que la velocitat de fosforilació per la glucoquinasa (GK)(Axelrod i Pilch, 1983). Així, la fosforilació de la glucosa per la GK sembla ser la clau en la regulació de la utilització de la glucosa per l'hepatòcit. Aquest enzim, al contrari de les altres hexoquinases, té una elevada Km per la glucosa (5-8 mM) i la seva activitat no és inhibida per concentracions fisiològiques de glucosa-6-fosfat (Iynedijian, 1993; Printz et al, 1993). La regulació de l'activitat GK es deguda principalment a canvis en la transcripció del seu gen. La insulina augmenta la transcripció del gen de la GK de fetge, mentre que el glucagó inhibeix, i a més aquest efecte no és dependent de glucosa. Per contra, l'activació transcripcional dels gens glucolítics i lipogènics en l'hepatòcit requereixen la presència tant d'insulina com de glucosa, que no són actius per si sols (Vaulont i Kahn, 1994; Decaux et al, 1991). El principal paper de la insulina en l'activació dels gens glucolítics sembla que es dona a través de l'estimulació de la síntesi de GK, que provoca un augment en la fosforilació de la glucosa. L'expressió de la GK en cèl.lules d'hepatoma de rata, amb manca en l'expressió del gen de la GK endògena, resulta en una inducció en la captació i metabolització de la glucosa (Valera i Bosch, 1994). S'han localitzat elements regulats per glucosa/carbohidrats en els promotors dels gens que codifiquen per alguns dels enzims de la glucolísi i lipogènesi (Vaulont i Kahn, 1994). L'efecte de la insulina en l'activació dependent de glucosa sobre el promotor de la L-piruvat quinasa en hepatòcits es podria mimetitzar a través d'un vector que expressi GK (Doiron et al, 1994). La manca d'insulina en diabetis de tipus 1 i la insensibilitat a l'hormona i a la seva relativa deficiència en la diabetis de tipus 2 causa un descens en la utilització de glucosa per part del fetge, múscul, i teixit adipós, i un augment en la producció hepàtica de glucosa (Taylor i Agius, 1988; McGarry, 1992). En estat diabetíc, l'expressió del gen de la GK és molt baixa, i el fetge es incapaç de metabolitzar la glucosa sanguínia (Iynedijian, 1993; Printz et al, 1993).

La forma citosòlica de la fosfoenolpiruvat (PEPCK) és un enzim clau en el control de la via gluconeogènica. L'activitat PEPCK està regulada per la velocitat de transcripció del seu gen. El glucagó, via cAMP, incrementen la transcripció del gen de la PEPCK i la insulina fa l'efecte contrari (Liu et al, 1991; O'Brien et al, 1990). Així, l'expressió del gen de la PEPCK està altament induïda durant la diabetis. La transcripció del gen de la PEPCK està suprimida durant el desenvolupament i comença a expressar-se en el moment del naixement (McGrane et al, 1990). Fragments del promotor de la PEPCK d'uns 500 bp poden regular l'expressió de gens quimèrics de la mateixa manera que el gen de la PEPCK endogen en el fetge de ratolins transgènics (McGrane et al, 1990; Short et al, 1992).

S'ha postulat que la hiperglucèmia crònica podria ser la principal responsable en el desenvolupament de les patologies específiques de la diabetis com són les patologies microvasculars de la retina i el glomerul renal, i de les complicacions macrovasculars (Pickup i Williams, 1994). La reducció de la hiperglucèmia, i així el manteniment de la normoglucèmia, és l'objectiu principal en qualsevol tipus de aproximació terapèutica per la diabetis de tipus 1 i de tipus 2. En aquest treball, hem examinat la capacitat del promotor de la PEPCK per dirigir l'expressió del gen de la glucoquinasa en el fetge de ratolins transgènics diabètics. We aimed determinar si el recobriment de l'expressió de la GK en estat diabètic és capaç d'induir la utilització de la glucosa i bloquejar la producció del sucre per part del fetge, i en cas afirmatiu, estudiar la contribució del fetge en la reducció de la hiperglucèmia i d'altres alteracions pròpies de la diabetis.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN EL FETGE D'ANIMALS DIABÈTICS

Amb la finalitat d'estudiar si la sobreexpressió de l'activitat GK era capaç de contrarrestar la hiperglucèmia diabètica, els animals control i transgènics van ser tractats amb estreptozotocina (Stz) i es van analitzar els canvis metabòlics produïts per la sobreexpressió de la glucoquinasa en aquests animals.

Així, es va estudiar l'expressió de GK en el fetge després de induir diabetis amb Stz. En els animals control i transgènics es va detectar mRNA de 2.5 kb que hibrida amb una sonda de cDNA de GK, que resulta de l'expressió del gen de la GK endògena i del transgèn, com a conseqüència del gen quimèric utilitzat (Iynedjian, 1993; Printz et al, 1993). En els fetges dels ratolins diabètics no transgènics no es van detectar transcrits de mRNA de glucoquinasa, mentre que en ratolins transgènics tractats amb Stz expressaven nivells significants de mRNA de glucoquinasa (Figura 1A). Els ratolins transgènics no tractats amb Stz també mostren un increment d'aproximadament dues vegades de mRNA de glucoquinasa comparant amb ratolins control. L'increment en la expressió de glucoquinasa es corresponia amb un increment en l'activació de l'enzim. L'activitat glucoquinasa en el fetge de ratolins transgènics sans va ser del doble, en ambdues línies TgA i TgB, que en els control (Figura 1B). L'activitat de l'enzim en ratolins diabètics era extremadament baixa. En canvi, l'activitat glucoquinasa en els ratolins transgènics diabètics de la línia TgA va ser similar als ratolins control sans mentre que els ratolins diabètics de la línia TgB mostraven fins i tot una activitat glucoquinasa més elevada que els ratolins control sans (Figura 1B). Aquests resultats suggerien que el mRNA de la glucoquinasa era traduït i que la proteïna era estable en un ambient diabètic i també indicaven que mantenint uns certs nivells de mRNA de GK en el fetge dels ratolins transgènics tractats amb Stz era suficient per produir una elevada activitat de l'enzim. Els resultats descrits a continuació corresponen a la línia TgB. Aquesta elecció s'ha fet per ser la línia amb més activitat, encara que el fenotip de l'altra línia va ser idèntic.

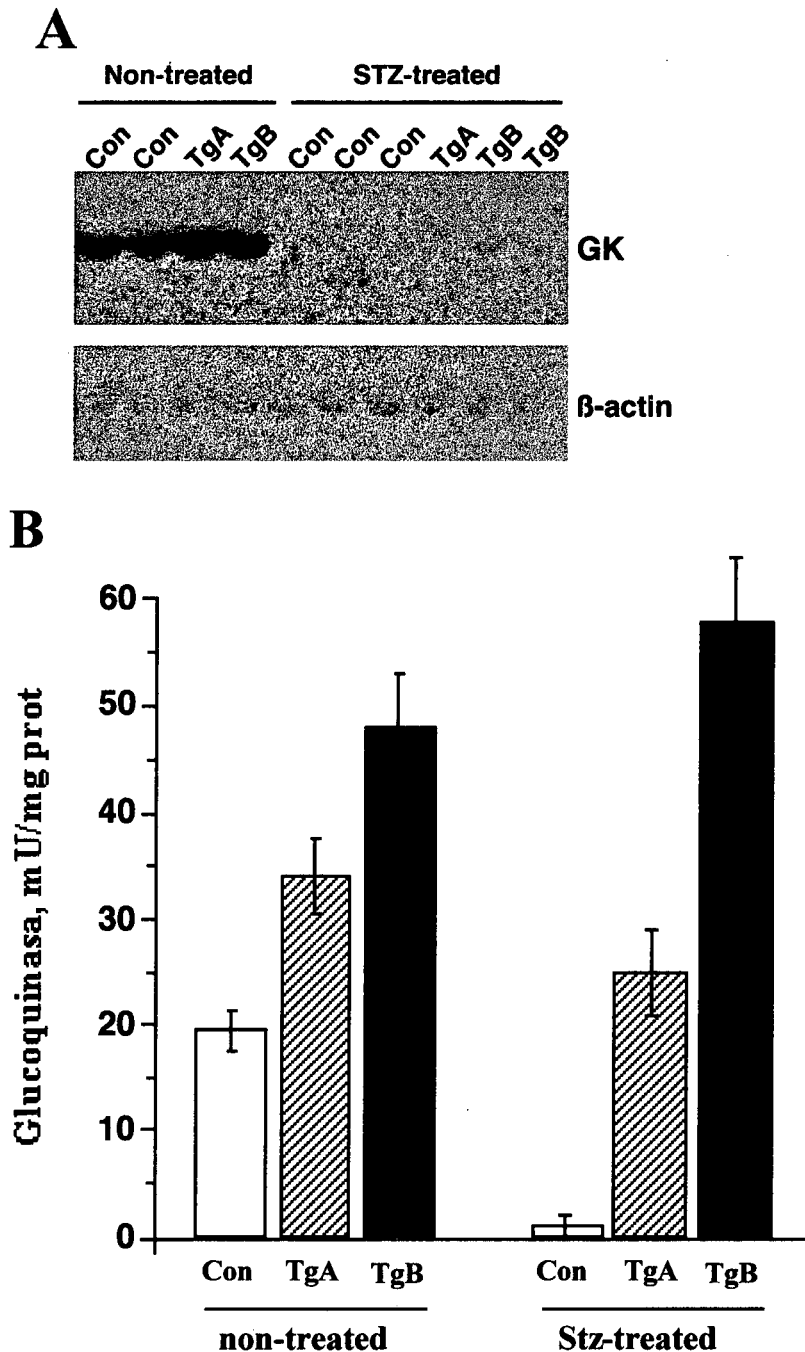


Figura 1 (A) Expressió de glucoquinasa en el fetge de ratolins diabètics. Es va aïllar RNA total de fetge d'animals no tractats amb estreptozotocina control (Con) i transgènics de les línies PEPCK/GK-6 (TgA) i PEPCK/GK-47 (TgB), així com d'animals tractats amb estreptozotocina control (STZ-Con) i transgènics (STZ-TgA i STZ-TgB).

(B) Les determinacions de l'activitat glucoquinasa es varen realitzar a partir d'extractes de fetge obtinguts d'animals control (Con) i transgènics de les línies PEPCK/GK-6 (TgA) i PEPCK/GK-47 (TgB) no tractats i tractats amb estreptozotocina segons es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats estan expressats com la mitjana \pm SEM de 15 ratolins transgènics de cada línia i 15 ratolins control.

2. ESTUDI DEL METABOLISME GLUCÍDIC EN EL FETGE D'ANIMALS DIABÈTICS

2.1 ESTUDI DEL CONTINGUT DE GLUCOSA-6-FOSFAT I GLUCOGEN

El destí de la glucosa-6-P dins de l'hepatòcit depèn de les necessitats energètiques de l'animal. La reducció en l'activitat glucoquinasa en els animals control tractats amb Stz, estava associada amb una disminució d'un 75% en la concentració intracel·lular de glucosa 6-fosfat respecte als control sans. En canvi, ratolins transgènics tractats amb Stz presentaven una concentració elevada d'aquest metabolit, i eren similars als controls sans (Taula 1).

Els animals transgènics que expressen el gen quimèric PEPCK/GK acumulen més glucogen, unes dues vegades més, que els animals control (Taula 1). La glucosa-6-fosfat es un substrate per a la síntesi de glucogen així com un activador al·lostèric de la glucogen sintasa (Larner, 1990). Els ratolins transgènics que expressen el gen quimèric PEPCK/GK acumulen més glucogen (dues vegades) que als ratolins controls (Taula 1). Durant la diabetis, a causa de la manca de insulina i de un augment de glucagó, la glucogen sintasa està fosforilada i inactiva (Roach, 1986; Rodríguez-Gil et al, 1989). Com era d'esperar, en el fetge dels ratolins control diabètics no es detecta glucogen emmagatzemat. En canvi, animals transgènics tractats amb Stz presenten nivells de glucogen similar als animals control sans (Taula 1), probablement, si més no en part, com a conseqüència de l'increment de glucosa-6-P. Així, l'expressió del gen quimèric PEPCK/GK en estat diabètic causa una normalització en l'emmagatzament de la glucosa, indicant que l'activitat glucoquinasa és probablement un pas limitant en la síntesi de glucogen en les cèl·lules hepàtiques. En el nostre grup hem demostrat que les cèl·lules de hepatoma FTO-2B i H4IIE, que no són capaços d'acumular glucogen, al ser infectats amb un vector retroviral amb el gen quimèric PEPCK/GK que expressa GK, acumulen grans quantitats del polisacàrid (Valera i Bosch, 1994)

2.2 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PIRUVATQUINASA I CONTINGUT DE LACTAT

En els ratolins transgènics també es va detectar una inducció de la utilització de glucosa. El principal enzim regulador de la glucòlisi es la piruvat quinasa (L-PK). El gen d'aquest enzim esta regulat a nivell transcripcional, positivament per glucosa i insulina, i negativament per glucagó (Vaulont et al, 1994). Es va detectar una reducció de l'expressió L-PK, així com de l'activitat en els animals control diabètics respecte als control sans. En canvi, en els animals transgènics diabètics es va detectar una elevada concentració tant del missatger com de l'activitat enzimàtica. Aquest increment va ser d'unes 4 vegades més respecte els seus controls i similar als animals sans (Figura 2 i Taula 1).

De manera similar, en hepatòcits en cultiu transfectats amb un vector que expressa glucoquinasa, es detecta l'activació per glucosa del promotor del gen de la L-PK independentment de la insulina (Doiron et al, 1994). L'activació de la L-PK durant la diabetis es correlacionava amb un increment en el contingut intrahepàtic de lactat en els animals transgènics (Taula 1). A més, quan es van cultivar hepatòcits dels ratolins transgènics durant 24-h en DMEM sense sèrum es va detectar un increment en la producció de lactat respecte els ratolins control tractats amb Stz (Figura 3A). La concentració d'aquest metabolit era similar a la detectada en els hepatòcits dels controls no tractats amb Stz.

2.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PEPCK

En un procés diabètic el gen de la PEPCK esta induït. En canvi, els animals transgènics tractats amb Stz mostraven una reducció en l'expressió d'aquest gen respecte als animals control tractats amb Stz (Figura 2). Els canvis produïts en els nivells del mRNA de la PEPCK van ser paral·lels a els canvis en l'activitat de l'enzim. Així, mentre que els animals controls i transgènics alimentats no presentaven diferències significatives en l'activitat PEPCK (Con, 4.9 ± 0.9 mU/mg prot. (n=10) vs. Tg, 4.3 ± 0.3 mU/mg prot. (n=10)), els ratolins transgènics diabètics presentaven una potent reducció en l'activitat PEPCK comparada amb els animals diabètics (Con-Stz, 19.6 ± 1.0 mU/mg prot. (n=8) vs. Tg-Stz-, 5.9 ± 0.8 mU/mg prot. (n=8)).

Table 1. Glucose storage and utilization

	non-treated		STZ-treated	
	Con	Tg	Con	Tg
Glucose 6-P (nmol/g liver)	215 ± 15	337 ± 21	56 ± 12	230 ± 26
Glycogen (mg/g liver)	44 ± 5	98 ± 9	4 ± 2	49 ± 6
Pyruvate kinase (U/mg prot)	0,24 ± 0,02	0,53 ± 0,06	0,15 ± 0,03	0,59 ± 0,08
Lactate (μmol/g liver)	0,23 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,25 ± 0,4

Taula 1. Utilització i emmagatzemament de glucosa en el fetge de ratolins diabètics que expressen glucoquinasa. Les determinacions es varen realitzar a partir d'extractes de fetge obtinguts d'animals control (Con) i transgènics (Tg) no tractats i tractats amb estreptozotocina es descriu a Materials i Mètodes i els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM de 12 animals diferents en cada grup.

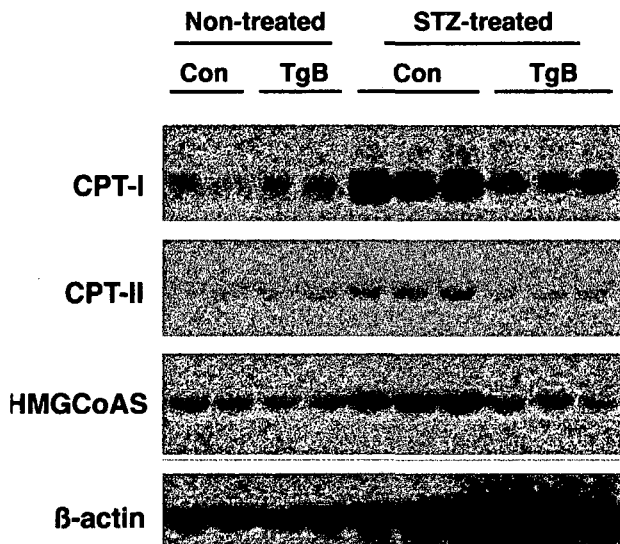
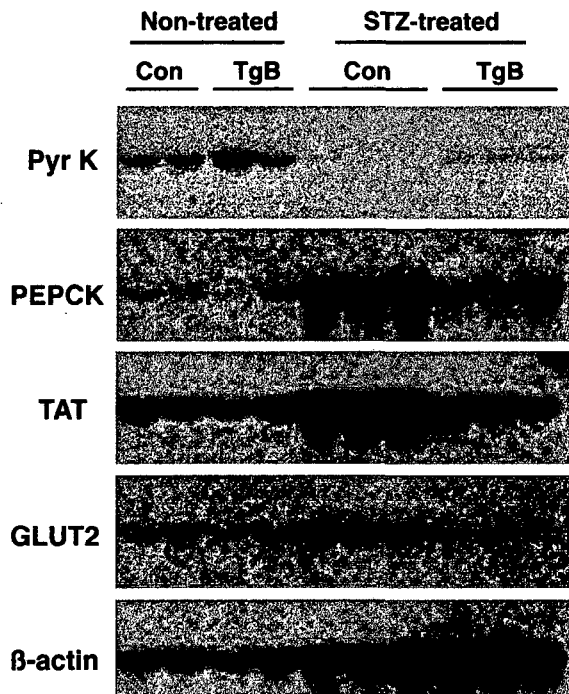


Figura 2. Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió dels gens clau en la regulació de la glucosa i el metabolisme dels cossos cetònics en el fetge d'animals transgènics que expressen glucoquinasa. Es va aïllar RNA total de fetge d'animals control (Con) i transgènics (Tg) tractats i no tractats amb estreptozotocina. Es varen hibridar amb les sondes específiques de la L-piruvat quinasa (Pyr K), P-enolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK), tirosina aminotransferasa (TAT), transportador de glucosa Glut2 2 (GLUT2), carnitina palmitoiltransferasa I i II (CPT-I i CPT-II) i HMG-CoA sintasa mitocondrial (HMGCoAS).

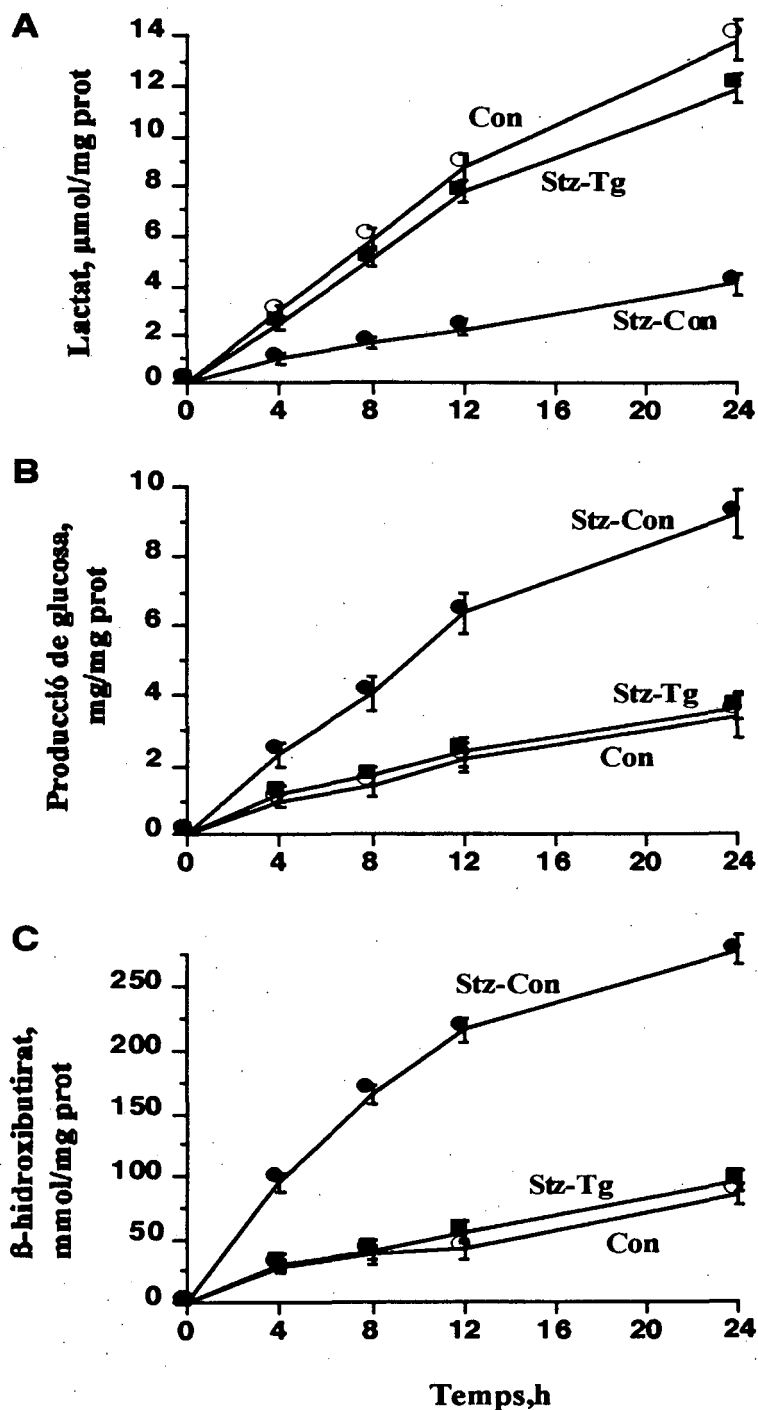


Figura 3. Producció de lactat, glucosa i cossos cetònics per hepatòcits d'animals diabètics que expressen glucoquinasa. Per la producció de lactat (A), hepatòcits en cultiu primari d'animals control alimentats (Con; ○) i control diabètics (●) i transgènics diabètics (Tg; ■) varen ser incubats amb DMEM amb 25 mM glucosa. Per la determinació de glucosa (B) i de β-hidroxibutirat (C) hepatòcits en cultiu primari varen ser incubats amb DMEM sense glucosa suplementat amb 16mM lacta i 4 mM piruvat. A cada temps indicat es recollia una mostra del medi d'incubació i es determinava la concentració de cada metabolit segons es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són expressats com la mitjana de tres experiments diferents ± SEM.

S'ha descrit en hepatòcits en cultiu i en cèl.lules FAO d'hepatoma, que la glucosa redueix la taxa de transcripció del gen de la PEPCK (Kahn et al, 1989; Meyer et al, 1991). En aquestes cèl.lules, quan s'incrementa la concentració de glucosa, augmenta la velocitat de captació i utilització de la glucosa. En rates diabètiques, l'administració de glucosa també disminueix els nivells de mRNA de la PEPCK (Meyer et al, 1991). L'expressió del gen de la tirosina aminotransferasa, un altre enzim implicat en la gluconeogènesi (Hashimoto et al, 1984) estava també normalitzada en el fetge dels animals transgènics diabètics respecte els animals control (Figura 2). D'acord amb aquests resultats, la producció de glucosa a partir de precursors gluconeogènics per hepatòcits en cultiu primari de ratolins transgènics diabètics va ser inferior a la dels seus controls i similar als controls no tractats (Figura 3B). Aquesta disminució per part del fetge en la producció de glucosa estava també correlacionada amb una disminució dels nivells de mRNA del transportador de glucosa GLUT2 (Figura 2), que estaven incrementats en el fetge dels ratolins diabètics com ha estat ja descrit (Oka et al, 1990). No es van observar diferències en l'expressió de GLUT1 entre animals control i transgènics en les mateixes condicions (Resultats no mostrats). Aquests resultats són similars als ja descrits en fetges de rates diabètiques tractades amb vanadat (Valera et al, 1990). En canvi, els animals transgènics tractats amb Stz que expressen el gen quimeric PEPCK/GK generaven un senyal que era capaç de bloquejar la gluconeogènesi en absència d'insulina i vèncer l'efecte del glucagó. Aquests resultats suggerien que l'augment en la concentració de glucosa 6-fosfat en el fetge podria induir a un mecanisme en comú que incrementés l'expressió dels gens claus en la utilització de la glucosa i disminuís l'expressió d'aquells involucrats en la producció de glucosa. Encara que altres mecanismes no poden ser descartats. Aquests efectes en la regulació per glucosa 6-fosfat podrien estar mediat per factor/s de transcripció tot i que no han estat descrit fins ara.

3. ESTUDI DEL METABOLISME LIPÍDIC I CETOGÈNIC EN EL FETGE DE RATOLINS TRANSGÈNICS

La inducció de la cetogènesi es una característica comú en pacients amb diabetis tipus 1 no tractats (Taylor i Agius, 1988; McGarry, 1992). La β -oxidació dels àcids grassos lliures en el mitocondri s'inicia amb l'acció seqüencial de dos enzims units a la membrana, carnitina palmitoiltransferasa I i II (CPT I i CPT II) (McGarry i Foster, 1980; Woeltje et al, 1990; Esser et al, 1993). Aquests enzims, responsables de l'entrada

de acetil-CoA al mitocondri, i l'enzim regulador de la via dels cossos cetònics 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMG-CoA sintasa) mitocondrial (Valera et al, 1994), estan considerats els responsables del control de la cetogènesi hepàtica. L'activitat d'aquests enzims està incrementada durant la diabetis. També s'ha descrit que cAMP, FFA i diabetis indueix l'expressió del gen de la HMG-CoA sintasa, mentre que la insulina l'inhibeix (Valera et al, 1990; Casals et al, 1992). No es van trobar diferències significatives entre animals control i transgènics en l'expressió dels gens d'aquests enzims. En el fetge dels animals diabètics, la concentració de mRNA de CPT I, CPT II i HMG-CoA sintasa estava incrementada. En canvi, els transgènics diabètics mostraven valors similars als ratolins control no tractats (Figura 2). La reducció d'aquests enzims es corresponia amb una disminució en la producció de cossos cetònics en hepatòcits de ratolins transgènics diabètics. Aquests hepatòcits cultivats en presència de precursors gluconeogènics es comparaven amb els ratolins control diabètics (Figura 3C). La concentració de cossos cetònics en el medi d'incubació dels animals transgènics diabètics era similar a la concentració que presentaven els animals control sans. Aquests resultats indicaven que la cetogènesi estava bloquejada en els ratolins transgènics diabètics que expressen el gen químeric PEPCK/GK. Els resultats obtinguts en aquests animals suggerien que l'activació de la glucoquinasa durant la diabetis, indueix a mecanisme/s que coordinadament bloqueixen l'expressió dels gens clau de la cetogènesi en absència d'insulina. Aquest mecanisme podria ser el mateix que controla els gens involucrats en la gluconeogènesi, ja que aquests dos mecanismes estan activats en el fetge diabètic.

4. ESTUDI DELS PARÀMETRES SÈRICS EN RATOLINS DIABÈTICS

Els canvis en el metabolisme hepàtic van ésser associats amb la normalització dels paràmetres sèrics alterats durant la diabetis. Així, els animals transgènics diabètics presentaven una dramàtica reducció de la hiperglucèmia (Taula 2), mentre que els ratolins control presentaven elevades concentracions de glucosa en sang. Tots els ratolins tractats presentaven nivells molt baixos d'insulina. A més, els animals transgènics sans presentaven una disminució d'un 20% en la concentració de glucosa en sèrum així com una reducció del 40% en els nivells d'insulina respecte als animals control (Taula 2). Això indicava que el metabolisme de la glucosa a fetge determina els nivells de glucosa i insulina en sang. Aquests resultats eren conseqüents amb el paper clau del fetge en la homeostasi de la glucosa en tot l'organisme. A més a més, el bloqueig de l'expressió dels gens CPT I, CPT II i HMG-CoA sintasa i la producció de cossos cetònics estaria

d'acord amb la concentració en sèrum β -hidroxibutirat. En el cas dels animals transgènics diabètics estava normalitzats respecte als ratolins diabètics.

L'expressió del gen quimèric PEPCK/GK també condueix a una normalització dels triglicèrids circulants així com dels àcids grassos lliures, que estan marcadament incrementats durant la diabetis (Taula 2). Aquests resultats indicaven que el fet de que el fetge fos capaç de captar glucosa era suficient per normalitzar la glucosa, els lípids i el metabolisme dels cossos cetònics. Per últim, i com era d'esperar, els animals control diabètics perdien pes corporal (una reducció del 25% després de quinze dies del tractament amb estreptozotocina, des de 21.4 ± 0.5 g a 15.7 ± 0.8 g ($n=25$)). En canvi, la normalització del metabolisme hepàtic, així com dels paràmetres sèrics en els animals transgènics diabètics venia acompanyat per un manteniment en el pes corporal (des de 20.3 ± 0.6 g a 21.1 ± 0.9 g ($n=25$)).

Table 2. Serum parameters

	non-treated		Stz-treated	
	Con	Tg	Con	Tg
Glucose (mg/dL)	207 \pm 11	148 \pm 9	> 800	265 \pm 14
Insulin (ng/mL)	2,7 \pm 0,3	1,5 \pm 0,1	< 0,2	< 0,2
β -OH-butyrate (mmol/L)	0,37 \pm 0,06	0,30 \pm 0,07	2,94 \pm 0,3	0,49 \pm 0,12
Triglycerides (mg/dL)	129 \pm 15	154 \pm 12	365 \pm 28	181 \pm 15
FFAs (mmol/L)	0,98 \pm 0,1	0,78 \pm 0,1	1,95 \pm 0,2	0,83 \pm 0,1

Taula 2. Paràmetres sèrics en animals transgènics que expressen el gen quimèric PEPCK/GK Paràmetres sèrics d'animals control (Con) i transgènics (Tg) tractats i no tractats amb estreptozotocina streptozotocin-treated (STZ)varen ser determinats segons es descriu a Materials i Mètodes Els resultats estan expressats com la mitjana \pm SEM de 15 ratolins transgènics i 15 ratolins control.

The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), dissenyada per estudiar la hipotesi de que les complicacions de la diabetis mellitus esta relacionada amb un augment en la concentració plasmatica de glucosa, han demostrat que una terapia intensiva amb insulina pot retardar l'aparició i la seva posterior progressió de les retinopaties, nefropaties i neuropaties en pacients amb IDDM. Pacients amb NIDDM no van ser estudiats en DCCT. La millora en el control de la glucèmia podria reduir de forma considerable les complicacions macrovasculars en pacients amb NIDDM. Una contraindicació de l'us intensiu de la insulina es la conseqüent aparició de complicacions macrovasculars, la primera causa de morbiditat i mortalitat en pacients que pateixen aquesta malaltia (Pickup i Williams, 1994). La hiperinsulinèmia i la resistència a la insulina, molt comú en pacients amb NIDDM, estan associades amb un increment en el risc de patir hipertensió, malalties relacionades amb arteries coronaries, i infart, augmentant la possibilitat que l'insulina per si mateixa provoqui accions aterogèniques. D'altra banda, l'hiperglucèmia tant en la IDDM com en la NIDDM pot reduir-se incrementant la captació de glucosa per part del fetge i els teixits perifèrics. Els nostres resultats suggereixen que l'expressió de la glucoquinasa en el fetge durant la diabetis podria ser una aproximació útil per el tractament d'aquesta malaltia, reduint no sols l'hiperglucèmia diabètica sinó també la cetoacidosi.

**PART III: SOBREEXPRESIÓ DE LA
GLUCOQUINASA EN MÚSCUL ESQUELÈTIC**

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

La hiperglucèmia és la característica més comú de la diabetis mellitus. L'absència d'insulina en la diabetis de tipus 1 (IDDM) i la insensibilitat a la insulina i la relativa deficiència de l'hormona en la diabetis tipus 2 causa una disminució en la utilització de glucosa pel fetge, múscul i teixit adipós, i un augment en la producció de glucosa hepàtica

S'ha postulat que la hiperglucèmia crònica podria ser la principal responsable en el desenvolupament de les patologies específiques de la diabetis com són les patologies microvasculars de la retina i el glomerul renal, i de les complicacions neurològiques i macrovasculars. La reducció de la hiperglucèmia, i així el manteniment de la normoglucèmia, és l'objectiu principal en qualsevol tipus de aproximació terapèutica per la diabetis de tipus 1 i de tipus 2. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) ha demostrat que una terapia intensiva amb insulina és capaç de enrederir l'aparició i una progressió més lenta de les retinopaties, nefropaties, i neuropaties en la diabetis de tipus 1. En el cas de la diabetis de tipus 2 no es va estudiar en la DCCT, però la millora en el control de la glucèmia podria reduir potencialment les complicacions microvasculars d'aquests pacients. Un dels problemes de l'ús de una terapia intensiva amb insulina en la diabetis de tipus 2 és que es podria exacerbar les complicacions macrovasculars, la principal causa de morbiditat i mortalitat en aquesta malaltia.

L'hiperinsulinèmia i la resistència a la insulina, ambdues molt comuns en pacients diabètics de tipus 2, estan associades amb un augment en el risc de patir hipertensió, malalties de la arteria coronària, infart, i un increment en la possibilitat de que la insulina per si mateixa tingui accions aterogèniques. Per contra, la hiperglucèmia diabètica tant de tipus 1 com de tipus 2 es podria reduir incrementant la captació de glucosa pel fetge i els teixits perifèrics.

El múscul esquelètic constitueix aproximadament un 40 % de la massa corporal i s'ha descrit que la contribució en l'eliminació de glucosa després d'una ingesta d'aliments és d'un 75 %. El múscul esquelètic capta glucosa per difusió facilitada de manera tant dependent com independent d'insulina. A més, s'ha demostrat que expressa nivells relativament elevats de Glut4 (responsable del transport de glucosa estimulat per

insulina) i nivells baixos de Glut1 (localitzat en la membrana plasmàtica i responsable de la captació basal de glucosa independent d'insulina). La gran rapidesa en la conversió de la glucosa a glucosa-6 fosfat, reacció catalitzada per membres de la família de les hexoquinases, manté els nivells de glucosa molt baixos assegurant d'aquesta manera que la glucosa entri en la cèl.lula.

Les hexoquinases I i II (HKI i HKII) són els isoenzims predominants en el múscul esquelètic. L'HKI s'expressa de forma constitutiva i ubiqua, en canvi l'HKII és la isoforma estimulada per insulina específica de múscul i teixit adipós. A més a més, Glut4 i HKII contitueixen el primer pas en la utilització de glucosa estimulada per insulina, mentre que Glut1 juntament amb l'HKI són considerats els responsables de la captació de la glucosa basal. Sota condicions basals, el Glut4 es troba localitzat principalment en vesícules intracel.lulars i es transloca a la membrana cel.lular en resposta a insulina. Aquesta translocació es postula que és el primer mecanisme pel qual la insulina estimula la captació de glucosa. La insulina també indueix la transcripció del gen de la HKII, i disminueixen els nivells de mRNA i l'activitat de l'enzim quan els nivells d'insulina són baixos o quan el senyal de l'hormona està alterat.

S'ha demostrat que un increment en els transportadors de glucosa en el múscul esquelètic d'animals transgènics que sobreexpressen Glut1 o Glut4 provoquen un augment en la utilització de la glucosa i en l'emmagatzematge de glucogen i una disminució en la glucèmia i en la insulina plasmàtica. Alguns d'aquests estudis suggereixen que la fosforilació de la glucosa podria ser el pas regulador en la utilització de glucosa. El transport de glucosa en el múscul en resposta a euglicèmia hiperinsulinèmia està fortament alterat en pacients amb diabetis de tipus 2. En canvi, la fosforilació intracel.lular de glucosa està alterada i com a conseqüència la glucosa lliure intracel.lular augmenta. Això indica que mentre que el transport i la fosforilació de la glucosa són resistent a l'acció de la insulina, una alteració en la fosforilació de la glucosa molt probablement és el pas limitant en l'acció de la insulina. D'altra banda, el tractament amb insulina en múscul cardíac de rata i en miocits aïllats de rata causen una acumulació de la glucosa lliure intracel.lular, el que demostra que la fosforilació de la glucosa està saturada. En el múscul esquelètic de ratolins transgènics que sobreexpressen Glut1 s'observa també una acumulació de la glucosa lliure intracel.lular, demostrant que la fosforilació de la glucosa està saturada amb un augment del fluxe de glucosa cap als teixits. La sobreexpressió de l'HKII especialment en múscul esquelètic de ratolins

transgènics dona lloc a un augment modest en la capacitat de captació de glucosa a nivell individual del múscul esquelètic. En canvi, no es va detectar un efecte en la tolerància a la glucosa o a l'acció de la insulina. A més, s'ha demostrat recentment que la sobreexpressió de Glut4 i HKII en ratolins transgènics no hi ha un increment en la utilització de glucosa basal o estimulada per insulina *in vivo* comparant amb la sobreexpressió de Glut4. A més, l'adició de HKII a la sobreexpressió de Glut4 no és suficient per tal de millorar la tolerància a la glucosa o a l'acció de la insulina.

Part de la limitació en el fluxe de glucosa imposada per l'HKII podria ser deguda a la inhibició per feedback de l'enzim pel seu producte, la glucosa-6-fosfat. Al contrari que l'HKII, la glucoquinasa (GK) de fetge té una elevada Km per la glucosa i no s'inhibeix per concentracions fisiològiques de glucosa-6-fosfat. La regulació de l'activitat GK es deguda principalment a canvis en la transcripció del seu gen. La insulina augmenta, mentre que el glucagó inhibeix, la transcripció del gen de la GK de fetge. La fosforilació de la glucosa per la GK es clau en la regulació en la utilització de glucosa pels hepatocits. Nosaltres varem demostrar que la sobreexpressió de GK en el fetge de ratolins transgènics causa un increment en l'activitat L-piruvat quinasa, indicant *in vivo* que l'activació de la GK pot induir la glucolisi i la síntesi de glucogen. Aquest canvis en el metabolisme de la glucosa permeten una reducció en la glucosa sanguínia i en la concentració d'insulina. En estat diabètic, l'expressió del gen de la GK i la seva activitat són molt baixes, i per això el fetge es incapaç de metabolitzar la glucosa sanguínia. En canvi, el rescat en l'expressió de GK en el fetge de ratolins diabètics impedeix les alteracions metabòliques i causa una normalització dels nivells de glucosa sanguínia.

Per tal d'incrementar la fosforilació de la glucosa i evitar l'inhibició per feedback de l'activitat HK per glucosa-6-fosfat, l'enzim GK de fetge podria ser expressat en aquest teixit. En aquest treball, volem determinar si l'increment en la fosforilació de la glucosa podria provocar un augment en la captació i utilització del sucre. Amb aquest fi, hem generat ratolins transgènics que expressen GK en múscul esquelètic sota el control del promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC): Aquests ratolins demostren que la presència de activitat GK en el múscul esquelètic provoca un augment en la concentració intracel·lular de glucosa-6-fosfat i una reducció en els nivells de glucosa sanguínia, indicant que l'expressió de GK pot causar un augment en la captació de la glucosa sanguínia pel múscul. Aquests resultats en ratolins transgènics suggereixen que

l'expressió de GK en múscul podria ser utilitzat com una aproximació de terapia genica per tal de reduir la hiperglucèmia durant la diabetis.

Gran part de la glucosa que entra en les fibres musculars en resposta a la insulina es convertida en glucogen. La síntesi de glucogen està realment alterada en diabetis tipus 2 i en individus resistents a l'insulina amb una tolerància a la glucosa normal predisposats a desenvolupar diabetis tipus 2

RESULTATS I DISCUSSIÓ

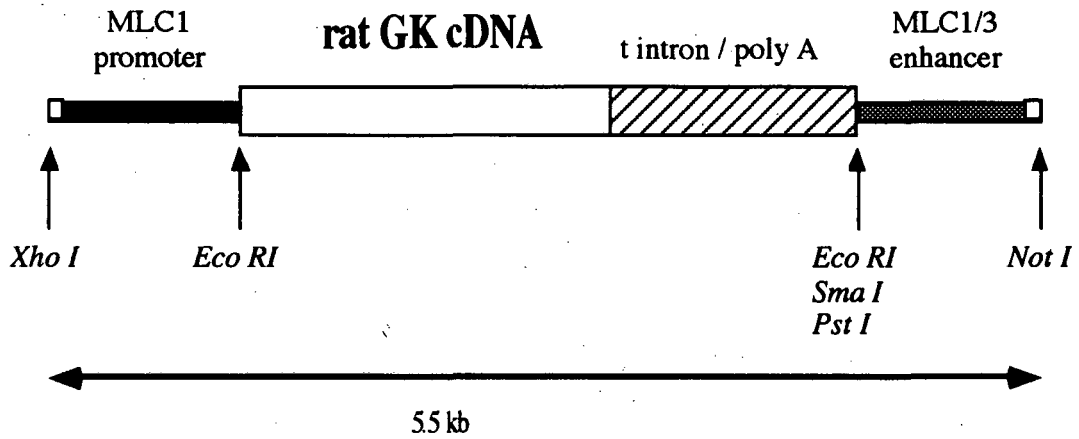
1. OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN GLUCOQUINASA EN MÚSCUL

Amb la finalitat d'estudiar els efectes de l'expressió de la glucoquinasa en cèl·lules musculars, es van obtenir ratolins transgènics que expressaven el cDNA de la glucoquinasa dirigit pel promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC)

1.1. CONSTRUCCIÓ DEL GEN QUIMÈRIC MLC/GK

El gen quimèric utilitzat en aquest treball estava format pel promotor del gen de la cadena lleugera de la miosina (MLC) de rata, i pel cDNA de rata de la glucoquinasa (GK). El fragment del cDNA de la glucoquinasa contenia la seqüència sensera codificant i el senyal de poliadenilació.

Es va fusionar el cDNA de la GK al fragment de 1.5 Kb del promotor del MLC1, incloent-hi tant el *cap site* com 105pb de seqüència no codificant unida a l'extrem 5' del cDNA de la GK. Per tal d'augmentar l'estabilitat del RNA missatger del transgen es va introduir en l'extrem 3' del cDNA de GK un fragment de 0.8Kb que contenia un petit intró i el senyal de poliadenilació de l'antigen T SV40. Finalment, per tal d'assegurar uns elevats nivells d'expressió en el múscul esquelètic, es va introduir un fragment *SphI/HdIII* genòmic de 0.9Kb del gen MLC1/3 que contenia una seqüència "enhancer" o activadora específica de múscul. El plasmidi final va ser designat pMLC1/GK.



1. Representació esquemàtica del gen quimèric MLC/GK. El fragment de 5.5Kb *Xho I-Not I* que contenia el gen quimeric complet es va microinjectar en el pronucli masculí d'embrions de ratolí.

1.2. GENERACIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS

El gen quimèric MLC/GK va ser microinjectat en oòcits fecundats i es varen obtenir cinc línies fundadores que havien integrat el transgen en el seu genoma. En els experiments realitzats al llarg d'aquests estudis, es van utilitzar ratolins de la F1 i F2 de dues línies de transgènics. Anàlisi per Southern blot demostraven la presència de cDNA de GK. Es va observar que dues d'aquestes línies MLC/GK1 i MLC/GK2, expressaven GK funcional en el múscul esquelètic. En tots els estudis es van utilitzar com a ratolins control els germans de la mateixa camada dels transgènics.

A partir de les línies de transgènics establertes, es va estudiar els efectes de la expressió de glucoquinasa en múscul. En primer lloc, es va estudiar l'expressió del gen quimèric així com l'activitat enzimàtica. També es va analitzar el metabolisme glucídic en l'animal sencer. Es va determinar la concentració plasmàtica de glucosa i insulina, així com un estudi del comportament dels animals en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa *in vivo*.

1.3 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN QUIMÈRIC MLC/GK

Per determinar l'expressió del transgen es va obtenir RNA total de múscul de ratolins control i transgènics, mantinguts en condicions normals d'alimentació o dejunats 24 hores. L'estudi de l'expressió del gen de la GK es va realitzar mitjançant anàlisi de Northern blot.

En el múscul esquelètic dels animals transgènics es va detectar un transcrit de 2.5 Kb que hibrida amb una sonda de cDNA de GK com a resultat de l'expressió del transgen (Figura 2). Per contra, en els animals control no es van detectar transcrits de GK. Aquests nivells de mRNA de GK detectats en el múscul eren quatre vegades superior als nivells detectats en fetge. Aquest resultat ens indicava que existia transcripció del gen quimèric.

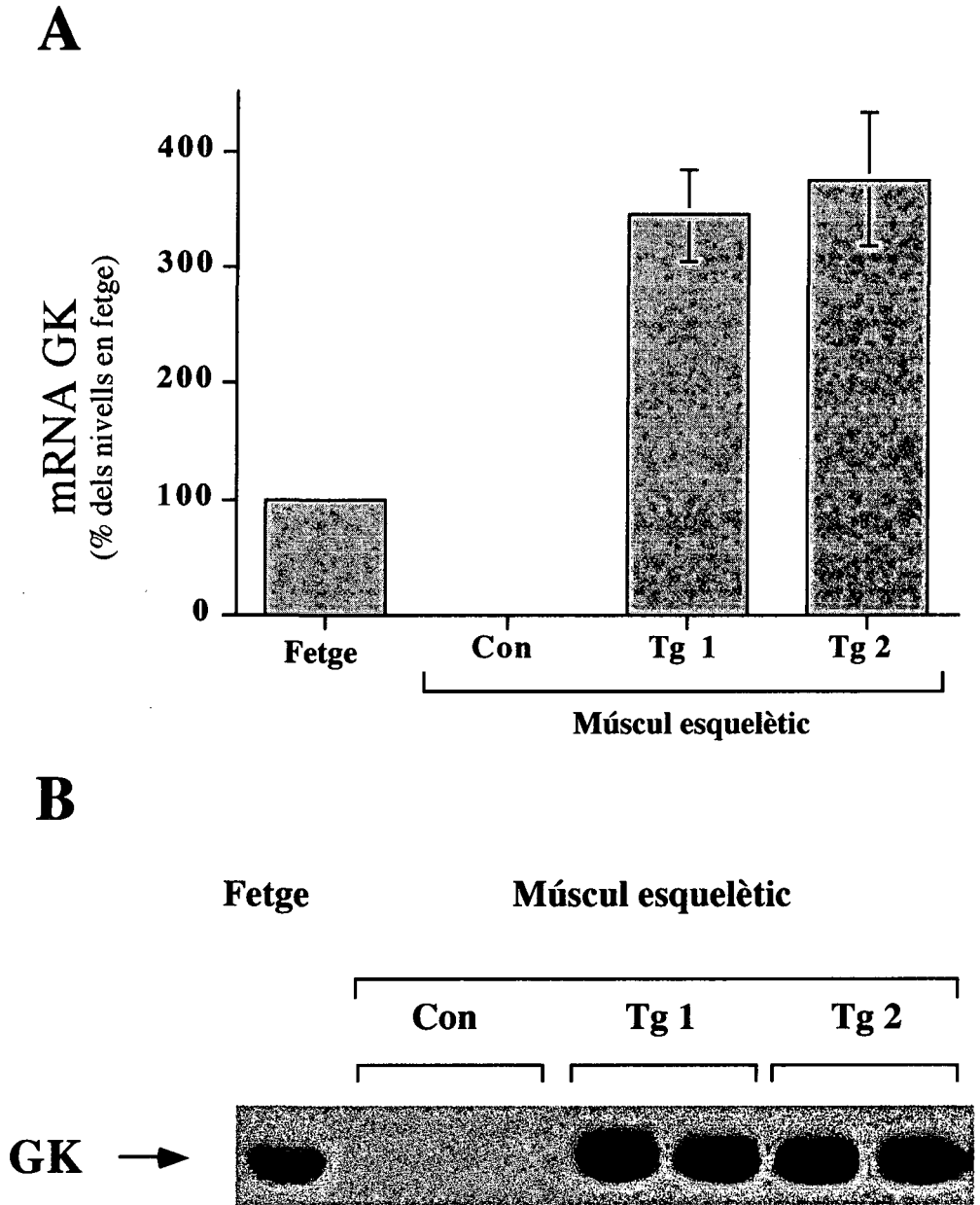


Figura 2. Expressió del transgèn en múscul esquelètic. Anàlisi per Northern blot dels nivells d'expressió del gen de GK en múscul. **(A)** Anàlisi densitometric d'autoradigrafies. Animals control (Con), Animals transgènics de les línies MLC/GK1 (Tg 1) i MLC/GK2 (Tg 2). Els resultats de la grafica s'expressen com unitats arbitràries de densitat òptica, representat com a 100 % els nivells de mRNA de GK de fetge. **(B)** L'expressió del gen de la GK es va analitzar per Northern blot. Es va aïllar RNA total de múscul d'animals control (Con) i animals transgènics de les línies MLC/GK1 (Tg 1) i MLC/GK2 (Tg 2). Per tal de poder comparar es va aïllar RNA total de fetge d'animals control. Es va hibridar amb una sonda de cDNA de GK de rata.

1.4. ANÀLISI DE LA PROTEÏNA GLUCOQUINASA

Un cop comprovat que el transgèn s'expressava, es va determinar la presència de proteïna GK per verificar que l'expressió en el múscul dels ratolins transgènics es traduïa a proteïna. Per això, es va realitzar anàlisi per Western blot d'extractes proteïcs de múscul (Figura 2B). Es va poder observar que els nivells detectats de proteïna GK en el múscul dels animals transgènics eren similars als que es detectaven en fetge. La quantitat de proteïna GK detectada en el múscul no es corresponia amb els nivells de mRNA. Aquests resultats indicaven que el mRNA de GK era traduït i que la proteïna era estable en un ambient ectòpic com és el teixit muscular.

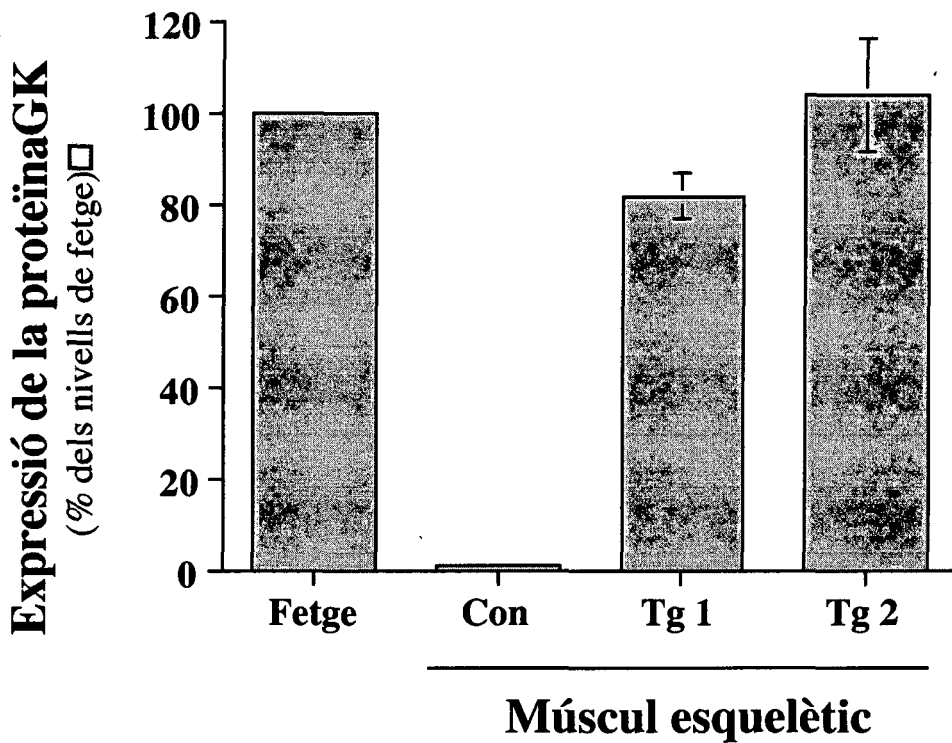
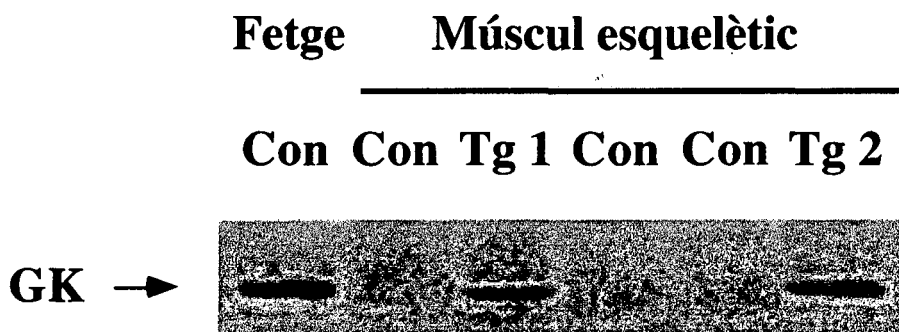
A**B**

Figura 3. Anàlisi per Western blot de la quantitat de proteïna GK en múscul esquelètic. (A) Anàlisi densitometric de proteïna GK Els resultats de la grafica s'expressen com a unitats arbitràries de densitat òptica representat com a 100 % els nivells de mRNA de GK de fetge (B) Anàlisi per immunodetecció de la proteïna GK en múscul esquelètic. Els extractes protèics es van obtenir a partir de múscul esquelètic de les potes de darrera d'animals mascles control (Con) i animals transgènics de les línies MLC/GK1 (Tg 1) i MLC/GK2 (Tg 2) segons es descriu en Materials i Mètodes. Les membranes es van incubar amb un anticòs policlonal contra GK.

2. ESTUDI DEL METABOLISME GLUCIDIC EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC

Per tal de comprovar si l'expressió de la GK en múscul estava alterant el metabolisme glucidic, es va determinar l'activitat GK així com el contingut muscular de diferents metabolits intermediaris del metabolisme del sucre. Les anàlisis es van realitzar en ratolins control i transgènics que van ser anestesiats amb pentobarbital i les mostres de múscul van ser rapidament congelades en nitrogen líquid.

2.1. ACTIVITAT GLUCOQUINASA, CONTINGUT DE GLUCOSA-6-FOSFAT I GLUCOGEN

Es va detectar expressió funcional de la proteïna ectòpica en mostres de múscul esquelètic de ratolins transgènics (Taula 1). En canvi, aquesta activitat no es va veure reflectida en un increment en l'activitat hexoquinasa total. No es van detectar diferències en l'activitat total fosforiladora de glucosa en extractes de múscul d'animals transgènics respecte als control. Tot i així, es van detectar nivells superiors de glucosa-6-fosfat (Figura 4A) i de glucogen (Figura 4B) en el múscul esquelètic dels animals transgènics MLC/GK. Els valors de glucosa-6-fosfat en el múscul esquelètic dels ratolins transgènics de les línies MLC/GK1 i MLC/GK2 eren 3 i 4 vegades superiors en relació als controls germans respectivament.

L'augment en els nivells de glucosa-6-fosfat observats en els animals MLC/GK suporten la idea de que un increment en la fosforilació de la glucosa es induïda per l'expressió de GK en múscul.

Taula 1 - Activitat glucoquinasa en múscul de ratolins transgènics MLC/GK.

	Glucoquinasa de fetge (mU/mg prot)	Glucoquinasa de múscul (mU/mg prot)	Hexoquinasa de múscul (mU/mg prot)
Con	21.5 ± 2.1	No detectada	55.7 ± 1.9
Tg 1	21.1 ± 1.8	7 ± 0.9	54.2 ± 2.6
Tg 7	20.8 ± 2.2	12 ± 0.8	54.3 ± 1.7

Resultats obtinguts a partir de 14 animals. Les determinacions de les activitats glucoquinasa i hexoquinasa es van determinar a partir d'extractes de múscul segons es descriu a Material i Mètodes i els resultat s'expressen com la mitjana ± SEM

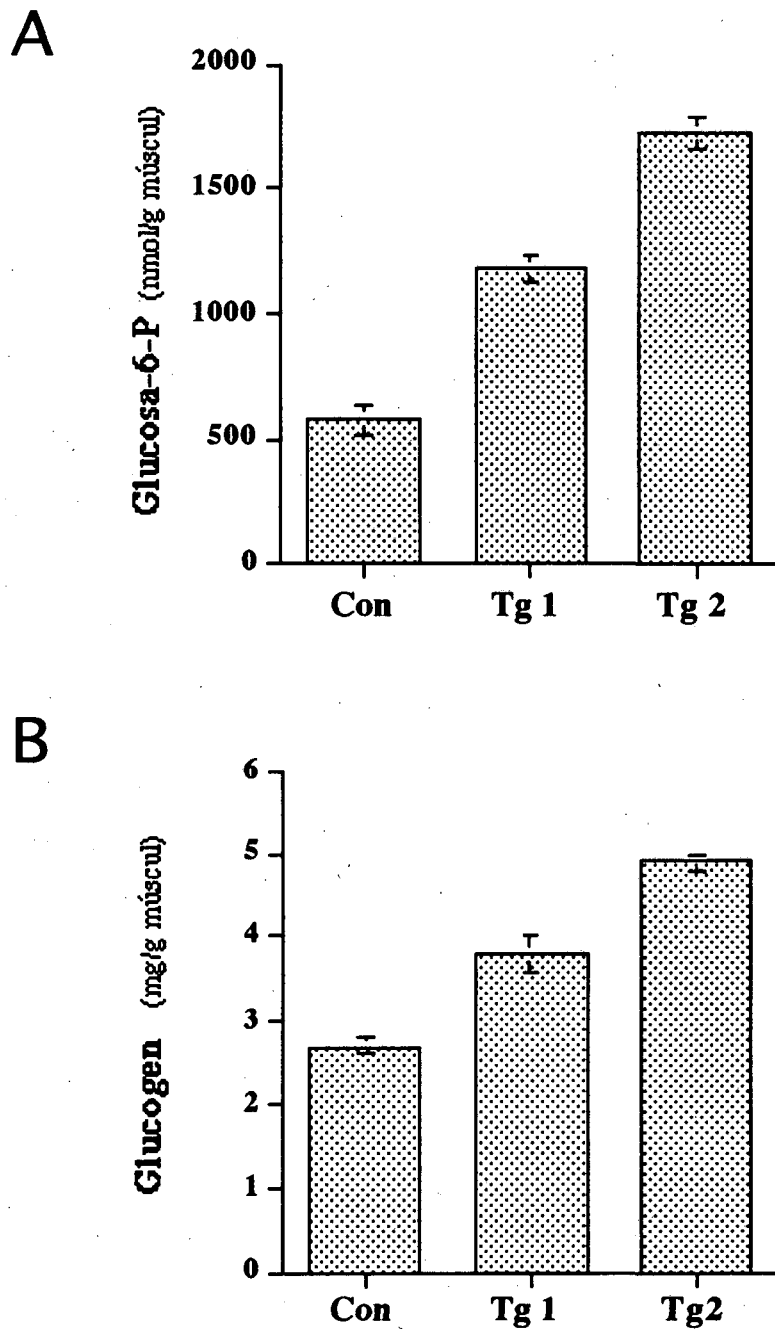


Figura 4. Efecte de l'expressió de GK en múscul esquelètic sobre els nivells de glucosa-6-fosfat (A) i glucogen (B). Les determinacions es van realitzar a partir d'extractes de múscul segons es descriu a Material i Mètodes i els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM.

3. ESTUDI DELS EFECTES SISTÈMICS PROVOCATS PER L'EXPRESSIÓ DE LA GK EN ANIMALS TRANSGÈNICS

Per comprovar si l'expressió de GK en múscul produïa alteracions en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa *in vivo*, es va determinar la concentració de glucosa plasmàtica en diferents condicions nutricionals, així com els nivells d'insulina. També es van determinar la concentració plasmàtica de lactat i de β -hidroxibutirat.

3.1 ANÀLISI DE LA GLUCÈMIA

A partir de mostres de sang obtingudes a primera hora del matí d'animals controls i transgènics alimentats o dejunats 24h es va determinar la concentració de glucosa plasmàtica.

La glucèmia dels animals transgènics MLC/GK era inferior a la detectada en els controls en les diferents condicions d'alimentació (Taula 2). Aquesta disminució en els nivells de glucosa sanguinària en els animals transgènics podria haver estat produïda per un augment en la captació de glucosa pel múscul esquelètic.

La glucosa es elimina del torrent circulatori pel transport a través de la membrana plasmàtica i la subsegüent fosforilació a glucosa-6-fosfat. La família de les hexoquinases fosforilen la glucosa intracel·lular i mantenen els nivells de glucosa molt baixos, assegurant d'aquesta manera que la glucosa entri en la cèl·lula. Aquests resultats indicaven que un augment en la fosforilació intracel·lular produïda per l'expressió de GK activa resultava en un increment en el gradient de entrada de glucosa en les cèl·lules musculars. Aquest increment es traduïa en un augment de la captació de glucosa pel múscul.

**Taula 2. Concentració plasmàtica de glucosa
(mg/dl)**

Edat	Alimentat	Dejunat
2 mesos		
Con	159 ± 5	85 ± 2
Tg1	154 ± 2	72 ± 2
Tg2	132 ± 2	74 ± 2
6 mesos		
Con	152 ± 3	83 ± 3
Tg1	132 ± 3	75 ± 2
Tg2	128 ± 4	71 ± 1
12 mesos		
Con	138 ± 1	76 ± 3
Tg1	117 ± 2	65 ± 1
Tg2	112 ± 4	64 ± 3

Resultats obtinguts a partir de 14 animals. Les determinacions de la glucosa sèrica es va realitzar segons es descriu a Material i Mètodes. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM.

3.2 TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

Es va administrar una sobrecàrrega intraperitoneal de glucosa a ratolins control i transgènics dejunats 24h. Els nivells basals de glucosa eren similars en els ratolins transgènics de les dues línies respecte als control (Figura 5). Després de 60 minuts de la injecció de glucosa, els animals transgènics presenten una reducció dels nivells de glucosa plasmàtica (al voltant del 19%) respecte als control. L'augment dels nivells de glucosa circulant va ser transitori i gradualment van retornar als nivells basals en 180 minuts tant en els animals control com transgènics. Aquest augment en l'eliminació de glucosa en els animals transgènics que expressen el gen quimèric MLC/GK molt probablement resulti de l'augment en la captació i utilització de glucosa pel múscul esquelètic. Aquest increment en la metabolització de la glucosa es podria explicar per l'efecte de l'expressió de GK en el múscul esquelètic d'aquest ratolins.

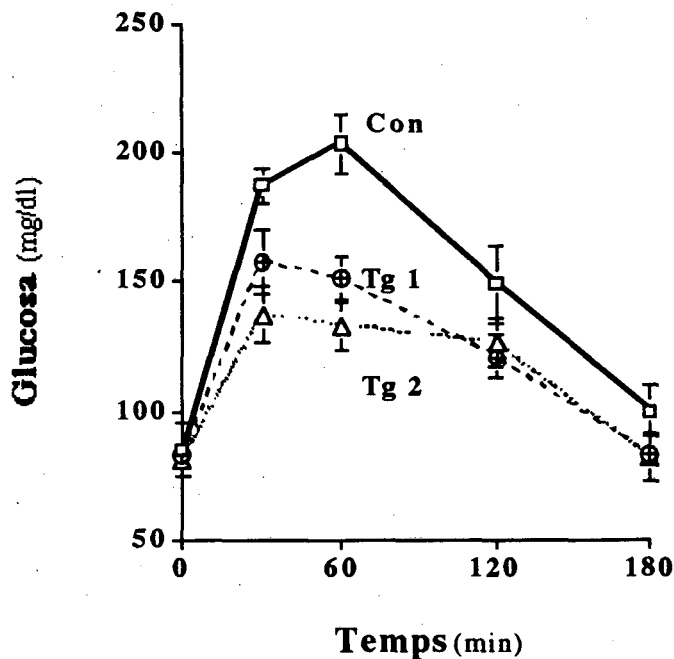


Figura 5 Test de tolerància a la glucosa. Ratolins control (m, Con) i transgènics (u, TgA and l, TgB) dejunats 24 h varen ser anestesiats i sotmesos a un test de tolerància a la glucosa. Es va administrar per via intraperitoneal 0,5 mg de glucosa per gram de pes viu i a continuació es varen realitzar determinacions de la concentració de glucosa en sang al llarg del temps. Els resultats estan expressats com la mitjana \pm SEM de 10 ratolins transgènics i 10 ratolins control.

3 ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DE GK EN EL MÚSCUL D'ANIMALS DIABÈTICS

Amb la finalitat d'estudiar si l'expressió de l'activitat GK era capaç de contrarestar la hiperglucèmia diabètica, animals control i transgènics van ser tractats amb estreptozotocina (Stz). Es van estudiar els canvis metabòlics tant a nivell sistèmic com a nivell muscular dels animals transgènics, provocats per l'expressió de la glucoquinasa.

Es va estudiar l'expressió de GK en el múscul després de induir diabetis amb Stz. En el múscul del ratolins diabètics no transgènics no es van detectar transcrits de mRNA de glucoquinasa, mentre que en ratolins transgènics tractats amb Stz expressaven nivells de mRNA de glucoquinasa 3 vegades superiors als detectats en el fetge d'animals sans alimentats (resultats no mostrats). Els animals transgènics MLC/GK presenten un augment en els valors de glucèmia en dejú respecte als transgènics sans (Figura 6). Quan es comparen amb animals control tractats amb Stz s'observa també una correcció parcial de la hiperglucèmia diabètica.

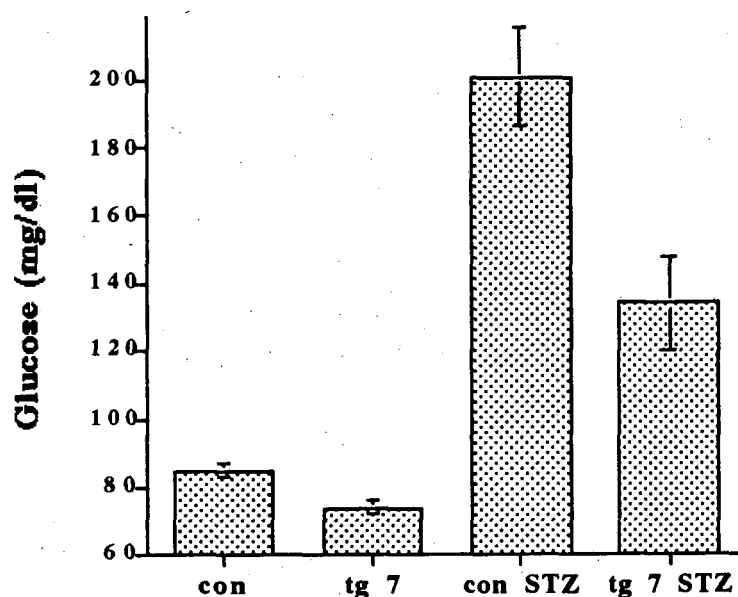


Figura 6. Nivells de glucosa a sèrum.. Les determinacions de la glucosa sèrica es va realitzar segons es descriu a Material i Mètodes. Els resultats estan expressats com la mitjana \pm SEM de 10 ratolins transgènics i 10 ratolins control. (Control no diabètic (Con); ratolins control tractats amb Stz (Con-Stz) i animals transgènics no tractats de la línia MLC/GK1 (Tg 7) i tractats amb Stz (Tg 7 Stz).

III CONCLUSIONS

- 1) S'han obtingut ratolins transgènics mitjançant la microinjecció del gen quimèric format pel promotor de la P-enolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) unit al cDNA de la glucoquinasa de rata (PEPCK/GK). Aquests animals expressen el transgèn al fetge de manera regulada.
- 2) La sobreexpressió de la GK en ratolins transgènics indueix glucolisi hepàtica i provoca un increment en la fosforilació de la glucosa i en l'acumul de glucògen a fetge
- 3) Els ratolins transgènics són hipoglucèmics i hipoinsulinèmics i presenten un test de tolerància a la glucosa millorat, fet que indica que aquests animals tenen un augment en la captació i utilització de la glucosa per part del fetge.
- 4) Els ratolins transgènics tractats amb estreptozotocina presenten una inducció de la glucolisi i una inhibició de la gluconeogenesi i cetogenesi
- 5) La sobreexpressió de GK en estat diabètic provoca una normalització dels parametres sèrics en els animals transgènics PEPCK/GK en absència d'insulina
- 6) En estat diabètic, els animals transgènics són capaços d'induir la utilització i acumulació de glucosa en el fetge
- 7) S'han obtingut ratolins transgènics mitjançant la microinjecció del gen quimèric format pel promotor de la cadena lleugera de la miosina (MLC) unit al cDNA de la glucoquinasa de rata (MLC/GK). Aquests animals expressen el transgèn en el múscul de manera constitutiva
- 8) L'expressió de la GK en ratolins transgènics MLC/GK indueix glucolisi muscular i provoca un increment en la fosforilació de la glucosa i en l'acumul de glucògen en el múscul
- 9) L'expressió de GK en els animals transgènics MLC/GK són capaços de contrarestar parcialment la hiperglucèmia diabètica després del tractament amb estreptozotocina en absència d'insulina

II MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS UTILITZATS

1.1. ANIMALS

Els animals utilitzats per a la tècnica d'obtenció d'animals transgènics varen ésser ratolins híbrids B6SJL, que provenien del creuament de les soques C57BL/6 i la SJL (IFFA CREDO), com a femelles donadores d'embrions i CD-1 (Charles River) com a femelles receptores. Els mascles que es varen vasectomitzar eren OF-1 (IFFA CREDO).

1.2. SOQUES BACTERIANES I VECTORS PLASMÍDICS

La soca bacteriana utilitzada per a l'amplificació dels plasmidis fou la DH5a d'E. coli. Les cèl·lules d'aquesta soca creixien a 37 °C en medi LB. La selecció dels clons positius es realitzava amb 50 mg/mL d'ampicilina. Es conserven a -80°C en medi LB amb un 20% (vol/vol) de glicerol.

Els vectors utilitzats en aquest treball foren el pB7.0, el pPCK10 i el pSM1-1-1.

1.3. REACTIUS I MEDIS DE CULTIU

Tots els reactius de biologia molecular es varen adquirir de les cases comercials Boehringer Mannheim, Gibco-BRL, BioRad i Pharmacia. Els productes marcats radioactivament (α -³²P)dCTP, la ³H₂O, la L-(1-¹⁴C)glucosa, la 5-(³H)-D-glucosa, la 2-(³H)-D-glucosa i el kit per a la determinació de l'AMPc, cAMP (¹²⁵I)assay system procedien d'Amersham Internacional. El BCA protein Assay era comercialitzat per la casa Pierce. El kit de detecció no radioactiu d'anticossos ECL Western Blotting analysis System era d'Amersham.

Les hormones, PMSG i HCG, i l'oli de parafina per al cultiu d'embrions procedien de Sigma. Els reactius químics del medi de cultiu d'embrions també varen ser adquirits a Sigma i a Merck. L'alcohol amilic terciari (anestèsic de ratolí) era d'Aldric i el tribromoetanol era de Sigma.

La collagenasa P de *Clostridium histolyticum*, que és l'específica per a l'aïllament dels illots pancreàtics era de Boehringer Mannheim. Els reactius per a la solució de

Hank's, a l'igual que els aminoàcids i la forskolina per al manteniment i secreció d'insulina dels illots era de Merck.

1.4. SONDES

La sonda de PEPCK utilitzada per Southern i Northern Blot corresponia al fragment d'1.7 Kb, SphI/SphI, del cDNA de la PEPCK (pPCK10) cedit pel Dr Richard W. Hanson (Case Western Reserve University, Cleveland, OH). La sonda de Glut-4 utilitzada per Northern blot corresponia al fragment de 2.47 Kb EcoRI-EcoRI del cDNA de Glut-4 (pSM1-1-1) cedit pel Dr. Birnbaum (Harvard University, Boston, MA). La sonda de l'hidroximetilglutaril-CoA sintasa utilitzada corresponia al fragment d'1.5 Kb EcoRI-EcoRI del cDNA del gen.

1.5. ANTICOSSOS

L'anticòs de conill contra Glut2 de rata fou cedit pel Dr. B. Thorens (Universitat de Lausane).

2. MÈTODES UTILITZATS

2.1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE DNA

2.1.1 Preparació de DNA plasmídic

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

El mètode consisteix en una degradació de la paret bacteriana per l'acció de la lisozima, seguida d'una lisi alcalina del esferoplast i una precipitació selectiva del DNA genòmic bacterià i de proteïnes desnaturalitzades per acció d'una solució concentrada d'acetat potàssic a pH àcid. El DNA plasmídic es purifica després mitjançant extraccions fenol-cloroform i es precipita amb etanol. El RNA bacterià és degradat amb RNAsa A.

Solució de lisozima

Tris-HCl pH 8.0	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	50 mM
Lisozima	5 mg/mL

Solució de lisi

NaOH	0.2 M
SDS	1%

Solució d'acetat potàssic pH 4.8

Acetat potàssic	3 M
Acid acètic glacial	2 M

L'obtenció de grans quantitats de DNA es realitzava mitjançant maxipreparacions de DNA, a partir d'1 litre de medi de cultiu. El mètode es basa igualment en una lisi alcalina, però la purificació del DNA es realitza amb unes columnes de Quiagen^{MR}.

2.1.2. Manipulació enzimàtica del DNA

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

Cada enzim de restricció requereix una força iònica i unes condicions de reacció específiques, i per això en cada cas s'ha seguit el protocol recomenat per la casa comercial subministradora de l'enzim. De forma general es digereix el DNA en relació de 5 unitats d'enzim per mg de DNA, tenint present de no superar el 5% del tampó de restricció. El temps de digestió del DNA plasmídic oscil.lava entre 1-2 h, mentre que quan es tractava de DNA genòmic es deixava digerint un mínim de 6h. Els productes de la restricció van ser analitzats en gels d'agarosa/TAE.

2.1.3. Aïllament i purificació de fragments de DNA

2.1.3.1. Gels d'agarosa

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

La resolució dels gels d'agarosa ve determinada per la concentració d'agarosa dels mateixos, de manera que es poden diferenciar bandes de pes molecular semblant mitjançant

variacions en la seva concentració. En el present treball es varen utilitzar gels d'agarosa en tampó TAE, de concentracions d'agarosa d'entre 0,6 i 1,2%. També es varen fer servir marcadors de pes molecular de DNA de l'I al VII de Boehringer Mannheim.

L'ús d'agarosa de baix punt de fusió permet la utilització de fragments de DNA sense la necessitat de purificar-los. Un cop diferenciat el fragment de DNA en el gel, es retalla la banda en que es troba immers en l'agarosa i es disol i s'escalfa a 65°C, mantenint-lo després a 37°C per impedir que es gelifiqui de nou. D'aquesta forma el DNA queda en dissolució i preparat per a posteriors modificacions (principalment lligacions amb la DNA lligasa del bacteriòfag T4 i marcatge de sondes radioactives amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa I).

Tampó d'electroforesi (TAE 1x)

Tris-acetat pH 8.3	40 mM
EDTA	1 mM

Tampó de càrrega 10x

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

2.1.3.2. Purificació de fragments de DNA per GeneClean^{MR}

És un mètode ràpid per a la purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa. Està basat en la dissolució del fragment del gel d'agarosa que conté la banda desitjada, en un agent caotrópic, en aquest cas en una solució saturada de NaI. Aquestes condicions permeten una adsorció selectiva del DNA a una matriu de sílice. El DNA posteriorment es renta i s'elueix en condicions de baixa força iònica. En aquest cas es va fer servir el kit comercial GENE CLEAN II (Bio 101 Inc., La Jolla, CA), i es va seguir el protocol dels subministradors.

2.1.3.3. Purificació de fragments de DNA per electroelució

Aquesta tècnica es va fer servir a l'hora de purificar el fragment de DNA que s'havia de microinjectar, ja que extreu el DNA de forma molt neta i no hi resta cap restes que posteriorment pugui ser tòxic per a l'embrió. El DNA es va aïllar seguint les instruccions del kit comercial BIOTRAP BT 1000 (Schleicher & Schull, Dassel, Alemanya)

2.1.4. Construcció de molècules híbrides de DNA

Amb l'objecte de construir molècules de DNA híbrides, els fragments de DNA eren purificats, combinats i tractats amb DNA lligasa del bacteriòfeg T4 suministrada per Pharmacia (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suècia). Els productes de la barreja de lligació eren introduïts en cèl.lules DH5a d'E. coli competents i aquelles cèl.lules que havien adquirit el DNA plasmídic i, per tant, eren transformants se seleccionaven genèticament o bé per altres mètodes, i després es confirmava per anàlisi del DNA.

2.1.4.1. Subclonatge de fragments de DNA

Les tècniques de subclonatge són àmpliament utilitzades amb diferents finalitats. En aquest cas varen emprar-se per tal de construir el minigèn de la PEPCK. Es feren servir els vectors pPCK10 i pB7.0 (Yoo-Warren i col. 1983).

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

Les cèl.lules DH5a de E. coli utilitzades es varen fer competents mitjançant el mètode de Hanahan (1985), que emprava el $MgCl_2$ i el $CaCl_2$ com agents permeabilitzadors de membrana, procedint-se a continuació a la transformació amb els plàsmids desitjats. Seguidament s'extenen en placa sobre un medi selectiu, en el nostre cas el medi de cultiu, LB, contenia 50 mg/mL d'ampicilina. D'aquells clons que resultaven resistents i, per tant, positius es procedia a fer-ne un creixement en medi LB/ampicilina en volums de 250 a 500 mL per tal d'amplificar-los i procedir a la seva anàlisi.

LB (Luria-Bertrani Broth)

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

NaCl

5 g/l

2.1.5. Marcatge radioactiu del DNA

El mètode radioactiu emprat per al marcatge de sondes, utilitzades tant per Northern com per Southern blot, fou el preparat comercial Random Primed Labellig Kit (Boehriner Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanya), i se seguiren les indicacions del protocol de la casa comercial. Es partia aproximadament de 50 ng de sonda DNA i s'incubava a 37°C durant una hora amb una mescla de dATP, dGTP, dTTP i ($a^{32}P$)dCTP en presència del fragment de la Klenow de la DNA polimerasa I d'E. coli. Aquesta tècnica (Feinberg i Vogelstein, 1983), permet l'obtenció de sondes d'alta radioactivitat específica (1.8×10^9 dpm/mg DNA) i amb un marcatge uniforme. La separació dels nucleòtids no incorporats s'aconseguia mitjançant columnes de Sephadex G-50.

2.2. TÈCNICA D'OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS

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

2.2.1. Preparació del DNA

La puresa del DNA a microinjectar és un factor molt important per a l'èxit de la microinjecció. El plasmidi que conté el gen d'interès es va preparar amb columnes de Quiagen. Posteriorment el DNA fou digerit amb els enzims de restricció apropiats i sotmès a electroforesi en gel d'agarosa/TAE. El fragment de DNA desitjat es va aïllar i purificar per electrolució. Finalmet es va redissoldre en el tampó de microinjecció de Brinster.

Tampó de Brinster pH 7.5

Tris-HCl 10 mM

EDTA

0.25 mM

La determinació de la concentració de la solució de DNA per microinjectar es va efectuar per comparació en gel d'agarosa amb un marcador de pes molecular conegut. Les concentracions per microinjectar foren de 2 i de 4 ng/ml (Brinster i col., 1985). Abans de ser utilitzat aquest DNA es va centrifugar 10 min. a 13.000g a fi d'evitar la presència de partícules que podrien obturar la pipeta de microinjectió.

2.2.2. Recol.lecció dels oòcits fecundats

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

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

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

Per saber quines femelles havien estat cobertes, el dia següent se seleccionaven aquelles que presentaven tap vaginal i se sacrificaven. Se n'extreïen els oviductes, i se n'alliberaven els òvuls fecundats en un medi de Brinster (Brinster, 1982) amb hialuronidasa (1mg/mL). Posteriorment eren rentats amb medi sense enzim, procés que es repetia diferents

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

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

2.2.3. Preparació per a la microinjecció

Per obtenir un bon èxit en la microinjecció són molt importants les micropipetes. Aquestes es preparen a partir d'uns capil.lars de vidre tipus Garner d'1mm de diàmetre que prèviament han estat siliconitzats. Aquests capil.lars s'estiren amb un estirador de pipetes. A continuació amb la microforja es dona un angle d'aproximadament 15° a la punta de les pipetes mitjançant la col.locació vertical d'aquestes a prop de la font de calor de la microforja durant uns breus segons. Aquest procediment és necessari perquè les pipetes se situin en el mateix pla del microscopi que els embrions i d'aquesta forma poder enfocar la

porció de la pipeta que entra en el camp de visió. Després la pipeta de subjecció és tallada en la microforja col·locant-la horitzontalment sobre un llit de vidre unit al filament de la microforja. Amb això s'aconsegueix un trencament de la pipeta de forma que els cantells queden de tipus rom. L'obertura de la pipeta de microinjecció s'obté trencant la seva punta tancada sobre de la pipeta de subjecció.

El portaobjectes utilitzat és una modificació del portaobjectes estàndard de microscopia òptica, ja que se li ha practicat un orifici d'una àrea rectangular de 2.0 x 1.6 cm. Sota aquesta àrea s'hi col·loca un cubreobjectes, segellant amb parafina fosa. Aquest tipus de cambra és òptima per a la microinjecció d'embrions. Una gota (4ml) del medi de microinjecció de Brinster-HEPES i una gota de DNA (2 ng/ml dissolts en tampó de microinjecció) eren dipositades verticalment en el centre del portaobjectes de microinjecció. Les dues gotes eren cobertes per oli de silicona. A continuació uns 25 embrions eren transferits a la gota de medi de Brinster.

2.2.4. Microinjecció del oòcits fecundats

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

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

Per a microinjectar la solució de DNA s'enfocava la membrana del pronucli masculí i la punta de la pipeta de microinjecció i s'introduïa aquesta a la membrana pronuclear,

injectant-se uns 2 pl de sol.lució de DNA (s'observa un augment del tamany del pronucli). Sols es guardaven per a la transferència els que estaven en bones condicions després de la injecció. Es manenien en una placa de cultiu per a embrions a temperatura fisiològica fins a ser transferits a la femella receptora.

2.2.5. Transferència a la femella receptora

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

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

Un cop es tenia la massa ovàrica fora de la cavitat abdominal i orientada correctament, es desgarrava la bossa ovàrica i es visualitzava l'infundíbul. Amb l'ajut de la pipeta fina de transferència, s'introduïen 10-12 oòcits microinjectats a l'interior de l'infundíbul. Posteriorment es retornava la massa ovàrica dins de la cavitat abdominal. El procés es repetia en l'altre costat. Finalment la incissió realitzada en la pell era tancada amb grapes.

Les femelles duïen a terme una gestació normal d'uns 20 dies. Durant les tres setmanes després del part es mantenien sota control per a vigilar que no hi haguessin problemes com per exemple rebuig de les cries.

2.3. DETECCIÓ DELS ANIMALS TRANSGÈNICS

2.3.1. Obtenció de DNA genòmic

Per a l'extracció de DNA genòmic de ratolí amb la finalitat de detectar quins d'ells eren transgènics, es va seguir el mètode de De Wet i col. (1987). Aquest mètode consisteix en l'obtenció de DNA a partir d'un homogenat de cua de ratolí en una solució de lisi tamponada que conté proteinasa K i una solució de SDS. La cua del ratolí es deixava a 55°C tota la nit i després s'hi realitzaven fenolitzacions per tal de separar les proteïnes. Finalment el DNA es precipitava amb isopropanol i es resuspensia amb TE.

Solució de lisi

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

TE

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

2.3.2 Anàlisi de DNA per Southern Blot

Vàrem utilitzar la tècnica de Southern Blot per determinar la presència del gen exogen en ratolins transgènics. Es digerien amb l'enzim de restricció adequat uns 10 mg de DNA genòmic per animal. L'electroforesi es realitzava en gels d'agarosa/TAE i es deixava córrer unes 4-5 hores entre 30 i 50v. Després el gel es mantenia durant 15 min en una solució HCl 0.25N per aconseguir una depurinització i assegurar la transferència a la membrana de nylon

de bandes d'elevat pes molecular. Després el DNA es desnaturalitzava en una solució alcalina durant 30 min i finalment es neutralitzava amb solució neutralitzant.

Solució alcalina

NaCl 1.5 M

NaOH 0.5 M

Solució neutralitzant pH 7.5

NaCl 1.5 M

Tris-HCl 0.5 M

La tècnica utilitzada per transferir el DNA genòmic des dels gels d'agarosa/TAE tractats a les membranes de nylon (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanya i NEN, Boston, MA) era la transferència capil·lar per pressió negativa en tampó d'alta força iònica (10xSSC). S'emprava el sistema VaccuGene (Pharmacia-LKB) seguint les instruccions dels fabricants. Posteriorment es fixava el DNA a la membrana amb llum ultravioleta amb el sistema UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA).

Un cop el DNA fixat a la membrana es procedia a realitzar la prehibridació, a fi de reduir la hibridació inespecífica i posteriorment la hibridació amb la sonda marcada radioactivament (3 a 5×10^6 cpm/mL) durant tota una nit. A continuació es rentava per eliminar la sonda en excés i aquella que mantingués unions molt dèbils.

Solució de prehibridació

SSCP 4x

SDS 1 % (p/vol)

Sol. Denhardt 1x

ssDNA 0.5 mg/mL

Solució d'hibridació

SSCP 2.5x

Dextrà sulfat de sodi	6 % (p/vol)
SDS	1 % (p/vol)
Sol. Denhardt	1x
ssDNA	0.5 mg/mL

SSCP 20x

NaCl	2.3 M
Citrat sòdic	0.3 M
Na ₂ HPO ₄	0.3 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M

SSC 10x

NaCl	1.5 M
Citrat sòdic	0.15 M

Solució de Denhardt 50X

Ficoll 400	1 % (p/vol)
Polivinipirrolidona	1 % (p/vol)
BSA	1 % (p/vol)

2.3.3. Establiment de línies de transgènics

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

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

2.4. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE RNA

2.4.1. Extracció de RNA total

La preparació de RNA a partir de teixits animals rics en ribonucleases consta d'un primer pas en el que el teixit és congelat en nitrogen líquid i posteriorment homogenitzat en un tampó de tiocianat de guanidini i β -mercaptoetanol per tal d'inhibir la degradació del RNA.

Es va crear un gradient amb CsCl_2 i es va centrifugar 18 h a 25.000xg per separar el RNA de les proteïnes i el DNA. En el cas d'obtenció de RNA de teixit adipós blanc es realitzava després de l'homogenització del teixit una extracció de lípids.

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

Aquest tipus de gel eren utilitzats per el fraccionament del RNA en experiments de Northern Blot, ja que el formaldehid a concentració 2.2 M actua desnaturalitzant les estructures secundàries del RNA. Aquest fet permet que la migració del RNA sigui proporcional al logaritme del seu pes molecular i possibilita el càlcul del tamany molecular dels diferents missatgers específics. Tant el tampó d'electroforesi com el de càrrega havien de ser preparats en condicions lliures de contaminació amb ribonucleases per evitar la degradació enzimàtica del RNA.

Tampó borat 10x

Borat sòdic	62 mM
Acid bòric	620 mM
Citrat sòdic	12 mM

Tampó electroforesi

Tampó borat	1x
Formaldehid	3.7x(vol/vol)

Tampó càrrega

Metilmercuri	4.5 % (vol/vol)
Glicerol	30 % (vol/vol)
Blau de bromofenol	0.5 % (p/vol)

SDS	1.5 % (p/vol)
Tampó borat	0.5x

2.4.3. Anàlisi de RNA per Northern Blot

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

La transferència de RNA a la membrana és bàsicament similar a la descrita pel cas del Southern Blot, amb l'excepció que el RNA no és mai despurinat ni desnaturalitzat. En aquest cas, les transferències es varen realitzar utilitzant pressió positiva mitjançant el Possiblot (Stratagene, La Jolla, CA). Després el filtre era irradiat amb llum ultravioleta d'ona curta per crear unions covalents del RNA amb el nylon amb el Stratalinker 1800. El tamany molecular de la banda d'hibridació es calculava interpolant sobre la recta patró realitzada amb marcadors de tamany molecular de RNA fraccionat en el mateix gel i posteriorment tenyit amb Bromur de Etidi. El protocol per a la prehibridació, hibridació i rentats era el recomanat per la firma fabricant de les membranes de nylon, Gene Screen PLUS (NEN, Boston, MA), destacant la presència de formamida desionitzada en les solucions de prehibridació i hibridació amb la finalitat d'incubar els filtres a una baixa temperatura (42°C), ja que el RNA no pot ser escalfat a altes temperatures durant un temps perllongat.

Solució de prehibridació i hibridació

Formamida desionitzada	50 % (vol/vol)
NaHPO ₄ pH 7	250 mM
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
BLOTTO	0.1 % (p/vol)

SDS	1 % (p/vol)
ssDNA	0.5 mg/mL

BLOTTO

Llet desnatada en pols	10 %
Azida sòdica	0.02 %

2.5. ANÀLISI DELS ANIMALS

Els ratolins utilitzats, tant controls com transgènics, es trobaven amb condicions de temperatura i llum controlada (12 hores de llum i 12 hores de foscor). En general, els animals utilitzats tenien aproximadament 2 mesos, edat que ja es considera com a adulta, o bé més de 6 mesos. Els experiments es varen fer a primera hora del matí a fi de mantenir els animals en un bon estat d'alimentació. Els animals de forma rutinària eren alimentats amb una dieta normal de laboratori (Panlab MR, Barcelona). Als animals dejunats se'ls retirava la dieta el matí anterior al de la seva utilització.

2.6. OBTENCIÓ D'HEPATÒCITS EN CULTIU PRIMARI

Després d'anestessiar el ratolí amb una injecció intraperitoneal d'avertín s'accedia a la cavitat abdominal. S'apartaven els intestins i es localitzava la vena porta i la cava caudal. A continuació d'insertava una cànula de 25G a la vena porta i es posava en funcionament la bomba peristàltica per començar la perfusió del fetge. Es tallava la vena cava i el fetge adquiria ràpidament una tonalitat pàlida. La perfusió es realitzava primerament amb Hepes (200 ml) + Heparina (40 ml/ 100 ml) + EGTA (0.66 mM final). Seguidament es rentava amb Hepes (100 ml) i a continuació es perfonia amb la solució de col.lagenasa (50 mg de col.lagenasa A + 100 ml Hepes + 172 mg CaCl₂) fins que els fetge perdia consistència. Després s'extreia el fetge perfós i es colocava en una placa de Petri amb Hepes i penicilina i estreptomicina i es portava a la cambra de flux laminar. A partir d'aquí es mantenia la màxima esterilitat possible. Després es passava el fetge a una altra placa amb medi

DMEM/HAM'S F12 i es disgregava. Les cèl.lules que s'obtenien es filtraven amb un filtre de nylon i es deixaven sedimentar durant 10 min. en el mateix medi (50ml). A continuació, s'aspirava el medi, es resuspenien de nou amb DMEM/HAM'S F12 suplementat amb 10% de sèrum fetal boví i es centrifugaven 2 min. a 500 rpm. Un cop resuspeses, es calculava la viabilitat i el nombre de cèl.lules obtingudes i es plaquejaven en plaques de Petri amb col.lagen. Al cap de 4 h es renovava el medi de cultiu ja que els hepatòcits ja començaven a establitzar-se i a adherir-se al fons de la placa. L'endemà es començava el tractament.

2.7. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS

Per a obtenir sèrum de ratolí els animals eren sacrificats per decapitació i immediatament es recollia la sang i es dipositava posteriorment en gel. El sèrum s'obtenia després de deixar coagular la sang durant 30 min a 0 °C. El sèrum es mantenia congelat (-20 °C) fins el moment de la determinació dels diferents paràmetres.

2.7.1. Determinació de metabolits en el sèrum

2.7.1.1. Glucosa

Els nivells de glucosa sèrica es varen determinar a partir de 5 ml de sang total d'animals sagnats per la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite™ de Bayer.

2.7.1.2. Triglicèrids

Els triglicèrids sèrics es varen determinar seguint el mètode enzimàtic de Wahlefeld (1974) basat en la quantificació del cromogen PAP. Aquest s'obté a partir de tres reaccions acoblades en les que intervenen la glicerol quinasa, la glicerol 3-fosfat oxidasa i la peroxidasa. Es va utilitzar l'assaig Peridochrom^R Triglicèrids GPO-PAP, adaptat per Boehringer Mannheim per al COBAS BIO.

2.7.1.3. Àcids grassos no esterificats (NEFAs)

La determinació dels àcids grassos no esterificats en el sèrum es va realitzar mitjançant el mètode enzimàtic NEFA C de la firma comercial Wako Chemicals, Neuss,

Alemanya, adaptat a l'autoanalitzador COBAS BIO. Es basa en la quantificació d'un cromogen obtingut posteriorment a l'acoblament de tres reaccions en les que intervenen l'Acil CoA sintetasa, la Acil Coa oxidasa i la peroxidasa.

2.7.1.4. β -Hidroxitirac

Els nivells sèrics de β -hidroxitirac es van determinar en l'autoanalitzador COBAS BIO, utilitzant el mètode colorimètric del kit comercial D-3-Hydroxybutyric acid de Boehringer Mannheim.

2.7.2. Determinació d'hormones

2.7.2.1. Insulina

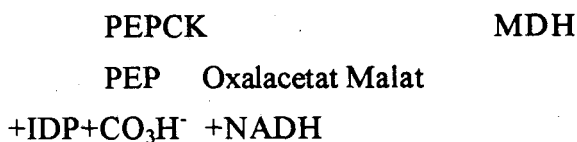
La insulina es va determinar per radioimmunoassaig en el sèrum dels animals, així com també en el medi d'incubació dels illots (CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvette, França). El mètode té un límit de sensibilitat de 30 pM i una variació intraassaig del 6%.

2.8. ESTUDI DEL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN EL FETGE.

2.8.1. Determinació d'activitats enzimàtiques hepàtiques

2.8.1.1. Activitat fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK)

L'activitat PEPCK en el fetge es va mesurar seguint el mètode basat en la carboxilació del fosfoenolpiruvat a partir de HCO_3^- i d'inosin difosfat (IDP):



La funció de l'enzim malat deshidrogenasa (MDH) era reduir l'oxalacetat produït per la PEPCK fins a malat, que és un compost més estable a pH àcid.

Mitjançant un polítró es van homogenitzar les mostres congelades de fetge de ratolí en 15 volums de tampó d'homogenat, per tal d'assolir una concentració de proteïnes d'aproximadament 10 mg/ml. Els homogenats es van centrifugar a 12.000 rpm 10 min. a 4°C i en el sobrenadant es va mesurar l'activitat enzimàtica i la concentració de proteïnes amb el mètode de Bradford. En un volum de 450 µl de la mescla d'assaig hi afegíem 50 µl de l'homogenat de fetge i deixàvem incubar 10 min. a 30°C. La reacció s'aturava afegint un volum d'HCl 2N. Uns 800 µl d'aquesta mescla es feien evaporar escalfant durant 1 hora a 80°C. El residu es resuspensava amb 0.5 ml d'H₂O, se li afegien 4.5 ml de líquid de centelleig i es determinava la quantitat de malat radioactiu que presentava. L'activitat enzimàtica es donava en mU/mg de proteïna (mmols/min/mg prot.).

Tampó d'homogenat (pH 7.4) Mescla de reacció (pH 7)

Glicil Glicina	50 mM	Imidazole HCl pH 6.6	0.5 M
KCl	120 mM	IDP	25 mM
DTT	1 mM	Cl ₂ Mn	20 mM
Trasyolol	20 UI/ml	DTT	20 mM
PMSF	0.1 mM	NADH	50 mM
		MDH	125 U/ml
		¹⁴ CO ₃ HNa (0.2mCi/mmol)	50 mM
		PEP	1.25 mM

2.8.1.2. Activitat glucoquinasa

Per a la determinació de l'activitat glucoquinasa es va seguir el protocol descrit per Newgard i col. (1983), basat en la determinació del ritme d'aparició de NADH. Aquesta aparició és proporcional a la fosforilació de glucosa per la glucoquinasa i l'hexoquinasa

gràcies a l'acoblament de la reacció amb la formació, a partir de glucosa-6-P, de 6-fosfogluconat mitjançant la acció de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

Per a obtenir els extractes de fetge es varen homogenitzar les mostres de fetge en 5 vol. de tampó d'homogenat i es varen centrifugar a 29.000 xg 30 min. a 4°C. Es va extreure el sobrenadant i es va mesurar l'activitat enzimàtica a 37 °C en un autoanalitzador COBAS BIO a 0,5mM de glucosa i a 100 mM de glucosa. El valor de l'activitat glucoquinasa s'obté en restar de l'activitat obtinguda a alta concentració de glucosa, la de baixa concentració, que correspon a l'activitat hexoquinasa.

<u>Tampó d'homogenat (pH 7,4)</u>		<u>Mescla d'assaig (pH 7,4)</u>	
Tris	50 mM	Tris	100 mM
KCl	100 mM	KCl	100 mM
EDTA	1 mM	MgCl ₂	7,5 mM
Sacarosa	300 mM	ATP	5 mM
β-mercaptoetanol	10 mM	NAD ⁺	2 mM
		G6-PDH	5 U/ml
		Glucosa	0,5 mM o 100 mM

2.8.1.3. Activitat piruvat quinasa

Per a la determinació de l'activitat piruvat quinasa total de fetge, les mostres de fetge fresques van ser homogenitzades en 9-10 volums de tampó homogenat i es van centrifugar a 29.000 x g durant 30 min a 4°C. Es va obtenir el sobrenadant i, després d'afegir en la barreja de reacció fosfoenolpiruvat (5 mM), es va mesurar la caiguda d'absorbància en un autoanalitzador tipus COBAS BIO.

<u>Tampó d'homogenat (pH 7,4)</u>		<u>Mescla d'assaig (pH 7,4)</u>	
Glicilglicina	50 mM	Glicilglicina	50 mM
KF	100 mM	KCl	100 mM
EDTA	15 mM	NADH	0.2 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM	MgCl	10 mM

ADP	1.25 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
LDH	2 U/ml

2.8.2. Determinació de metabòlits

2.8.2.1. Determinació de glucosa-6-fosfat

La determinació dels nivells intracel·lulars d'aquest metabòlit la va establir Michat l'any 1974, basant-se en la reacció de l'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa. Aquest enzim transforma la glucosa-6-fosfat en 6-fosfogluconat, alhora que redueix el NAD⁺ a NADH. Aquest compost es pot detectar per espectrofotometria.

Es varen homogenitzar fraccions de fetge, prèviament pesades, en HClO₄ al 10%. Posteriorment es varen centrifugar a 29.000 x g durant 15 min. a 4°C i es va obtenir el sobrenadant. El sobrenadant es va ajustar a pH 7 mitjançant K₂CO₃ (utilitzant 1/10 vol. de sol. indicador universal). Les mostres es varen centrifugar per eliminar el precipitat i per últim es va determinar el metabòlit en el sobrenadant a 37 °C en un autoanalitzador COBAS BIO utilitzant la mescla d'assaig que s'indica a continuació.

<u>Mescla d'assaig (pH 7,4)</u>		<u>Segon reactiu</u>	
Tris-HCl	90 mM	G6-PDH	30 U/ ml
MgCl ₂	25 mM		
NAD ⁺	1,2 mM		

2.8.2.2. Determinació de glucogen

Aquest polisacàrid es va determinar mitjançant la tècnica descrita per Keppler & Decker., 1984, que es basa en la utilització de l'enzim α-amiloglucosidasa. La glucosa alliberada per l'enzim es determina espectrofotomètricament en un autoanalitzador COBAS BIO utilitzat el kit comercial Gluco-Quant[®], de Boehringer Mannheim.

Per a l'obtenció dels extractes es varen politronar porcions de fetge en 10 vol de HClO_4 al 10%. A continuació es va centrifugar a 6000xg, 5 min i es va recollir el sobrenadant, el qual es va ajustar a pH 5. De cada mostra es varen agafar 100 ml, i s'hi varen afegir 100 ml de solució d' α -amiloglucosidasa (10 U/ml de tampó acetat a pH 4,8). La incubació es va portar a terme durant 2 hores a 50 °C i es va aturar afegint 250 ml de HClO_4 al 10%. Es va obtenir el sobrenadant i es va determinar la concentració de glucosa. La quantitat de glucogen es va determinar com la diferència obtinguda de mostres en duplicat, de les quals una s'havia incubat amb α -amiloglucosidasa i l'altre no. Sense l'enzim es determina la concentració intracel·lular de glucosa lliure.

2.8.2.3. Determinació de lactat

La determinació de lactat al fetge es realitzà emprant el mètode descrit per Gutmann i Wahlefeld (1974). En aquest mètode, l'addició de l'enzim L-lactat deshidrogenasa (LDH) a la mostra transforma el substrat a piruvat al mateix temps que es dona la reducció del NAD^+ present a la reacció a NADH.

Es va mesurar el contingut de lactat hepàtic del mateix homogenat utilitzat per a la determinació de glucosa-6-fosfat. El mètode descrit va ser adaptat per a ésser utilitzat per un autoanalitzador tipus COBAS BIO. En aquest autoanalitzador, 25 ml de la mostra es barrejaven amb 25 ml de la barreja d'assaig a pH 9 (hidrazina 0.25M, EDTA 0.15 mM i NAD^+ 18 mM). Es deixava preincubant durant 3 min. i després s'hi afegien 35 U/ml de LDH per iniciar la reacció. La hidracina i el medi alcalí de l'assaig són necessaris per evitar que la reacció es desplaci cap a la formació de lactat, ja que el piruvat que es forma a partir del lactat reacciona amb la hidrazina per a formar hidrazona i d'aquesta manera la reacció es fa irreversible.

2.9. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES TOTALS

La quantitat de proteïna present en els extractes de teixit es mesurava mitjançant el mètode de Biuret. Aquest mètode es basa en que les proteïnes, en medi alcalí i en presència

d'ions de coure, formen un complex de color porpre que presenta un màxim d'absorbància a 550 nm. La lectura espectrofotomètrica va ser adaptada a un autoanalitzador COBAS BIO de Roche.

2.10. CORBA DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

Aquest test s'utilitza amb la finalitat de comprovar si els animals són capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa. Aquells animals que mantinguin les glucèmies més elevades i no recuperin els nivells basals de glucosa seran considerats animals diabètics.

Es varen agafar animals control i transgènics i varen ésser anestesiats amb Avertin. Se'ls va fer un control de glucèmia basal amb 5 ml de sang. La mesura de la glucèmia es feia amb el Glucometer Elite TM de Bayer. Un cop els animals s'havien estabilitzat se'ls injectava intraperitonealment una dosi d'1 mg de glucosa per gram de pes viu. A partir d'aquest moment es feren extraccions de sang seriades amb un interval de 30 min fins a les 3 hores de l'inici del test.

2.13. PREPARACIÓ I ANALISI DE PROTEÏNES

2.13.1. Preparació d'extractes protèics

Els extractes protèics eren obtinguts a partir d'illots pancreàtics. es va guardar una part de l'extracte per mesurar la quantitat de proteïna pel mètode BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL).

Tampó de lisi

Tris-HCl pH 6.8	80 mM
SDS	5 %

EDTA	5 mM
glicerol	10 % (vol/vol)
PMSF	1 mM

2.13.2. BCA Protein Assay Reagent

L'àcid bicinchonínic (BCA) en la forma de sal sòdica, que és soluble en aigua, és un reactiu altament sensible, estable i específic a ions Cu^{1+} . S'ha demostrat que estructures macromoleculares i 4 aminoàcids (cistina, cisteina, triptòfan i tirosina) són els responsables de la formació de color quan s'incuben amb el BCA. (Wiechelman i col. 1988).

En aquest cas es van seguir les instruccions recomenades per la casa comercial, utilitzant el protocol indicat per rangs de proteïna de 5-250 mg/mL, és a dir deixar la incubació de la proteïna amb el reactiu a 60°C durant 30 min. Els patrons utilitzats eren diferents concentracions de BSA.

2.13.3. Separació electroforètica

L'anàlisi de proteïnes es va realitzar mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida al 10% en presència de SDS (Laemmli, 1970). Les mostres (20 mg de proteïna) varen ser barrejades amb 1/4 volum de tampó de càrrega i escalfades a 95°C durant 4 min. Les electroforesis es varen dur a terme a 45 mA quan les mostres estaven en el gel compilador i a 60 mA a partir de la seva entrada en el gel separador. Es varen utilitzar marcadors de pes molecular pretenyits Kit for molecular weights 10.000-70.000 (MW-SDS-70 de Sigma, St Louis, USA).

Tampó d'electroforesi pH 8.3

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1 % (p/vol)

Tampó de càrrega 4x

Tris-HCl pH 6.8	62.5 mM
Glicerol	10 % (vol/vol)
SDS	2 % (p/vol)
2-β mercaptoetanol	5 % (vol/vol)
Blau de bromofenol	0.00125 % (p/vol)

2.13.4. Electrotransferència i immunodetecció de proteïnes

L'electrotransferència de les proteïnes del gel es va realitzar sobre membranes de Immobilon-P (Millipore) en un aparell de Trans Blot model 2051 (LKB). Aquesta es va realitzar a 250 mA durant 2 h. en tampó d'electrotransferència.

La immunodetecció es va fer seguint el marcatge no radioactiu de l'anticòs per ECL Western Blotting analysis system (Amersham). Es va utilitzar l'anticòs de conill contra Glut2 a una dilució 1:1000.

Tampó electrotransferència

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

2.14. ANÀLISI HISTOLÒGICA DEL FETGE

Els fetges obtinguts dels animals eren fixats amb solució tamponada de formol al 10% durant 24-48 hores a 4°C. A continuació es varen incloure en parafina i es varen obtenir seccions (2 i 3 mm) amb l'ajut del microtom, que posteriorment es varen desparafinar. Per detectar el glucogen en el fetge es va utilitzar la reacció d'àcid periòdic de Schiff (PAS). Amb aquesta tinció el glucogen adquireix una coloració magenta. Els talls histològics del teixit adipós es van tenyir amb hematoxilina i eosina.

2.15. CÀLCUL ESTADÍSTIC

Els resultats s'expressen com la mitjana \pm error estàndard de la mitjana. En cas de no especificar-se, la comparació del resultats es va realitzar mitjançant la t Student de dades no aparellades.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, et al. 1996. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* 12:106-09
- Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald SM, Pedersen O. 1993. Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342: 828-32
- Araki E, Lipes MA, Patti M, Brüning JC, Haag III B, Johnson RS, Kahn CR. 1994. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372:186-90
- Axelrod J.D. & Pilch, P.F. (1983) *Biochemistry*, **22**, 2222-2227
- Bali D, Svetlanov A, Lee H, Fusco-DeMane D, Leiser M, et al. 1995. Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. *J. Biol. Chem.* 270:21464-67.
- Bell, G.I, Burant, C.F., Takeda, J. & Gould, G.W. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19161-19164.
- Bronson SK, Smithies O. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269:27155-58
- Brüning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn R. 1997. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88:561-72
- Burgering BM, Medema RH, Maasen JA, Van de Wetering ML, Van der Eb AJ, et al. 1991. Structure of Arc repressor in solution: evidence for a family of beta-sheet DNA binding proteins. *EMBO J.* 10:1103-09
- Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Mueckler M. 1996. Differential effects of GLUT1 or GLUT4 overexpression on hexosamine biosynthesis by muscles of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 271:23197-02
- Casals, N., Roca, N., Guerrero, M, Gil-Gomez, G., Ayté, J., Ciudad, C.J. & Hegardt, F.G. (1992) *Biochem. J.* **283**, 261-264.
- Celi FS, Silver K, Walston J, Knowler WC, Bogardus C, et al. 1995. Lack of IRS-1

- codon 513 and 972 polymorphism in Pima Indians. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:2827-29
- Chang H.C. & Lane, M.D. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2413-2420.
- Chang P, Benecke H, Marchand-Brustel YL, Lawitts J, Moller DE. 1994. Expression of a dominant-negative mutant human insulin receptor in the muscle of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 269:16034-40
- Chang P, Jensen J, Printz RL, Granner DK, Ivy JL, Moller DE. 1996. Overexpression of hexokinase II in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 271:14834-39
- Chen JF, Guo JH, Moxham CM, Wang HY, Malbon CC. 1997. Conditional, tissue-specific expression of Q205L G_{ia2} in vivo mimics insulin action. *J. Mol. Med.* 75:283-89
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.W., McDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299
- Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, et al. 1995. Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 346:397-402
- Cola GD, Cool MH, Accili D. 1997. Hypoglycemic effect of insulin-like growth factor-1 in mice lacking insulin receptors. *J. Clin. Invest.* 99:2538-44
- Cousin B, Agou K, Leturque A, Ferre P, Girard J, Penicaud L. 1992. Molecular and metabolic changes in white adipose tissue of the rat during development of ventromedial hypothalamic obesity. *Eur. J. Biochem.* 207:377-82
- Davidson, A. L., and Arion, W.J. (1987) Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 156-176
- Decaux, J.F., Marcillat, O., Pichard, A.L, Henry, J. & Kahn, A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3432-3438
- DeFronzo RA. 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for indentifying diabetes genes. *Diab. Rev.* 5:177-269
- Dent P, Lavoinne A, Nakielny S, Caudwell FB, Watt P, Cohen P. 1990. The molecular mechanisms by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal

muscle. *Nature* 348:302-07

Doiron, B., Cuif, M-H., Kahn, A., and Diaz-Guerra, M-J. (1994) Respective roles of glucose, fructose, and insulin in the regulation of the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 10213-10216

Efrat S, Leiser M, Wu IJ, Fusco-DeMane D, Emran OA, et al. 1994. Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic b-cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2051-55.

Epstein PN, Boschero AC, Atwater I, Xingang C, Overbeek PA. 1992. Expression of yeast hexokinase in pancreatic b cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances insulin secretion, and decreases diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12038-42.

Epstein PN, Overbeek, Means AR. 1989. Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice. *Cell* 58:1067-73

Epstein PN, Ribar TJ, Decker GL, Yaney G, Means AR. 1992. Elevated beta-cell calmodulin produces a unique insulin secretory defect in transgenic mice. *Endocrinology* 130:1387-93

Esser, V., Britton, C.H., Weis, B.C., Foster, D.W. & McGarry, J.D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5817-5822.

Eto K, Sakura H, Shimokawa K, Kadowaki H, Hagura R, et al. 1993. Sequence variations of the glucokinase gene in Japanese subject with NIDDM. *Diabetes* 42:1133-37

Feliu, J.E., Hue, L., and Hers, H.-G. (1977) Regulation "in vitro" and "in vivo" of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent inactivation of rat liver pyruvate kinase type-L. *Eur. J. Biochem.* **81**, 609-617

Ferre T, Pujol A, Riu E, Bosch F, Valera A. 1996. Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7225-30

Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A. 1996. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J.* 10: 1213-18

Ferrer J, Benito C, Gomis R. 1995. Pancreatic islet GLUT2 glucose transporter mRNA and protein expression in humans with and without NIDDM. *Diabetes* 44:1369-74

- Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M. et al. 1993. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 328:697-702
- Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P., Permutt, A., Beckmann, J.S., Bell, G.I., and Cohen, D. (1993) Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **328**, 697-702
- Garvey WT, Maianu L, Huecksteadt TP, Birnbaum MJ, Molina JM, Ciaraldi TP. 1991. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J. Clin. Invest.* 87:1072-81
- Gibbs EM, Stock JL, McCoid SC, Stukenbrok HA, Pessin JE, et al. 1995. Glycemic improvement in diabetic *db/db* mice overexpression of the human insulin-regulable glucose transporter (GLUT4). *J. Clin. Invest.* 95:1512-18
- Girard J, Ferre P, Foufelle F. 1997. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Ann. Rev. Nut.* 17:325-52
- Girard, J., Perdereau, D., Foufelle, F., Prip-Buus, C., and Ferré, P. (1994) Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J.* **8**, 36-42
- Gnudi L, Tozzo E, Shepherd PR, Bliss JL, Kahn BB. 1995. High level overexpression of glucose transporter-4 driven by an adipose -specific promoter is maintained in transgenic mice on a high fat diet, but does not prevent impaired glucose tolerance. *Endocrinology* 136:995-02
- Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. 1995. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic b cell glucoquinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* 83:69-78.
- Gulve EA, Ren J, Marshall BA, Gao J, Hansen PA, et al. 1994. Glucose transport activity in skeletal muscles from transgenic mice overexpressing GLUT1. *J. Biol. Chem.* 269:18366-70
- Hansen PA, Gulve EA, Marshall BA, GAO J, Pessin JE, et al. 1995. Skeletal muscle glucose transport and metabolism are enhanced in transgenic mice overexpressing the

- Glut4 glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 270:1679-84
- Hanson RW, Reshef L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 66:581-611
- Hariharan N, Farrelly D, Hagan D, Hillyer D, Arbeeny C. 1997. Expression of human hepatic glucokinase in transgenic mice liver results in decreased glucose levels and reduced body weight. *Diabetes* 46:11-16
- Hashimoto, S., Schmid, W. & Schutz, G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**. 6637-6641.
- Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., Lin, J.-L., Tsukuda, K., Akanuma, Y. & Takaku, F. (1990) *Diabetes* **39**, 441-446.
- Hebert LF, Daniels MC, Zhou J, Crook ED, Turner RL. 1996. Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphatase amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 98:930-36
- Hogan B, Costantini F, Lacy E. 1986. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Houseknecht KL, Zhu AX, Gnudi L, Hamann A, Zierath JR, et al. 1996. Overexpression of Ha-*ras* selectively in adipose tissue of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 271:11347-55
- Ikemoto S, Thompson KS, Itakura H, Lane MD, Ezaki O. 1995. Expression of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice: effect of exercise and role in glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:865-69
- Ikemoto S, Thompson KS, Takahashi M, Itakura H, Lane MD, Ezaki O. 1995. High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3096-99
- Ishihara H, Tashiro F, Ikuta K, Asano T, Katagiri H, et al. 1995. Inhibition of pancreatic b-cell glucokinase by antisense RNA expression in transgenic mice: mouse strain-dependent alteration of glucose tolerance. *FEBS Lett.* 371:329-32
- Ilyedjian, P.B. (1993) Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem. J.* **293**.1-13
- Jaenisch R. 1988. Transgenic Animals. *Science* 240:1468-74
- Jan CR, Ribar TJ, Means AR, Augustine GJ. 1996. Alterations in calcium channel

- currents underlie defective insulin secretion in a transgenic mouse. *J. Biol. Chem.* 271:15478-85
- Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Bucchini D. 1996. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J.* 15:1542-47
- Kahn BB. 1996. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45:1644-55
- Kahn, C.R., Lauris, V., Koch, S., Crettaz, M. & Granner, D.K. (1989) *Mol. Endocrinol.* 3, 840-845.
- Kato G.J, Dang CV. 1992. Function of the c-Myc oncoprotein. *FASEB J.* 6:3065-72
- Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. 1995. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377:151-55
- Katz, E.B., Stenbit, A.E., Hatton, K., DePinho, R., and Charron, M.J. (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377, 151-155
- Keppler, D., and Decker, K. (1981) Glycogen. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., Ed in Chief) Vol.VI, pp. 11-18 Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Koranyi L, James D, Muecler M, Permutt MA. 1990. Glucose transporter levels in spontaneously obese (*db/db*) insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* 85:962-67
- Laakso M, Malkki M, Kekalainen P, Kuusisto J, Deeb SS. 1994. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 94:1141-46
- Larner, J. (1990) Insulin and the stimulation of glycogen synthesis. The road from glycogen structure to glycogen synthase to cyclic AMP-dependent protein kinase to insulin mediators. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63, 173-231
- Lawrence JC, Roach PJ. 1997. New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes* 46:541-47
- LeCam, A., Guillouzo, A., and Freychet, P. (1976) Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxic conditions. Cryopreservation of hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 98, 382-395
- Lefrançois-Martinez, A.M., Diaz-Guerra, M.J., Vallet, V., Kahn, A., and Antoine. B.

- (1994) Glucose-dependent regulation of the L-pyruvate kinase gene in a hepatoma cell line is independent of insulin and cyclic AMP. *FASEB J.* **8**, 89-96
- Lemaigre, F.P., and Rousseau, G.G. (1994) Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* **303**, 1-14
- Liang Y, Matschinsky FM. 1994. Mechanisms of action of nonglucose insulin secretagogues. *Ann. Rev. Nutr.* **14**:59-81
- Liu M, Gibbs EM, McCoid SC, Milici AJ, Stukenbrok HA. 1993. Transgenic mice expressing the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11346-50
- Liu, J., Park, E.A., Gurney, A.L., Roesler, W.J. & Hanson, R.W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19095-10102.
- Lüscher B, Eisenman RN. 1990. New light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes & Dev.* **4**:2025-35
- Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, et al. 1990. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science.* **249**:655-59
- Majzoub JA, Muglia LJ. 1996. Molecular medicine: knockout mice. *N. Engl. J. Med.* **334**:904-7
- Manchester J, Skurat AV, Roach P, Hauschka SD, Lawrence JC. 1996. Increased glycogen accumulation in transgenic mice overexpressing glycogen synthase in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:10707-11
- Mandarino LJ, Printz RL, Cusi KA, Kinchington P, O'Doherty RM. et al. 1995. Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein and activity in human muscle. *Am J. Physiol.* **269**:E701-08
- Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. 1992. myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:809-60
- Marshall BA, Ren J, Johnson DW, Gibbs EM, Lillquist JS, et al. 1993. Germline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **268**:18442-45
- Marth JD. 1996. Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination. *J. Clin. Invest.* **98**:1999-1002

- McClain DA, Crook ED. 1996. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45:1003-09
- McGarry J.D. & Foster, D.W. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 395-420.
- McGarry, J.D. (1992) *Science* **258**, 766-770.
- McGrane MM, Yun JS, Moorman AF, Lamers WH, Hendrick GK, et al. 1990. Metabolic effect of developmental, tissue-, and cell-specific expression of a chimeric P-enolpyruvate carboxykinase (GTP)/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 265:22371-79
- McKenzie FR, Milligan G. 1990. Delta-opioid-receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in transduced specifically by the guanine-nucleotide-binding protein Gi2. *Biochem. J.* 267:391-98
- Meyer, S., Höppner, W. & Seitz, H.J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 985-991.
- Michal, G. (1981) Glucose 6-Phosphate. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., Ed in Chief) Vol.VI, pp. 185-190 Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Mori H, Hashiramoto M, Kishimoto M, Kasuga M. 1995. Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:2822-26
- Moxham CM, Hod Y, Malbon CC. 1993. Induction of G_{ia2}-specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth. *Science* 260:991-95
- Moxham CM, Malbon CC. 1996. Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit G_{ia2}. *Nature* 379:840-44
- Mueckler M, Kruse M, Strube M, Riggs AC, Chiu KC, Permutt MA. 1994. A mutation in the GLUT2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity. *J. Biol. Chem.* 269:17765-67
- Munnich, A, Lyonnet, S., Chauvet, D., Van Schaftingen, E., and Kahn, A. (1987) Differential effects of glucose and fructose on liver-L-type pyruvate kinase gene expression in vivo. *J. Biol. Chem.* **262**, 17065-17071
- Myers MG, White MF. 1996. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Ann.Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:615-58
- Newgard CB, McGarry JD. 1995. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell

- signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* 64:689-719
- Newgard CB. 1996. Regulatory role of glucose transport and phosphorylation in pancreatic islet β -cell. *Diab. Rev.* 4:191-206
- Niswender KD, Postic C, Jetton TL, Bennett BD, Piston DW, et al. 1997. Cell-specific expression and regulation of a glucokinase gene locus transgene. *J. Biol. Chem.* 272:22564-69
- Niswender KD, Shiota M, Postic C, Cherrington AD, Magnuson MA. 1997. Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 272:22570-75
- O'Brien, R.M., Lucas, P.C., Forest, C.D, Magnuson, M.A. & Granner, D.K. (1990) *Science*, **249**, 533-537.
- Olson AL, Liu M, Moye-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. 1993. Hormonal/metabolic regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 268:9839-46
- Olson AL, Pessin JE. 1996. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Ann. Rev. Nut.* 16:235-56
- Osterop AP, Medema R, Bos J, Zon GVD, Moller D, et al. 1992. Relation between the insulin receptor number in cells, autophosphorylation and insulin-stimulated Ras.GTP formation. *J. Biol. Chem.* 267:14647-53
- Patti M, Sun X, Bruening JC, Araki E, Lipes MA, White MF, Kahn CR. 1995. 4PS/Insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 270:24670-73
- Pedersen O, Kahn CR, Kahn BB. 1992. Divergent regulation of the Glut1 and Glut4 glucose transporters in isolated adipocytes from Zucker rats. *J. Clin. Invest.* 89:1964-73
- Philipson LH, Rosenberg MP, Kuznetsov A, Lancaster ME, Worley III JF, et al. 1994. Delayed rectifier K^+ channel overexpression in transgenic islets and β -cells associated with impaired glucose responsiveness. *J. Biol. Chem.* 269:27787-90
- Pickup J.C. & Williams, G., Eds., (1994) *Chronic Complications of Diabetes*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Pilkis SJ, Granner DK. 1992. Molecular physiology of the regulation of hepatic

- gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54:885-909
- Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. 1996. Non-insulin-dependent diabetes mellitus-A genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N. Engl. J. Med.* 334:777-83
- Porrás A, Nebrada AR, Benito M, Santos E. 1992. Activation of Ras by insulin in 3T3 L1 cells does not involve GTPase-activating protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 267:21124-31
- Postic C, Leturque A, Printz RL, Maulard P, Loizeau M, et al. 1994. Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat. *Am. J. Physiol.* 266:E548-59
- Printz RL, Koch S, Potter LR, O'Doherty RM, Tiesinga JJ, et al. 1993. Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J. Biol. Chem.* 268:5209-19
- Printz RL, Magnuson MA, Granner DK. 1993. Mammalian glucokinase. *Annu. Rev. Nutr.* 13:463-96
- Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UAK, Muller W, et al. 1996. Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest.* 98:600-03
- Rea S, James DE. 1997. Moving GLUT4. The biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 46:1667-77
- Ren J, Marshall A, Gulve EA, Gao J, Johnson DW, et al. 1993. Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 268:16113-15
- Ren J, Marshall BA, Mueckler MM, McCaleb M, Amatruda JM, Shulman GI. 1994. Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J. Clin. Invest.* 95:429-32
- Ribar TJ, Jan CR, Augustine GJ, Means AR. 1995. Defective glycolysis and calcium signaling underlie impaired insulin secretion in a transgenic mouse. *J. Biol. Chem.* 270:28688-95
- Riu E, Bosch F, Valera A. 1996. Prevention of diabetic alterations in transgenic mice overexpressing myc in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2198-2202

- Roach, P.J. (1986) *The Enzymes* **22**, 499-539.
- Rodriguez-Gil, J.E., Gómez-Foix, A.M., Ariño, J., Guinovart, J.J. & Bosch F. (1989) *Diabetes* **38**, 793-798.
- Rosella G, Zajac JD, Baker L, Kaczmarczyk SJ, Andrikopoulos, S, et al. 1995. Impaired glucose tolerance and increased weight gain in transgenic rats overexpressing a non-insulin-dependent-responsive phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Endocrinol.* 9:1396-1404
- Rothman, D.L., Shulman, R.G., and Shulman, G.I. (1992) ³¹P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **89**, 1069-1075
- Schaefer EM, Viard V, Morin J, Ferré P, Pénicaud M, et al. 1994. A new transgenic mouse model of chronic hyperglycemia. *Diabetes* 43:143-53
- Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB. 1993. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 268:22243-46
- Shih, H.M., and Towle, H.C. (1992) Definition of the rat carbohydrate response element of the rat S14 gene. Evidence for a common factor required for carbohydrate regulation of hepatic genes. *J. Biol. Chem.* **267**, 13222-13228
- Shih, H.M., and Towle, H.C. (1994) Definition of the rat carbohydrate response element of the rat S14 gene. Context of the CACGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 9380-9387
- Shimada F, Makino H, Hashimoto N, Taira M, Seino S, et al. 1993. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus associated with a mutation of the glucokinase gene in a Japanese family. *Diabetologia* 36:433-37
- Shockett PE, Schatz DG. 1996. Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5173-76
- Short, M.K., Clouthier, E., Schaefer, I.M., Hammer, R.E., Magnuson, M.A., and Beale, E.G. (1992) Tissue-specific, developmental, hormonal, and dietary regulation of rat P-enolpyruvate carboxykinase-human growth hormone fusion genes in transgenic mice.

Mol. Cell. Biol. **12**, 1007-1020

Simonds WF, Goldsmith PK, Codina J, Unson CG, Spiegel AM. 1989. Gi2 mediates alpha 2-adrenergic inhibition of adenylyl cyclase in platelet membranes: in situ identification with G alpha C-terminal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7809-12

Stenbit AE, Burcelin R, Katz EB, Tsao T, Gautier N, et al. 1996. Diverse Effects of Glut 4 ablation on glucose uptake and glycogen synthesis in red and white skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* **98**:629-34

Stenbit AE, Tsao T, Li J, Burcelin R, Geenen DL, et al. 1997. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nature Med.* **3**:1096-01

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi t, Sakura H, et al. 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**:182-86

Taylor, R. & Agius, L. (1988) *Biochem. J.* **250**, 625-640.

Terauchi Y, Iwamoto K, Tamemoto H, Komeda K, Ishii C, et al. 1997. Development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the double knockout mice with disruption of insulin receptor substrate-1 and b cell glucokinase genes. *J. Clin. Invest.* **99**:861-66

Terauchi Y, Sakura H, Yasuda K, Iwamoto K, Takahashi N, et al. 1995. Pancreatic b-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. *J. Biol. Chem.* **270**:30253-56

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, (1993) *N. Engl. J. Med.* **329**, 977-986.

Tokuyama Y, Sturis J, DePaoli AM, Takeda J, Stoffel M, et al. 1995. Evolution of β -cell dysfunction in the male Zucker diabetic rat. *Diabetes* **44**:1447-57

Towle HC, Kaytor EN, Shih H-M. 1997. Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Ann. Rev. Nut.* **17**:405-33

Tozzo E, Kahn BB, Pilch PF, Kandrор KV. 1996. Glut4 is targeted to specific vesicles in adipocytes of transgenic mice overexpressing Glut4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **271**:10490-94

Tozzo E, Shepherd PR, Gnudi L, Kahn BB. 1995. Transgenic GLUT-4 overexpression in fat enhances glucose metabolism: preferential effect on fatty acid synthesis. *Am. Physiol. Soc.* **268**:956-64

- Treadway JL, Hargrove DM, Nardone NA, McPherson K, Russo JF, et al. 1994. Enhanced peripheral glucose utilization in transgenic mice expressing the human GLUT4 gene. *J. Biol. Chem.* 269:29956-61
- Trus, M.D., Zawalich, W.S., Burch, P.T., Berner, D.K., Weil, V.A. & Matschinsky, F.M. (1981) Regulation of glucose metabolism in pancreatic islets. *Diabetes* 30, 911-922
- Tsao T, Burcelin R, Katz EB, Huang L, Charron MJ. 1996. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. *Diabetes* 45:28-36
- Tsao T, Stenbit AE, Li J, Houseknecht KL, Zierath JR. 1997. Muscle-specific transgenic complementation of GLUT4-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 100:671-77
- Unger RH. 1991. Diabetic Hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic β cells. *Science* 251:1200-05
- Valera A, Solanes G, Fernández-Alvarez J, Pujol A, Ferrer J, et al. 1994. Expression of GLUT-2 antisense RNA in β cells of transgenic mice leads to diabetes. *J. Biol. Chem.* 269:28543-46
- Valera A, Bosch F. 1994. Glucokinase expression in rat hepatoma cells induces glucose uptake and is rate limiting in glucose utilization. *Eur. J. Biochem.* 222:533-39
- Valera A, Fillat C, Costa C, Visa J, Sabater J, et al. 1994. Regulated expression of human insulin in the liver of transgenic mice corrects diabetic alterations. *FASEB J.* 8:440-7
- Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F. 1994. Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9151-54
- Valera A, Pujol A, Visa J, Gregori X, Riu E, Bosch F. 1995 Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis. *FASEB J.* 9:1067-78
- Valera, A., Pelegrín, M., Asins, G., Fillat, C., Pujol, A. & Bosch F. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 6267-6270.
- Valera, A., Pujol, A., Pelegrin, M., and Bosch, F. (1994) Transgenic mice overexpressing P-enolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9151-9154
- Valera, A., Rodriguez-Gil, J.E. & Bosch, F. (1993) *J. Clin. Invest.* 92, 4-11.
- Van Schaftingen, E., Dethoux, M., and Veiga Da Cunha, M. (1994) Short-term control of

- glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J.* **8**, 414-419
- Vaulont, S., and Kahn, A. (1994) Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* **8**, 28-35
- Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI. et al. 1992. Non-sense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* **356**:721-22
- Vos-McCowan ME, Bonner-Weir S, Klevay LM, Epstein PN. 1993. A yeast hexokinase transgene decreases pancreatic insulin and transiently reduces diabetes. *Transgene* **1**:103-11.
- Vos-McCowan ME, Xu B, Epstein PN. 1994. Insulin synthesis, secretory competence, and glucose utilization are sensitized by transgenic yeast hexokinase. *J. Biol. Chem.* **269**:15814-18.
- White MF. 1997. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* **40**:S2-S17
- Woeltje, K.F., Esser, V., Weis, B.C., Cox, W.F., Schroeder, J.G., Liao, S-T., Foster, D.W. & McGarry, J.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10714-10719.
- Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, et al. 1996. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3074-84
- Zhong Xu, L., Harrison, R.W., Weber, I.T. & Pilkis S.J.(1995) Human b-Cell Glucokinase. *J.Biol.Chem.* **270**, 9939-9946

Correction of diabetic alterations by glucokinase

TURA FERRE*, ANNA PUJOL*, EFREN RIU, FATIMA BOSCH, AND ALFONS VALERA†

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain

Communicated by Charles R. Park, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, February 26, 1996 (received for review September 15, 1995)

ABSTRACT Hyperglycemia is a common feature of diabetes mellitus. It results from a decrease in glucose utilization by the liver and peripheral tissues and an increase in hepatic glucose production. Glucose phosphorylation by glucokinase is an initial event in glucose metabolism by the liver. However, glucokinase gene expression is very low in diabetic animals. Transgenic mice expressing the P-enolpyruvate carboxykinase/glucokinase chimeric gene were generated to study whether the return of the expression of glucokinase in the liver of diabetic mice might prevent metabolic alterations. In contrast to nontransgenic mice treated with streptozotocin, mice with the transgene previously treated with streptozotocin showed high levels of both glucokinase mRNA and its enzyme activity in the liver, which were associated with an increase in intracellular levels of glucose 6-phosphate and glycogen. The liver of these mice also showed an increase in pyruvate kinase activity and lactate production. Furthermore, normalization of both the expression of genes involved in gluconeogenesis and ketogenesis in the liver and the production of glucose and ketone body by hepatocytes in primary culture were observed in streptozotocin-treated transgenic mice. Thus, glycolysis was induced while gluconeogenesis and ketogenesis were blocked in the liver of diabetic mice expressing glucokinase. This was associated with normalization of blood glucose, ketone bodies, triglycerides, and free fatty acids even in the absence of insulin. These results suggest that the expression of glucokinase during diabetes might be a new approach to the normalization of hyperglycemia.

The liver has a central role in maintaining glucose homeostasis. When the plasma glucose is high, the liver takes up glucose, replenishes depleted glycogen stores, and then synthesizes fatty acids (1). Glucose transport and phosphorylation are the first steps in glucose utilization. In the liver, glucose is transported by two members of the facilitative glucose transporter (GLUT) family, GLUT1 and GLUT2 (2). In nondiabetic animals, GLUT2 provides glucose to hepatocytes at a rate that is 600 times greater than the rate of phosphorylation by hexokinase and 100 times higher than the rate of phosphorylation by glucokinase (GK; ref. 3). Thus, glucose phosphorylation by GK seems to be key in the regulation of glucose utilization by hepatocytes. This enzyme, in contrast to other hexokinases, has a high K_m for glucose (5–8 mM), and its activity is not inhibited by physiological concentrations of glucose 6-phosphate (4, 5). Regulation of GK activity is mainly due to changes in the transcription of its gene. Insulin increases while glucagon inhibits liver GK gene transcription, and these effects are not glucose-dependent. However, the transcriptional activation of glycolytic and lipogenic genes in hepatocytes requires the presence of both glucose and insulin, neither of which are active alone (6, 7). The main role of insulin in the activation of glycolytic genes appears to be the stimulation of GK synthesis, which leads to increased glucose phosphorylation. The expression of GK in rat hepatoma cell lines, which

lack endogenous GK gene expression, results in an induction of glucose uptake and metabolism (8). Glucose/carbohydrate regulatory elements have already been located in the promoter of genes coding for some of the enzymes of glycolysis and lipogenesis (6). The insulin effect on glucose-dependent activation of the L-type pyruvate kinase gene promoter in hepatocytes can be mimicked by a GK expression vector (9). The lack of insulin in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and the insensitivity to insulin and relative insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) lead to a decrease in glucose utilization by the liver, muscle, and adipose tissue and to an increase in the hepatic glucose production (10, 11). During diabetes, GK gene expression and the enzyme activity are very low, and thus the liver is unable to metabolize blood glucose (4, 5).

The cytosolic form of P-enolpyruvate carboxykinase (PEPCK) is a regulatory enzyme of gluconeogenesis. PEPCK activity is regulated by the transcription rate of its gene. Glucagon activates while insulin inhibits PEPCK gene transcription (12, 13). Thus, the expression of the PEPCK gene is greatly induced during diabetes. PEPCK gene transcription is suppressed during fetal development and enhanced at birth (14). Fragments of the PEPCK promoter of ≈ 500 bp can regulate the expression of chimeric genes, in a manner like the endogenous PEPCK gene, in the liver of transgenic mice (14, 15).

Chronic hyperglycemia has been postulated to be the main factor responsible for the development of diabetes-specific microvascular pathology in the retina and renal glomerulus and in neurological and macrovascular complications (16). The reduction of hyperglycemia, and thus the maintenance of normoglycemia, is a goal of any therapeutical approach for IDDM and NIDDM. In this study, we examine the capacity of the PEPCK promoter to direct the expression of the GK gene in the liver of diabetic transgenic mice. We aimed to determine whether the return of GK expression in diabetes was able to induce glucose utilization and to block glucose production by the liver and, if so, to assess the contribution of the liver to the reduction of hyperglycemia and the other diabetic alterations.

MATERIALS AND METHODS

Construction of the PEPCK/GK Chimeric Gene and Generation of Transgenic Mice. To obtain the PEPCK/GK chimeric gene, we used a 2.3-kb *EcoRI-EcoRI* fragment containing the entire coding sequence and the polyadenylation signal of the rat GK cDNA (gift of P. Iynedjian, University of Geneva, Geneva, Switzerland). It was introduced at an *EcoRI* site newly created in the PEPCK/insulin chimeric gene (17). This chimeric gene was used as a liver expression vector to obtain regulated expression and mRNA stabilization from

Abbreviations: GK, glucokinase; PEPCK, P-enolpyruvate carboxykinase; GLUT, glucose transporter; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus; Stz, streptozotocin; HMG-CoA synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; CPT, carnitine palmitoyltransferase.

*T.F. and A.P. contributed equally to this work.

†To whom reprint requests should be addressed.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

cDNAs in transgenic mice. The construction of the PEPCK/GK chimeric gene was initiated by subcloning the *Bgl*II-*Sph*I fragment of the PEPCK/insulin chimeric gene, which includes the first exon and the translation initiation site of the human insulin gene at the pSP72 polylinker. To destroy the ATG translation start site, which was contained in a unique *Nco*I restriction site, this fragment of the insulin gene was digested with *Nco*I and treated with mung bean nuclease to remove the single-stranded overhangs produced by the restriction enzyme. Afterwards, an *Eco*RI linker (Boehringer Mannheim) was introduced to generate a new *Eco*RI subcloning site. Then, the *Eco*RI-*Eco*RI fragment of GK cDNA was introduced at this new *Eco*RI site. Finally, the *Bgl*II-*Sph*I fragment of the human insulin gene containing the full-length GK cDNA was reinserted into the PEPCK/insulin chimeric gene. The final plasmid was designated pPEPCK/GK. A 4.5-kb *Xba*I-*Sph*I fragment, containing the entire PEPCK/GK chimeric gene, was microinjected into fertilized eggs (see Fig. 1A). The expression of this chimeric gene leads to a 2.5-kb mRNA transcript when polyadenylated at the end of the GK cDNA. The general procedures for microinjection of the chimeric gene were as described (18). At 3 weeks of age, the animals were tested for the presence of the transgene by Southern blot of 10 μ g of tail DNA digested with *Eco*RI. Blots were hybridized with a 2.3-kb *Eco*RI-*Eco*RI fragment containing the entire GK cDNA radiolabeled with [α -³²P]dCTP [3000 Ci/mmol (1 Ci = 37 GBq); Amersham] by random oligopriming (Boehringer Mannheim). Mice were fed ad libitum with a standard diet (Panlab, Barcelona, Spain) and maintained under a light/dark cycle of 12 h (lights on at 8:00 a.m.). Diabetes was induced by injection through the jugular vein of 2 mg of streptozotocin (Stz) per 10 g of body weight on 2 consecutive days. Stz (Sigma) was dissolved in 10 mM sodium citrate with 0.9% NaCl (pH 4.5) immediately before administration. Mice were used 7 days after Stz treatment. Diabetes was assessed by blood glucose and urine glucose and ketone levels (Accutrend and Gluketur Test; Boehringer Mannheim). Animals were killed and samples were taken between 9:00 and 10:00 a.m. In the experiments described below, male mice aged 4 to 8 weeks were used.

RNA Analysis. Total RNA was obtained from liver by the guanidine isothiocyanate method (19), and RNA samples (30 μ g) were electrophoresed on a 1% agarose gel containing 2.2 M formaldehyde. Northern blots were hybridized to ³²P-labeled GK, L-type pyruvate kinase, and GLUT2 and GLUT1 cDNA probes as indicated in ref. 20 and also to the following probes: PEPCK, a 1.1-kb *Pst*I-*Pst*I fragment from the 3'-end of the rat PEPCK cDNA (gift of R. W. Hanson, Case Western Reserve University, Cleveland, OH); tyrosine aminotransferase, a 0.6-kb *Pst*I-*Pst*I fragment that includes the 3'-end of the rat cDNA (gift of G. Schütz, Institut für Zell und Tumorbologie, Heidelberg, Germany); mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase), a 1.43-kb *Eco*RI-*Eco*RI fragment of the rat cDNA (gift of F. G. Hegardt, University of Barcelona, Barcelona, Spain); carnitine palmitoyltransferase (CPT)-I, a 2.6-kb *Eco*RI-*Eco*RI fragment of rat CPT-I cDNA (gift of J. D. McGarry, University of Texas, Dallas, TX); and CPT-II, a 1.8-kb *Eco*RI-*Bam*HI fragment of rat CPT-II cDNA (gift of J. D. McGarry). The β -actin probe corresponded to a 1.3-kb *Eco*RI-*Eco*RI fragment of the rabbit cDNA. These probes were labeled using [α -³²P]dCTP, following the method of random oligopriming as described by the manufacturer. Specific activity of the DNA probe was $\approx 10^9$ cpm/ μ g DNA. Membranes were placed in contact with Kodak XAR-5 films. The β -actin signal was used to correct for loading inequalities.

Preparation and Incubation of Hepatocytes. Hepatocytes were isolated between 10:00 and 11:00 a.m. from fed normal and diabetic mice as described (21). After removing nonparenchymal cells and debris, hepatocytes were resuspended in

DMEM (GIBCO) containing 0.2% albumin and 10% fetal calf serum (Boehringer Mannheim). Cells (5.5×10^6) were plated in 10 ml of this medium on collagen-coated dishes and maintained at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. After 4 h, the medium was removed and cells were washed three times in DMEM in the absence of either serum or glucose. Subsequently, 10 ml of DMEM without serum but with 25 mM glucose were added to the cells, which were maintained in this medium for up to 24 h. Aliquots of 100 μ l of medium were taken at different times, and lactate production was determined. To measure glucose and ketone body production, other hepatocytes were incubated in 10 ml of DMEM without glucose and supplemented with 16 mM lactate plus 4 mM pyruvate for up to 24 h. Aliquots of 100 μ l of medium were taken at different times, and glucose and β -hydroxybutyrate concentrations were determined.

Enzyme, Metabolite, and Hormone Assays. To measure GK activity, liver samples were homogenized in an ice-cold buffer (pH 7.4) containing 50 mM Tris-HCl, 300 mM sucrose, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, and 0.7 μ l of 2-mercaptoethanol per ml. To determine pyruvate kinase activity, the liver was homogenized in an ice-cold buffer containing 100 mM KCl, 1 mM EDTA, and 0.7 μ l of 2-mercaptoethanol per ml. These activities were analyzed in 12,000 \times g supernatants (22, 23). GK activity was calculated as the difference between the glucose phosphorylation capacity at 100 and 0.5 mM glucose, and hexokinase activity as the glucose phosphorylating capacity at 0.5 mM glucose. Pyruvate kinase activity was determined at 5 mM P-enolpyruvate (total activity). To measure PEPCK activity, liver samples were homogenized in an ice-cold buffer (pH 7.4) containing 50 mM glycylglycine, 120 mM KCl, 1 mM DTT, 20 units of Trasylol per ml, and 100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride. Afterwards, PEPCK activity was analyzed in 12,000 \times g supernatants as indicated by Chang and Lane (24). The concentrations of insulin and glucose in serum, of glycogen, glucose 6-phosphate, and lactate in liver extracts, and of glucose and lactate in the incubation media of hepatocytes were measured as described in ref. 20. Glucose was also determined in 20 μ l of blood by using an Accutrend analyzer (Boehringer Mannheim). The β -hydroxybutyrate levels in serum and in the incubation medium of hepatocytes were measured by the β -hydroxybutyrate dehydrogenase technique (Boehringer Mannheim). Serum triglycerides were determined enzymatically (GPO-PAP; Boehringer Mannheim). Serum-free fatty acids were measured by the acyl-CoA synthase and acyl-CoA oxidase method (Wako Chemicals, Germany). Enzyme activities and metabolite concentrations are expressed as the means \pm SEMs. Analysis of statistical differences between data were performed using the Student-Newmann-Keuls test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The PEPCK/GK chimeric gene (Fig. 1A) was microinjected into fertilized eggs and nine transmitter-transgenic founder mice were obtained. In this study, we used F1 and F2 mice from the transgenic lines PEPCK/GK-6 (TgA) and PEPCK/GK-47 (TgB). TgA and TgB carried about five and 20 intact copies, respectively, of the PEPCK/GK chimeric gene when analyzed by Southern blot (data not shown). We used littermates as controls for the transgenic animals. A 2.5-kb transcript was detected in the livers of control and transgenic mice, resulting from the expression of both the endogenous GK gene (4, 5) and also the transgene, because of the chimeric gene used (Fig. 1B). No GK mRNA transcripts were detected in the liver of nontransgenic diabetic mice, while Stz-treated transgenic mice expressed significant levels of GK mRNA (Fig. 1B). Non-Stz-treated transgenic mice also showed an increase (≈ 2 -fold) in GK mRNA compared to control mice (Fig. 1B). The increase

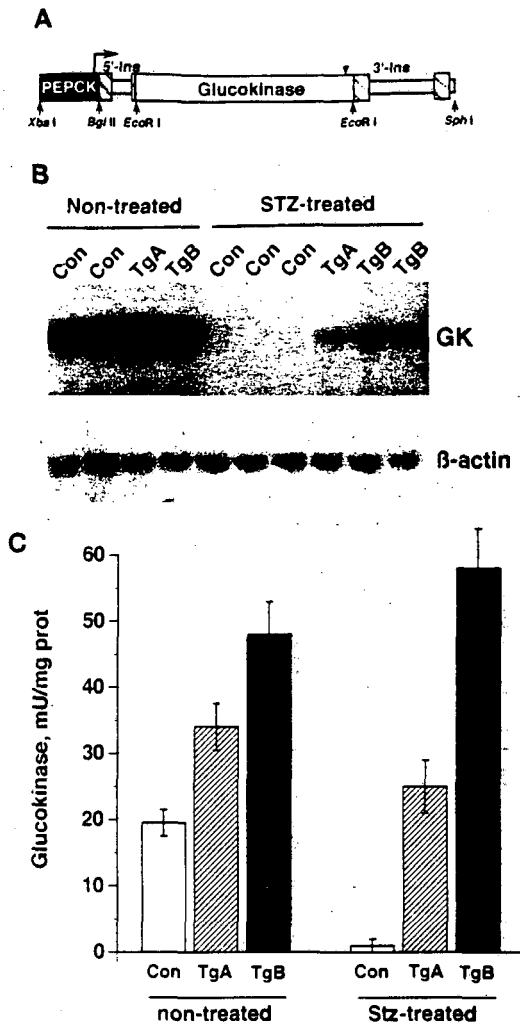


FIG. 1. Expression of GK in liver of diabetic mice. (A) Schematic representation of the PEPCK/GK chimeric gene. A 4.5-kb *Xba*I-*Sph*I fragment, containing the entire PEPCK/GK chimeric gene, was microinjected into fertilized eggs. The construction of this chimeric gene is described. (B) Expression of the transgene in liver. Total cellular RNA was obtained from non-treated and Stz-treated control (Con), and transgenic mice from the lines PEPCK/GK-6 (TgA) and PEPCK/GK-47 (TgB), as indicated. After transfer, membrane was tested for GK. (C) GK activity was determined in liver extracts obtained from non-treated and Stz-treated control (Con) and transgenic (Tg) mice from the lines PEPCK/GK-6 (TgA) and PEPCK/GK-47 (TgB), as indicated. Results are means \pm SEMs of 15 different animals in each group.

in the expression of GK was parallel to the activation of the enzyme. Glucokinase activity in the liver of healthy transgenic mice was 2-fold higher, in both TgA and TgB, than in controls (Fig. 1C). The enzyme activity in diabetic mice was extremely low. However, GK activity of diabetic TgA mice was similar to

that noted in healthy control mice, whereas diabetic TgB animals even showed higher GK activity than healthy control mice (Fig. 1C). These findings suggest that GK mRNA was translated and that the protein was stable in a diabetic environment. These results also indicated that the establishment of a certain level of GK mRNA in the liver of Stz-treated transgenic mice was enough to produce high enzyme activity. The results described below were obtained from the TgB line, which showed higher GK activity. However, an identical phenotype was observed with the TgA line.

In Stz-treated control mice, the reduction of GK activity was associated with a 75% decrease in the intracellular concentration of glucose 6-phosphate compared with healthy controls. In contrast, Stz-treated transgenic mice presented high levels of this metabolite, and they were similar to those of healthy control mice (Table 1). Glucose 6-phosphate is a substrate for the synthesis of glycogen as well as an allosteric activator of glycogen synthase (25). Transgenic mice expressing the PEPCK/GK chimeric gene accumulate more glycogen (\approx 2-fold) than control mice (Table 1). During diabetes, because of the lack of insulin and the increase in glucagon, glycogen synthase is phosphorylated and inactive (26, 27). As expected, no glycogen was stored in the liver of diabetic control mice. However, Stz-treated transgenic mice showed similar levels of glycogen to control healthy mice (Table 1), probably resulting, at least in part, from the increase of glucose 6-phosphate. Thus, the expression of the PEPCK/GK chimeric gene led to the rescue of glucose storage during diabetes and indicated that GK activity is probably rate-limiting for glycogen synthesis in hepatic cells. Similarly, we have already shown that FTO-2B and H4IIE hepatoma cells, which are unable to store glycogen (8), accumulate high levels of glycogen when infected with a retroviral vector carrying a PEPCK/GK chimeric gene expressing GK (8).

An induction of glucose utilization was also observed in transgenic mice. A main regulatory enzyme of glycolysis is the L-type pyruvate kinase. The L-PK gene is transcriptionally regulated—positively by glucose plus insulin and negatively by glucagon (6). A reduction in L-PK gene expression and enzyme activity was noted in the liver of diabetic control mice compared with healthy controls. However, both L-PK mRNA concentration and enzyme activity were higher (\approx 4-fold) in diabetic transgenic mice than in diabetic control mice and were similar to those of healthy transgenic mice (Fig. 2 and Table 1). Similarly, in hepatocytes in culture, transfection with a GK expression vector confer an insulin-independent glucose activation of L-PK gene promoter (9). The activation of L-PK during diabetes was associated with an increase in the intrahepatic content of lactate in the transgenic mice (Table 1). In addition, when hepatocytes from diabetic transgenic mice were cultured for up to 24 h in DMEM without serum, an increase in lactate production was detected compared to Stz-treated nontransgenic animals (Fig. 3A). The concentration of this metabolite was similar to that produced by non-Stz-treated control hepatocytes.

Table 1. Glucose storage and utilization

	Non-treated		STZ-treated	
	Con	Tg	Con	Tg
Glucose 6-P, nmol/g of liver	215 \pm 15	337 \pm 21	56 \pm 12	230 \pm 26
Glycogen, mg/g of liver	44 \pm 5	98 \pm 9	4 \pm 2	49 \pm 6
Pyruvate kinase, units/mg of prot	0.24 \pm 0.02	0.53 \pm 0.06	0.15 \pm 0.03	0.59 \pm 0.08
Lactate, μ mol/g of liver	0.23 \pm 0.03	0.44 \pm 0.04	0.06 \pm 0.02	0.25 \pm 0.4

Glucose storage and utilization in the liver of diabetic mice expressing GK. The concentrations of glycogen, glucose 6-phosphate, and lactate, and also the activity of pyruvate kinase, were measured in liver extracts obtained from non-treated and Stz-treated control (Con) and transgenic (Tg) mice, as indicated. Results are means \pm SEMs of 12 different animals in each group.

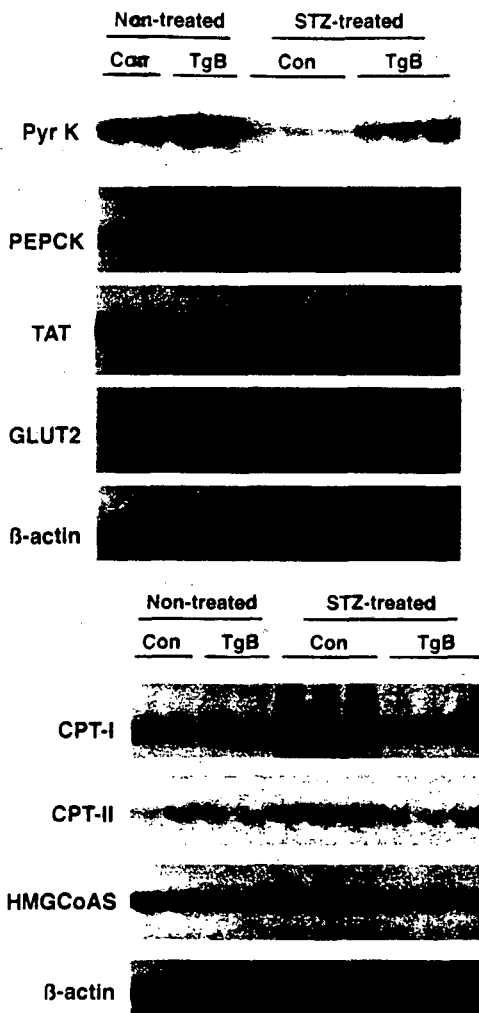


FIG. 2. The expression of key genes in the regulation of glucose and ketone body metabolism in the liver of diabetic mice expressing GK was determined by Northern analysis of total hepatic RNA obtained from non-treated and Stz-treated control (Con) and transgenic (Tg) mice, as indicated. Representative Northern blots hybridized with L-type pyruvate kinase (Pyr K), PEPCCK, tyrosine aminotransferase (TAT), GLUT2, CPT-I and CPT-II, and mitochondrial HMG-CoA synthase (HMG-CoAS) specific probes are presented.

In contrast to control mice treated with Stz, the Stz-treated transgenic mice showed a reduction in the expression of the gene for PEPCCK, which was induced by the diabetic process (Fig. 2). The changes in PEPCCK mRNA levels were parallel to changes in the enzyme activity. Although no differences were noted in PEPCCK activity between healthy control and transgenic mice [control, 4.9 ± 0.9 milliunits of protein per mg of body weight ($n = 10$) versus transgenic, 4.3 ± 0.3 milliunits of protein per mg of body weight ($n = 10$)], a strong reduction in PEPCCK activity was observed in diabetic transgenic mice compared to diabetic animals [Stz-control, 19.6 ± 1.0 milliunits of protein per mg of body weight ($n = 8$) versus Stz-transgenic, 5.9 ± 0.8 milliunits of protein per mg of body weight ($n = 8$)]. It has been reported that glucose reduces the rate of PEPCCK gene transcription in hepatocytes in culture and in FAO rat hepatoma cells (28, 29). In these cells, when the glucose concentration was increased, the rate of glucose uptake and utilization increased. Administration of glucose to diabetic rats also decreases PEPCCK mRNA levels in liver (29). The expression of the gene for the tyrosine aminotransferase, another enzyme involved in gluconeogenesis (30), was also normalized in the liver of diabetic transgenic mice compared to controls (Fig. 2). In agreement with these findings, glucose

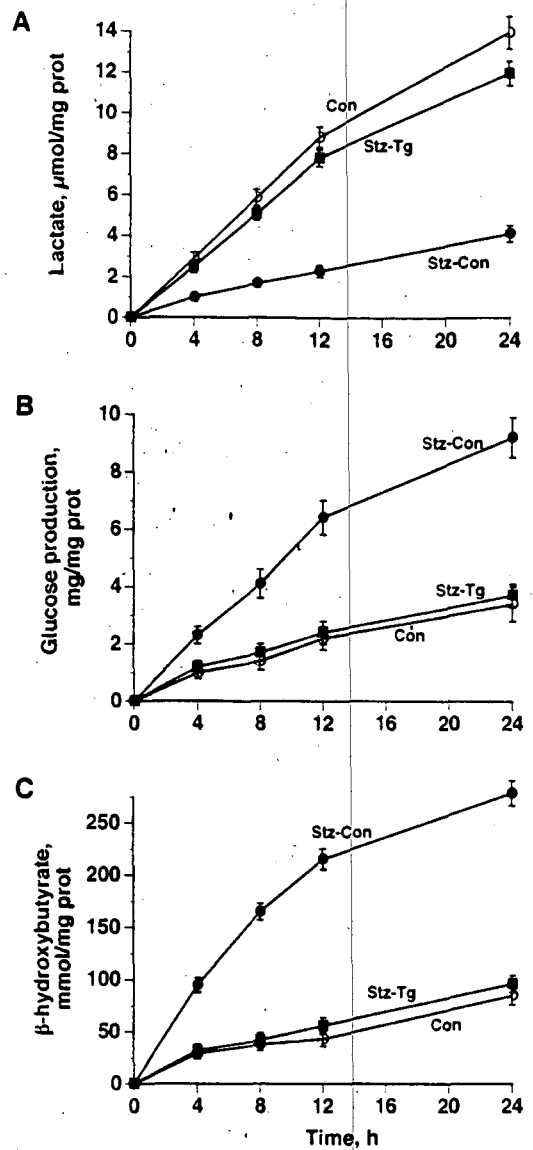


FIG. 3. Lactate, glucose and ketone body production by hepatocytes from diabetic mice expressing GK. For lactate production (A), primary cultures of hepatocytes from fed control (Con: \circ); diabetic control (\bullet); and diabetic transgenic (Tg: \blacksquare) mice were incubated in DMEM with 25 mM glucose. For glucose (B) and β -hydroxybutyrate production (C), primary cultures of hepatocytes were incubated in DMEM without glucose and with 16 mM lactate and 4 mM pyruvate. At the indicated times, an aliquot of the incubation medium was removed and concentrations of each metabolite were determined, as described. Results are means \pm SEM of three different experiments.

production from gluconeogenic precursors by hepatocytes in primary culture from diabetic transgenic mice was lower than that of diabetic mice and similar to that of healthy control mice (Fig. 3B). The decrease in hepatic glucose production by the liver of diabetic transgenic animals was also related with a decrease in the glucose transporter GLUT2 mRNA levels, which were increased in the liver of diabetic mice (Fig. 2), as reported (31). No changes were observed in the expression of GLUT1 between control and transgenic mice under the same conditions (data not shown). These results are similar to those reported in the liver of diabetic rats treated with vanadate (32). However, in the Stz-treated transgenic mice expressing the PEPCCK/GK chimeric gene, a signal was generated that blocked gluconeogenesis in the absence of insulin and thus overcame the effects of glucagon. These findings suggest that the increase in glucose 6-phosphate in the liver might induce

Table 2. Serum parameters

	Non-treated		Stz-treated	
	Con	Tg	Con	Tg
Glucose, mg/dl	207 ± 11	148 ± 9	>800	265 ± 14
Insulin, ng/ml	2.7 ± 0.3	1.5 ± 0.1	<0.2	<0.2
β -OH-butyrate, mmol/l	0.37 ± 0.06	0.30 ± 0.07	2.94 ± 0.3	0.49 ± 0.12
Triglycerides, mg/dl	129 ± 15	154 ± 12	365 ± 28	181 ± 15
FFAs, mmol/l	0.98 ± 0.1	0.78 ± 0.1	1.95 ± 0.2	0.83 ± 0.1

Serum parameters in transgenic mice expressing the PEPCK/GK chimeric gene. Serum parameters from non-treated and Stz-treated control (Con) and transgenic (Tg) mice were determined, as described. Results are means \pm SEMs of at least 15 different animals in each group.

a common mechanism that both increased the expression of key genes in glucose utilization and decreased the expression of those involved in glucose production. However, other mechanisms cannot be ruled out. The regulation by glucose 6-phosphate of specific transcription factor or factors, which could mediate these effects, has not been reported to date.

Induction of ketogenesis is a common feature of untreated IDDM (10, 11). The mitochondrial β -oxidation of fatty acids is initiated by the sequential action of two membrane-bound enzyme activities, CPT I and CPT II (33–35). These enzymes, responsible for the entrance of acyl-CoA to mitochondria and the mitochondrial HMG-CoA synthase, a regulatory enzyme of ketone body pathway (36), have been considered to control liver ketogenesis. Their activities increase during diabetes. It has also been described that cAMP, FFA, and diabetes induce, and insulin inhibits, the expression of HMG-CoA synthase gene (32, 37). No changes in the expression of the genes for these enzymes between healthy control and transgenic mice were noted. An increase in the mRNA concentration of CPT I, CPT II, and HMG-CoA synthase was observed in the liver of diabetic mice. However, Stz-treated transgenic mice showed similar mRNA levels to non-treated controls (Fig. 2). The reduction of CPT I, CPT II, and HMG-CoA synthase was related with a decrease in ketone body production by hepatocytes from diabetic transgenic mice cultured in the presence of gluconeogenic precursors, as compared to diabetic mice (Fig. 3C). The concentration of ketone body in the incubation medium of Stz-treated transgenic mice was similar to that of healthy control mice. These results indicated that ketogenesis was blocked in diabetic mice expressing the PEPCK/GK chimeric gene. The results obtained in the Stz-treated transgenic mice suggest that the activation of GK during diabetes induces a mechanism or mechanisms that coordinately block the expression of key genes in ketogenesis in the absence of insulin. This mechanism might be shared with that controlling the genes involved in gluconeogenesis, because both pathways are activated in the diabetic liver.

The changes in liver metabolism were associated with normalization of serum parameters altered during diabetes. Whereas diabetic control mice had high levels of blood glucose. Stz-treated transgenic mice showed a strong reduction of hyperglycemia (Table 2). All these mice had very low levels of circulating insulin. In addition, healthy transgenic mice showed a 20% decrease in the serum concentration of glucose and a 40% reduction in insulin levels compared with their nontransgenic siblings (Table 2), indicating that liver glucose metabolism determined the blood glucose and insulin set points in the mice. These results were consistent with the key role of the liver in whole body glucose homeostasis. Furthermore, in agreement with the blockage of CPT I, CPT II, and HMG-CoA synthase gene expression and ketone body production, serum β -hydroxybutyrate was normalized in diabetic transgenic mice compared with diabetic animals. The expression of the PEPCK/GK chimeric gene also led to normalization of circulating triglycerides and free fatty acids, which are markedly increased during diabetes (Table 2). These results indi-

cated that the return of glucose uptake by the liver was sufficient to normalize glucose, lipid, and ketone body metabolism. Finally, as expected, diabetic control mice lost body weight [a 25% reduction 15 days after Stz, from 21.4 \pm 0.5 g to 15.7 \pm 0.8 g ($n = 25$)]. However, the normalization of liver metabolism and serum parameters in the Stz-treated transgenic mice was also accompanied by the maintenance of body weight [from 20.3 \pm 0.6 g to 21.1 \pm 0.9 g ($n = 25$)].

The Diabetes Control and Complications Trial (38), designed to test the hypothesis that the complications of diabetes mellitus are related to a rise in the plasma glucose concentration, demonstrated that intensive insulin therapy can delay the onset and slow the progression of retinopathy, nephropathy, and neuropathy in patients with IDDM. Patients with NIDDM were not studied in the Diabetes Control and Complications Trial. Improvements in glycemic control could potentially reduce microvascular complications in patients with NIDDM. One concern about using intensive insulin therapy in NIDDM is that it might exacerbate macrovascular complications, the leading cause of morbidity and mortality in this disease (16). Hyperinsulinemia and insulin resistance, both very common in patients with NIDDM, are associated with increased risk of hypertension, coronary artery disease, and stroke, raising the possibility that insulin itself has atherogenic actions. However, both IDDM and NIDDM hyperglycemia might be reduced by increasing glucose uptake by liver and peripheral tissues. Our results suggest that the expression of GK during diabetes might be a useful approach to the reduction not only of diabetic hyperglycemia but also of ketoacidosis.

We thank R. W. Hanson for PEPCK promoter and cDNA; P. Iynedjian, A. Kahn, G. Schütz, G. Bell, M. Birnbaum, F. G. Hegardt, and J. D. McGarry for cDNAs; J. E. Feliu for helpful suggestions; R. Casamitjana for insulin measurements; R. Rycroft for critical reading of the manuscript; and C. H. Ros for technical assistance. A.P. and E.R. were recipients of predoctoral fellowships from Direcció General d'Universitats, Generalitat de Catalunya, Spain, and T.F. was a recipient of a fellowship from Fondo Investigación Sanitaria, Spain. This work was supported by grants from Fondo Investigación Sanitaria (FIS 94/0795) and the Juvenile Diabetes Foundation International.

- Pilkis, S. J. & Granner, D. K. (1992) *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885–909.
- Bell, G. I., Burant, C. F., Takeda, J. & Gould, G. W. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19161–19164.
- Axelrod, J. D. & Pilch, P. F. (1983) *Biochemistry* **22**, 2222–2227.
- Iynedjian, P. B. (1993) *Biochem. J.* **293**, 1–13.
- Printz, R. L., Magnuson, M. A. & Granner, D. K. (1993) *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 463–496.
- Vaulont, S. & Kahn, A. (1994) *FASEB J.* **8**, 28–35.
- Decaux, J. F., Marcillat, O., Pichard, A. L., Henry, J. & Kahn, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3432–3438.
- Valera, A. & Bosch, F. (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**, 533–539.
- Doiron, B., Cuif, M.-H., Kahn, A. & Diaz-Guerra, M.-J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10213–10216.
- Taylor, R. & Agius, L. (1988) *Biochem. J.* **250**, 625–640.
- McGarry, J. D. (1992) *Science* **258**, 766–770.
- Liu, J., Park, E. A., Gurney, A. L., Roesler, W. J. & Hanson, R. W. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19095–19102.

13. O'Brien, R. M., Lucas, P. C., Forest, C. D., Magnuson, M. A. & Granner, D. K. (1990) *Science* **249**, 533-537.
14. McGrane, M. M., Yun, J. S., Moorman, A. F., Lamers, W. H., Hendrick, G. K., Arafah, B. M., Park, E. A., Wagner, T. E. & Hanson, R. W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 22371-22379.
15. Short, M. K., Clouthier, E., Schaefer, I. M., Hammer, R. E., Magnuson, M. A. & Beale, E. G. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1007-1020.
16. Pickup J. C. & Williams, G., eds. (1994) *Chronic Complications of Diabetes*. (Blackwell Scientific, Oxford, U.K.)
17. Valera, A., Fillat, C., Costa, C., Visa, J., Sabater, J., Pujol, A. & Bosch F. (1994) *FASEB J.* **8**, 440-447.
18. Hogan, B., Costantini, F. & Lacy, E. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
19. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. W., McDonald, R. J. & Rutter, W. J. (1979) *Biochemistry* **18**, 5294-5299.
20. Valera, A., Pujol, A., Gregori, X., Riu, E., Visa, J. & Bosch, F. (1995) *FASEB J.* **9**, 1067-1078.
21. LeCam, A., Guillouzo, A. & Freychet, P. (1976) *Exp. Cell Res.* **98**, 382-395.
22. Davidson, A. L. & Arion, W. J. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **253**, 156-176.
23. Feliu, J. E., Hue, L. & Hers, H.-G. (1977) *Eur. J. Biochem.* **81**, 609-617.
24. Chang H. C. & Lane, M. D. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 2413-2420.
25. Lerner, J. (1990) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **63**, 173-231.
26. Roach, P. J. (1986) *The Enzymes* **22**, 499-539.
27. Rodriguez-Gil, J. E., Gómez-Foix, A. M., Ariño, J., Guinovart, J. J. & Bosch F. (1989) *Diabetes* **38**, 793-798.
28. Kahn, C. R., Lauris, V., Koch, S., Crettaz, M. & Granner, D. K. (1989) *Mol. Endocrinol.* **3**, 840-845.
29. Meyer, S., Höppner, W. & Seitz, H. J. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 985-991.
30. Hashimoto, S., Schmid, W. & Schutz, G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6637-6641.
31. Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., Lin, J.-L., Tsukuda, K., Akanuma, Y. & Takaku, F. (1990) *Diabetes* **39**, 441-446.
32. Valera, A., Rodriguez-Gil, J. E. & Bosch, F. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 4-11.
33. McGarry J. D. & Foster, D. W. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 395-420.
34. Woeltje, K. F., Esser, V., Weis, B. C., Cox, W. F., Schroeder, J. G., Liao, S.-T., Foster, D. W. & McGarry, J. D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10714-10719.
35. Esser, V., Britton, C. H., Weis, B. C., Foster, D. W. & McGarry, J. D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5817-5822.
36. Valera, A., Pelegrín, M., Asins, G., Fillat, C., Pujol, A. & Bosch F. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6267-6270.
37. Casals, N., Roca, N., Guerrero, M., Gil-Gomez, G., Ayté, J., Ciudad, C. J. & Hegardt, F. G. (1992) *Biochem. J.* **283**, 261-264.
38. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) *N. Engl. J. Med.* **329**, 977-986.

Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver

TURA FERRE, EFREN RIU, FATIMA BOSCH, AND ALFONS VALERA¹

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular i Servei de Biotecnologia Animal, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain

ABSTRACT To study the role of glucokinase (GK) in the control of glucose metabolism in the liver, transgenic mice were generated in which GK was overexpressed under control of the P-enolpyruvate carboxykinase gene promoter. Whereas the expression of the GK gene in starved control mice was blocked, this promoter was able to direct the expression of the enzyme to the liver of starved transgenic mice. Furthermore, starved transgenic mice showed levels of GK activity fourfold higher than those of starved control and similar to those of fed control. This activation of GK led to an increase in the intracellular concentration of glucose 6-phosphate, which was also related to an induction of glycogen accumulation. In addition, L-pyruvate kinase (L-PK) activity increased in transgenic mice, which when starved showed similar levels of activity to control fed mice. The induction of L-PK caused an increase in the hepatic lactate concentration. Furthermore, hepatocytes in primary culture from transgenic mice incubated with 20 mM glucose produced levels of lactate threefold higher than controls, but no difference was noted when the hepatocytes from control and transgenic mice were incubated with 2 mM glucose. These results demonstrated *in vivo* that the activation of GK is a rate-limiting step in the induction of glycolysis and glycogen synthesis. These changes in liver glucose metabolism led to a marked reduction in blood glucose (30%) and insulin (40%) concentrations. Furthermore, transgenic mice showed lower levels of blood glucose after an intraperitoneal glucose tolerance test, indicating that GK overexpression caused an increase in blood glucose disposal by the liver. All these findings show the key role of liver GK in the control of whole-body glucose homeostasis.—Ferre, T., Riu, E., Bosch, F., Valera, A. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J.* 10, 1213–1218 (1996)

Key Words: P-enolpyruvate carboxykinase gene promoter; glu-
colysis

GLUCOKINASE (GK),² OR HEXOKINASE IV, is the enzyme that regulates glucose phosphorylation to glucose 6-phosphate in the liver. This enzyme differs from the other

mammalian hexokinases because of its low affinity for glucose, the lack of inhibition by glucose 6-phosphate, and kinetic cooperativity with glucose (1, 2). The low affinity of GK for glucose ensures that the rate of glucose phosphorylation is directly proportional to blood glucose levels and the cellular levels of GK. Changes in GK activity are mainly due to changes in the amount of the protein. The most important physiological regulators of GK gene expression are insulin and glucagon (or cAMP, its second messenger). Insulin increases, whereas cAMP decreases, GK gene transcription (1, 2). Insulin stimulation does not depend on extracellular glucose. GK activity may also be regulated by binding with the GK regulatory protein, which inhibits GK activity (3). The effect of this protein is reinforced by fructose 6-phosphate and antagonized by fructose 1-phosphate.

After a meal, the increase in blood glucose leads to an induction of liver glycolysis, glycogenesis, and lipogenesis (4). In this situation, the plasma insulin concentration increases and levels of the counterregulatory hormones, such as glucagon, decrease. Insulin stimulates all these pathways by acting at the post- and/or pretranslational levels. The pretranslational activation of glycolytic and lipogenic enzymes results mainly from transcriptional activation. It has been shown in hepatocytes that regulation of the expression of most genes involved in the control of glycolysis and lipogenesis requires the presence of both insulin and glucose (5, 6). It has been suggested that the role of insulin in the activation of these genes could be to stimulate GK synthesis, and thus to increase glucose phosphorylation to glucose 6-phosphate (5, 6). This metabolite could be involved in the stimulation of gene expression in response to an increase in blood glucose. Glucose/carbohydrate regulatory elements have been identified on L-pyruvate kinase (L-PK), S14, and fatty acid synthase genes (7, 8). Several studies performed *in vitro* in cultured cells seem to indicate that GK activation is necessary for the induction of glycolysis and glycogen synthesis. Thus, the rescue of GK activity in hepatoma

¹To whom correspondence should be addressed.

²Abbreviations: GK, glucokinase; L-PK, L-pyruvate kinase; PEPCK, P-enolpyruvate carboxykinase; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; TgA, PEPCK/GK-6; TgB, PEPCK/GK-47; NIDDM, noninsulin-dependent diabetes; MODY, maturity-onset diabetes of the young.

cells, which lack endogenous GK gene expression, after infection with a retroviral vector carrying a GK gene induces glucose utilization and accumulation (9). Similarly, a constitutive GK expression vector cotransfected with the L-PK/chloramphenicol acetyltransferase chimeric gene confers an insulin-independent glucose responsiveness in hepatocytes (10), indicating that the insulin effect on glucose-dependent activation of the L-PK promoter is to permit glucose phosphorylation through stimulation of the GK synthesis. In addition, in some hepatoma cells (11) in which hexokinase activity is constitutive, the glucose-dependent activation of L-PK does not require insulin, and can be reproduced by the nonmetabolizable analog 2-deoxyglucose. In hepatocytes, the insulin effect on the glucose dependent activation of L-PK gene expression can be reproduced by fructose at low concentrations (10, 12). Fructose may act through the fructose 1-phosphate deactivation of GK activity by causing dissociation of the GK-regulatory protein complex (3).

The kinetic properties of GK and the regulation of GK levels by insulin and glucagon may lead to a situation in which GK has a key role in regulating and integrating glucose metabolism in liver. To learn whether GK activation is able to control hepatic glucose utilization and accumulation *in vivo*, we generated transgenic mice expressing GK in the liver during starvation. In this state the activity of this enzyme is very low, and glycolysis and glycogenesis are blocked (1, 2); thus, the recovery of GK activity might allow us to evaluate the contribution of this enzyme to the liver glucose metabolism. To direct the expression of GK, we used the -450 bp to +73 bp fragment of the promoter of the gene for P-enolpyruvate carboxykinase (PEPCK), which has been shown to direct the expression of chimeric genes mainly to the liver (13-16). Transcription of the PEPCK gene is induced by glucagon and blocked by insulin. The PEPCK promoter confers hormonal regulation on different chimeric genes, in a manner similar to that of the endogenous PEPCK gene, when introduced into transgenic mice (14-16). This study shows that GK can be expressed in the liver of starved mice, that GK activation is the rate-limiting step for glucose utilization and accumulation, and confirms the key role of the liver in the control of glucose homeostasis.

MATERIALS AND METHODS

Generation of transgenic mice expressing the PEPCK/GK chimeric gene

A 2.3 kb *EcoRI-EcoRI* fragment containing the entire coding sequence and the polyadenylation signal of the rat GK cDNA (from Dr. P. Iynedjian, University of Geneva, Geneva, Switzerland) was introduced at an *EcoRI* site newly created after destruction of the ATG translation start site of the PEPCK/insulin chimeric gene (16) by introduction of an *EcoRI* linker (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). This plasmid was designated pPEPCK/GK. A 4.5 kb *XbaI-SphI* fragment, containing the entire PEPCK/GK chimeric gene, was microinjected into fertilized eggs. The expression of this chimeric gene leads to a 2.5 kb mRNA transcript when polyadenylated at the signal at the end of the GK cDNA. The general procedures for microinjection of the chimeric gene were as described (17). At 3 wk of age, the animals were tested for the

presence of the transgene by Southern blot prepared with 10 μ g of tail DNA digested with *EcoRI*. Blots were hybridized with a 2.3 kb *EcoRI-EcoRI* fragment containing the entire GK cDNA radiolabeled with [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.) by random oligopriming (Boehringer Mannheim). Total RNA was obtained from liver by the guanidine isothiocyanate method (18), and RNA samples (30 μ g) were electrophoresed on a 1% agarose gel containing 2.2 M formaldehyde. Northern blots were hybridized to 32 P-labeled GK cDNA probe. Mice were fed *ad libitum* with a standard diet (Panlab, Barcelona, Spain) and maintained under a light-dark cycle of 12 h (lights on at 8:00 A.M.). When stated, mice were starved for 24 h. Animals were killed and samples were taken between 9 and 10 A.M. In the experiments described below, male mice aged 4 to 8 wk were used.

Enzyme, metabolite, and hormone assays

To measure GK activity, liver samples were homogenized in an ice-cold buffer (pH 7.4) containing 50 mM Tris-HCl, 300 mM sucrose, 100 mM KCl, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), and 0.7 μ l/ml β -mercaptoethanol. To determine pyruvate kinase activity, the liver was homogenized in an ice-cold buffer containing 100 mM KCl, 1 mM EDTA, and 0.7 μ l/ml β -mercaptoethanol. These activities were analyzed in 12,000 \times g supernatants (19, 20). GK activity was calculated as the difference between the glucose phosphorylation capacity at 100 and 0.5 mM glucose, and hexokinase activity as the glucose phosphorylating capacity at 0.5 mM glucose. Pyruvate kinase activity was determined at 5 mM P-enolpyruvate (total activity) (20). To determine the concentration of metabolites, liver samples were immediately frozen in liquid N₂. The concentrations of hepatic glycogen, glucose 6-phosphate and lactate were measured in perchloric extracts, which were adjusted to pH 5 with 5 M K₂CO₃ to determine glycogen and to pH 7 for glucose 6-phosphate and lactate. Glycogen levels were measured using the α -amylglucosidase method (21). Glucose 6-phosphate was determined enzymatically (22). Glucose was measured enzymatically (Glucoquant, Boehringer Mannheim) in serum. Glucose was also determined in 20 μ l of blood by using an Accutrend analyzer (Boehringer Mannheim). Lactate was measured, in the incubation medium of hepatocytes and in liver extracts, by the lactate dehydrogenase method (Boehringer Mannheim). Serum insulin levels were measured by radioimmunoassay (CIS, Biointernational, Gif-Sur-Yvette, France), using rat insulin (Eli Lilly, Indianapolis, Ind.) as the standard.

Preparation and incubation of hepatocytes

Hepatocytes were isolated between 10 and 11 A.M. from fed mice, as described (23). After removing nonparenchymal cells and debris, hepatocytes were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Santa Clara, Calif.) containing 0.2% albumin and 10% fetal calf serum (Boehringer Mannheim). Cells (5.5×10^6) were plated in 10 ml of this medium on collagen-coated dishes and maintained at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. After 4 h, the medium was removed and cells were washed three times in DMEM in the absence of both serum and glucose. Subsequently, 10 ml of DMEM without serum and with either 2 or 20 mM glucose was added to the cells, which were maintained in this medium for up to 24 h. Aliquots of 100 μ l of medium were taken at different times and lactate production was determined.

Statistical analysis

Enzyme activities and metabolite concentrations are expressed as the means \pm SEM. Analysis of statistical differences between data were performed using the Student-Newman-Keuls test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study we used two transgenic lines that have integrated the PEPCK/GK chimeric gene. The transgenic line PEPCK/GK-6 (TgA) and the PEPCK/GK-47 (TgB) car-

ried about 5 and 20 intact copies, respectively, of the transgene (data not shown). In the experiments described below, we used F1 and F2 mice from these transgenic lines and littermates as controls. Both fed control and fed transgenic mice showed a 2.5 kb mRNA transcript that hybridized with a GK cDNA probe, resulting from the expression of both the endogenous GK gene (1) and the transgene. The levels of GK mRNA noted in the liver of fed transgenic mice were about twice those found in controls (Fig. 1). Very low levels of GK mRNA were detected in the liver of starved control mice, whereas starved transgenic mice expressed high levels of GK mRNA that were about 70% those of fed controls (Fig. 1). However, GK activity in the liver of fed transgenic mice was higher, in both TgA (about 1.4-fold) and TgB (about 2-fold), than in controls (Table 1). The enzyme activity in the liver of starved control mice was 80% lower than in fed controls. Nevertheless, GK activity in starved TgA and TgB mice was higher (about fourfold) than in starved controls and similar to fed controls (Table 1). These results indicate that the liver of starved transgenic mice was able to produce active enzyme. Although hexokinase activity was lower in starved than in fed mice, no significant differences were noted in this enzyme activity between control and transgenic mice under the same feeding conditions (Table 1).

Starved control mice showed a 75% decrease in the intracellular concentration of glucose 6-phosphate compared with fed controls. In contrast, starved transgenic mice had levels of this metabolite about 2.5-fold higher than starved controls, and only a 25% decrease was noted compared to fed controls (Table 2). Starved transgenic mice showed GK activity similar to that of fed controls, so the fact that glucose 6-phosphate content was lower than in fed controls might be the result of the low

TABLE 1. Hepatic glucose phosphorylation activities^a

	Glucokinase	Hexokinase
	(mU/mg prot)	
Fed		
Control	21.5 ± 2.2	2.11 ± 0.11
Tg A	30.8 ± 3.7	2.05 ± 0.12
Tg B	41.5 ± 3.9	2.21 ± 0.14
Starved		
Control	4.1 ± 1.1	1.32 ± 0.06
Tg A	13.8 ± 1.4	1.03 ± 0.07
Tg B	18.9 ± 2.0	1.17 ± 0.06

^aGlucokinase and hexokinase activities were determined in liver extracts obtained from fed and starved control and transgenic (Tg) mice from the lines PEPCK/CK-6 (TgA) and PEPCK/CK-47 (TgB), as indicated in Materials and Methods. Results are means ± SEM of 18 different animals in each group.

levels of blood glucose in starved mice, and thus less substrate is available to GK.

We have previously shown that FTO-2B and H4HE hepatoma cells, which are unable to store glycogen, when infected with a retroviral vector carrying a PEPCK/GK chimeric gene express GK and accumulate high levels of the polysaccharide (9). Similarly, fed transgenic mice expressing the PEPCK/GK chimeric gene accumulate more glycogen (about twofold) than control mice (Table 2). Very low levels of glycogen were stored in the liver of starved control mice. However, starved transgenic mice showed levels of glycogen to similar to those of fed controls (Table 2), probably resulting from the increase of glucose 6-phosphate. The decrease in insulin and in the glucagon blood levels during starvation has been shown to keep glycogen synthase phosphorylated and inactive. However, glucose 6-phosphate is an allosteric activator of glycogen synthase as well as being a substrate for glycogen synthesis (24). Furthermore, an effect on the expression of key genes regulating glycogen synthesis mediated by specific transcription factors, which might be activated by the increase in glucose 6-phosphate, cannot be ruled out. Nevertheless, the expression of the PEPCK/GK chimeric gene led to the recovery of glucose storage in starved conditions and indicated that GK activity is rate limiting for glycogen synthesis in hepatic cells.

The L-type pyruvate kinase (L-PK) is a regulatory enzyme of glycolysis. L-PK activity in starved controls was about 50% of that found in fed controls. However, in starved transgenic mice L-PK activity was also higher (about twofold) than in starved controls and similar to fed controls (Table 2). In addition, an increase in L-PK activity was also noted in fed transgenic mice compared to controls. These results suggest that the increase in glucose 6-phosphate in starved animals led to activation of L-PK, and they agree with previous reports postulating that the main insulin effect on glucose-dependent activation of L-PK is to stimulate GK synthesis (5). The activation of L-PK led to an increase in the hepatic lactate concentration (Table 2). In addition, when hepatocytes from transgenic mice were cultured for up to 24 h in DMEM without serum and in the presence of 20 mM glu-

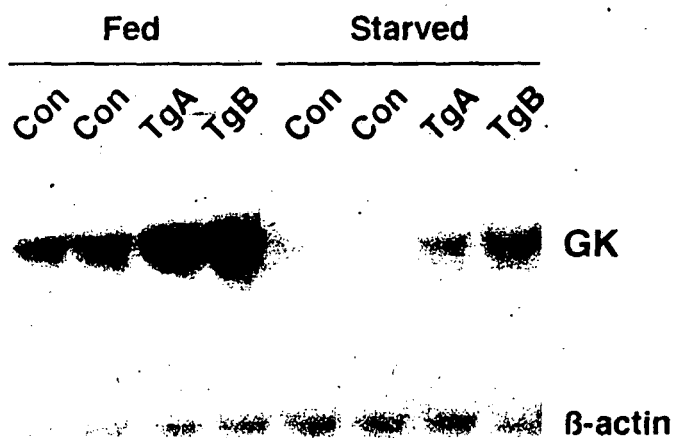


Figure 1. Expression of glucokinase in liver of transgenic mice. Total cellular RNA was obtained from fed and starved control and from transgenic mice from the lines PEPCK/CK-6 (TgA) and PEPCK/CK-47 (TgB), as indicated in Materials and Methods. A representative Northern blot hybridized with the glucokinase cDNA probe is presented.

TABLE 2. Hepatic glucose storage and utilization^a

	Glucose 6-P, nmol/g liver	Glycogen, mg/g liver	Pyruvate kinase, U/mg prot	Lactate, μ mol/g liver
Fed				
Control	232 \pm 22	49 \pm 5	0,23 \pm 0,03	0,26 \pm 0,03
Tg A	346 \pm 36	97 \pm 7	0,40 \pm 0,03	0,36 \pm 0,02
Tg B	391 \pm 28	116 \pm 11	0,51 \pm 0,04	0,47 \pm 0,04
Starved				
Control	65 \pm 8	5 \pm 1	0,12 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
Tg A	152 \pm 14	30 \pm 4	0,23 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01
Tg B	178 \pm 18	35 \pm 6	0,26 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02

^aGlucose storage and utilization in the liver of transgenic mice expressing glucokinase. The concentration of glucose 6-phosphate, glycogen, glucose and lactate, and also the activity of pyruvate kinase were measured in liver extracts obtained from fed and starved control and transgenic (lines TgA and TgB) mice, as indicated in Materials and Methods. Results are means \pm SEM of 18 different animals in each group.

cose, an increase (about threefold) in lactate production was detected compared to hepatocytes from controls (Fig. 2A). However, when incubated with 2 mM glucose, no significant difference in lactate production between hepatocytes from control and transgenic mice was noted (Fig. 2B), as this concentration of glucose is much lower than the K_m of GK (6–12 mM) (1, 2). This increase in lactate production by hepatocytes from transgenic mice incubated with 20 mM glucose might also be related to the fact that these hepatocytes express GK, and in the presence of glucose this enzyme acquires a more active conformation because of its kinetic cooperativity with glucose (1, 2).

The changes in glucose metabolism in the liver of transgenic mice expressing the PEPCK/GK chimeric gene were also reflected in serum parameters. Transgenic mice showed a 30% decrease in the serum concentration of glucose and a 40% reduction in insulin levels compared with their nontransgenic siblings (Table 3). These results indicate that the increase in liver GK activity was able to increase glucose uptake and thus reduce glycemia. The overexpression of GK in the liver of these transgenic mice mimicked a situation of high insulin sensitivity that led to increased glucose uptake from blood. In response to the reduction in glycemia, a decrease in

insulin secretion by pancreatic β cells is established that diminishes circulating insulin. Similarly, we recently reported that the expression in transgenic mice of a PEPCK/*c-myc* chimeric gene leads to glucose uptake and utilization (25). In starved *c-Myc* transgenic mice, an increase in both the expression and activity of glucokinase and pyruvate kinase was observed. These changes in liver metabolism were also parallel to a marked reduction in blood glucose and insulin (25). In contrast, we have also reported the opposite situation in transgenic mice overexpressing the PEPCK gene in the liver (26). These mice show increased gluconeogenesis, which leads to a high hepatic glucose production, which in turn causes hyperglycemia and hyperinsulinemia. Thus, taken together these findings demonstrate that liver glucose metabolism can significantly determine the blood glucose and insulin set points in fed and starved mice, and is consistent with the key role of the liver in whole-body glucose homeostasis.

When an intraperitoneal glucose tolerance test was performed with mice starved 24 h, transgenic animals from either line TgA or TgB showed a marked reduction (about 40%) in the blood glucose levels compared to control (Fig. 3). The increase in circulating glucose levels was transient and gradually returned to basal levels, by

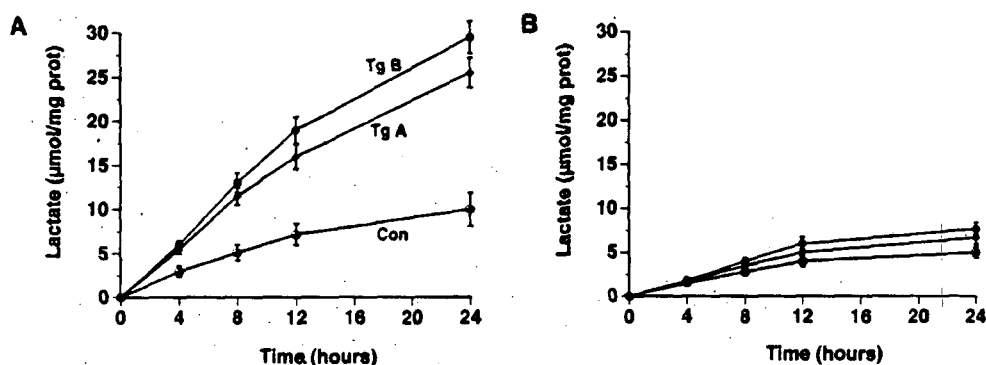


Figure 2. Lactate production by hepatocytes from control (O, Con) and transgenic (●, TgB; and ◆, TgA) mice. Primary cultures of hepatocytes from fed mice were incubated in DMEM with 20 mM (A) or 2 mM (B) glucose. At the indicated times an aliquot of the incubation medium was removed and the concentration of lactate was determined, as described in Materials and Methods. Results are means \pm SEM of four different experiments.

120 min in transgenic mice and by 180 min in control. This increased glucose disposal noted in the transgenic mice overexpressing the PEPCK/GK chimeric gene most likely resulted from increased glucose uptake and utilization in the liver. Thus, the metabolic capacity of the liver may enable it to control glucose homeostasis. Increased peripheral glucose uptake in transgenic mice expressing the glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle and/or adipose tissue (27, 28) or GLUT1 in skeletal muscle (29) also leads to enhanced glucose tolerance in vivo. The skeletal muscle comprises a large body mass, and has been considered to be the main site of disposal of blood glucose. Thus, an increase in glucose transporters in this tissue is expected to lead to glucose uptake. This process is defective in the muscle of patients with noninsulin-dependent diabetes (NIDDM) (30). However, no severe defect in glucose homeostasis is noted in mice deficient in GLUT4, nor do they develop NIDDM (31). Because the GLUT4 null mice have compensated for the lack of the glucose transporter in the skeletal muscle and adipose tissue and no increase in GLUT1 in these tissues is observed (31), a key role for the liver might be suggested. Patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY) have heterozygous point mutations in the GK gene, and this leads to reduced enzymatic activity and decreased insulin secretion (32, 33). However, it is unclear whether abnormal liver glucose metabolism contributes to the MODY disease. A decrease in GK activity in the β cells of transgenic mice leads to a decreased insulin secretory response to glucose, but these mice did not show changes in fasting plasma glucose or glucose tolerance (34). In contrast, the disruption of GK function both in β cells and in liver of heterozygous transgenic mice was associated with decreased tolerance to glucose and abnormal liver glucose metabolism (35). These mice develop a phenotype similar to MODY, which indicates that this disease results from abnormal glucose metabolism in both islets and liver (35). All these findings, together with the results obtained in our transgenic mice overexpressing GK, support the hypothesis that this enzyme exerts a central role in the control of glucose homeostasis in vivo. [F]

TABLE 3. Plasma levels of glucose and immunoreactive insulin^a

	Glucose, mg/dl	Insulin, ng/dl
Fed		
Control	164 ± 12	2,9 ± 0,4
Tg A	112 ± 10	1,7 ± 0,3
Tg B	105 ± 9	1,5 ± 0,3
Starved		
Control	89 ± 8	1,1 ± 0,3
Tg A	66 ± 8	0,7 ± 0,2
Tg B	61 ± 7	0,6 ± 0,2

^aSerum glucose and insulin concentrations in transgenic mice expressing the PEPCK/GK chimeric gene. The levels of serum glucose and insulin from fed and starved control and transgenic mice were determined as described in Materials and Methods. Results are means ±SEM of at least 18 different animals in each group.

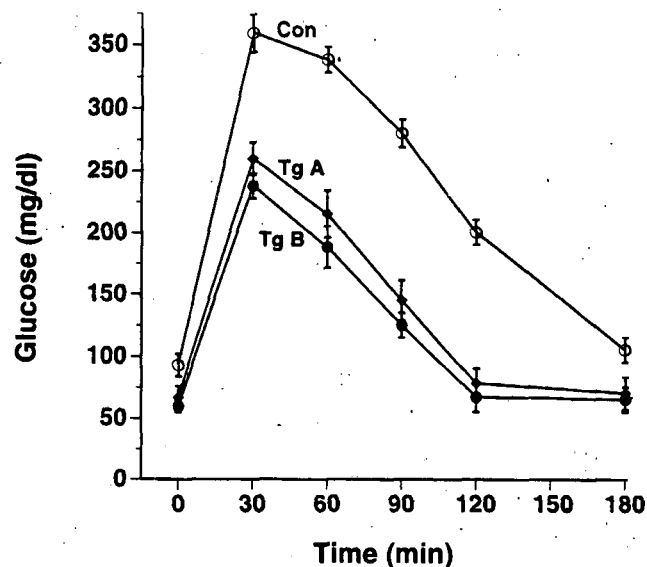


Figure 3. Intra-peritoneal glucose tolerance test. Overnight-starved transgenic (◆, TgA and ●, TgB) and control mice (○, Con) were given an i.p. injection of 1 mg of glucose per g body weight. Blood samples were taken from the tail vein of the same animals at the times indicated. Glucose was determined as indicated in Materials and Methods. Results are means ±SEM of 10 transgenic from each line and 10 control mice.

We thank R. W. Hanson for the PEPCK promoter, P. Iynedjian for glucokinase cDNA, R. Casamitjana for insulin measurements, R. Rycroft for critical reading of the manuscript, and C. H. Ros for technical assistance. T.F. and E.R. were recipients of predoctoral fellowships from Fondo Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social and from DGU, Generalitat de Catalunya, respectively. This work was supported by grants from Fondo Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (EISs 94/0795) and CIRIT Generalitat de Catalunya (GRQ94-2013).

REFERENCES

- Iynedjian, P. B. (1993) Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem. J.* **293**, 1-13
- Printz, R. L., Magnuson, M. A., and Cranner, D. K. (1993) Mammalian glucokinase. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 463-496
- Van Schaftingen, E., Dethoux, M., and Veiga Da Cunha, M. (1994) Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J.* **8**, 414-419
- Pilkis, S. J., and Cranner, D. K. (1992) Molecular physiology of the regulation of the hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885-909
- Vaulont, S., and Kahn, A. (1994) Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* **8**, 28-35
- Girard, J., Perdereau, D., Fougelle, F., Prip-Buus, C., and Ferré, P. (1994) Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J.* **8**, 36-42
- Shih, H. M., and Towle, H. C. (1992) Definition of the rat carbohydrate response element of the rat S14 gene. Evidence for a common factor required for carbohydrate regulation of hepatic genes. *J. Biol. Chem.* **267**, 13222-13228
- Shih, H. M., and Towle, H. C. (1994) Definition of the rat carbohydrate response element of the rat S14 gene. Context of the CACCTC motif determines the specificity of carbohydrate regulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 9380-9387
- Valera, A., and Bosch, F. (1994) Glucokinase expression in rat hepatoma cells induces glucose uptake and is rate limiting in glucose utilization. *Eur. J. Biochem.* **222**, 533-539
- Doiron, B., Cuif, M.-H., Kahn, A., and Diaz-Cuerra, M.-J. (1994) Respective roles of glucose, fructose, and insulin in the regulation of the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 10213-10216

11. Lefrançois-Martinez, A. M., Diaz-Guerra, M. J., Vallet, V., Kahn, A., and Antoine, B. (1994) Glucose-dependent regulation of the L-pyruvate kinase gene in a hepatoma cell line is independent of insulin and cyclic AMP. *FASEB J.* **8**, 89-96
12. Munnich, A., Lyonnet, S., Chauvet, D., Van Schaftingen, E., and Kahn, A. (1987) Differential effects of glucose and fructose on liver-L-type pyruvate kinase gene expression in vivo. *J. Biol. Chem.* **262**, 17065-17071
13. Lemaigre, F. P., and Rousseau, G. C. (1994) Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* **303**, 1-14
14. McGrane, M. M., Yun, J. S., Moorman, A. F., Lamers, W. H., Hendrick, C. K., Arafah, B. M., Park, E. A., Wagner, T. E., and Hanson, R. W. (1990) Metabolic effect of developmental, tissue-, and cell-specific expression of a chimeric P-enolpyruvate carboxykinase (GTP)/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **265**, 22371-22379
15. Short, M. K., Clouthier, E., Schaefer, I. M., Hammer, R. E., Magnuson, M. A., and Beale, E. C. (1992) Tissue-specific, developmental, hormonal, and dietary regulation of rat P-enolpyruvate carboxykinase-human growth hormone fusion genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1007-1020
16. Valera, A., Fillat, C., Costa, C., Visa, J., Sabater, J., Pujol, A., and Bosch, F. (1994) Regulated expression of human insulin in the liver of transgenic mice corrects diabetic alterations. *FASEB J.* **8**, 440-447
17. Hogan, B., Costantini, F., and Lacy, E. (1986) *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
18. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. W., McDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299
19. Davidson, A. L., and Arion, W. J. (1987) Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **253**, 156-176
20. Feliu, J. E., Hue, L., and Hers, H.-C. (1977) Regulation of "in vitro" and "in vivo" of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent inactivation of rat liver pyruvate kinase type-L. *Eur. J. Biochem.* **81**, 609-617
21. Keppler, D., and Decker, K. (1981) Glycogen. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., Ed in Chief) Vol. VI, pp. 11-18, Verlag Chemie, Weinheim, Germany
22. Michal, G. (1981) Glucose 6-Phosphate. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., Ed in Chief) Vol. VI, pp. 185-190, Verlag Chemie, Weinheim, Germany
23. LeCam, A., Guillouzo, A., and Freychet, P. (1976) Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxic conditions. Cryopreservation of hepatocytes. *Exp. Cell Res.* **98**, 382-395
24. Larner, J. (1990) Insulin and the stimulation of glycogen synthesis. The road from glycogen structure to glycogen synthase to cyclic AMP-dependent protein kinase to insulin mediators. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **63**, 173-231
25. Valera, A., Pujol, A., Gregori, X., Riu, E., Visa, J., and Bosch, F. (1995) Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis. *FASEB J.* **9**, 1067-1078
26. Valera, A., Pujol, A., Pelegrin, M., and Bosch, F. (1994) Transgenic mice overexpressing P-enolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9151-9154
27. Liu, M.-L., Gibbs, E. M., McCoid, S. C., Milici, A. J., Stukenbrok, H. A., McPherson, R. K., Treadway, J. L., and Pessin, J. E. (1993) Transgenic mice expressing the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11346-11350
28. Shepherd, P. R., Gnudi, L., Tozzo, E., Yang, H., Leach, F., and Kahn, B. B. (1993) Adipose cell hyperplasia and enhanced disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **268**, 22243-22246
29. Marshall, B. A., Ren, J.-M., Johnson, D. W., Gibbs, E. M., Lillquist, J. S., Soeller, W. C., Holloszy, J. O., and Mueckler, M. (1993) Germ-line manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **268**, 18442-18445
30. Rothman, D. L., Shulman, R. G., and Shulman, G. I. (1992) ³¹P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **89**, 1069-1075
31. Katz, E. B., Stenbit, A. E., Hatton, K., DePinho, R., and Charron, M. J. (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature (London)* **377**, 151-155
32. Vionnet, N., Stoffel, M., Takeda, J., Yasuda, K., Bell, G. I., Zouali, H., Lesage, S., Velho, C., Iris, F., Passa, P., Froguel, P., and Cohen, D. (1992) Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature (London)* **356**, 721-722
33. Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, C., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P., Permutt, A., Beckmann, J. S., Bell, G. I., and Cohen, D. (1993) Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **328**, 697-702
34. Efrat, S., Leiser, M., Wu, Y.-J., Fusco-DeMane, D., Emran, O. A., Surana, M., Jotton, T., Magnuson, M. A., Weir, C., and Fleischer, N. (1994) Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic beta-cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2051-2055
35. Bali, D., Svetlanov, A., Lee, H.-W., Fusco-DeMane, D., Leiser, M., Li, B., Barzilai, N., Surana, M., Hou, H., Fleischer, N., DePinho, R., Rossetti, L., and Efrat, S. (1995) Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 21464-21467

Received for publication January 4, 1996.
Accepted for publication April 15, 1996.

