

Impacte Metabòlic de l'Activació de la Glicogen Sintasa Hepàtica

Susana Ros Domínguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Impacte metabòlic de l'activació de la glicogen sintasa hepàtica

SUSANA ROS DOMÍNGUEZ
Barcelona, Juny del 2009

INTRODUCCIÓ

1. METABOLISME DEL GLICOGEN I VIES RELACIONADES

La glucosa és la principal font d'energia de les cèl·lules. Els organismes superiors es protegeixen d'un possible dèficit de glucosa emmagatzemant-la en forma de polímers d'elevat pes molecular que poden ésser ràpidament mobilitzats en cas de necessitat (Buleon, Colonna et al. 1998; Roach, Cheng et al. 1998). En plantes trobem el midó, que és una barreja d'amilosa, un polímer d'unitats de D-glucosa unides per enllaços α (1 \rightarrow 4) glicosídics, i d'amilopectina, que a més dels enllaços α (1 \rightarrow 4) conté ramificacions α (1 \rightarrow 6) cada 24-30 unitats. En animals però el reservori de glucosa és el glicogen, la seva estructura és similar a la de l'amilopectina però es diferencia d'aquesta en que les seves ramificacions es troben cada 8-12 unitats.

El glicogen s'emmagatzema principalment en el fetge i en el teixit muscular. El fetge, és el teixit de l'organisme que presenta un major contingut relatiu de glicogen respecte d'altres teixits, i pot arribar a ser un 6-10 % del seu pes. El múscul presenta un contingut de glicogen menor per unitat de massa de teixit respecte al fetge, aquest valor és de 0,5 % aproximadament. El glicogen juga un paper fisiològic molt diferent en ambdós teixits, el que implica diferències en el seu metabolisme. El glicogen hepàtic permet el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa en sang (glucèmia), mentre que el del múscul esquelètic és emprat per al consum propi en la contracció d'aquest teixit. El glicogen hepàtic és la principal reserva per acumular l'excés de glucosa en sang després d'una ingesta. Quan la quantitat de glucosa en sang és insuficient, les reserves hepàtiques de glicogen es mobilitzen a mesura que el dejuni avança, per tal de que no es produeixi hipoglucèmia i arribi prou monosacàrid a la resta de teixits. En canvi, el glicogen muscular l'usen les mateixes fibres musculars, doncs es metabolitza per a subministrar energia al múscul via glicòlisi en situacions que comporten un increment de la demanda energètica com pot ésser l'exercici.

1.1 Estructura del glicogen

El glicogen és un polímer d'unitats de D-glucosa unides per enllaços α (1 \rightarrow 4) glicosídics amb punts de ramificació formats per unions α (1 \rightarrow 6) (**Fig.1**). La formació del polímer permet l'acumulació de grans quantitats de glucosa sense alterar l'osmolaritat intracel·lular, mentre que l'estructura ramificada de la molècula permet la seva ràpida degradació. A més, el gran grau de ramificació del glicogen fa que aquest sigui soluble, a diferència del midó, i permet la seva distribució pel citoplasma.

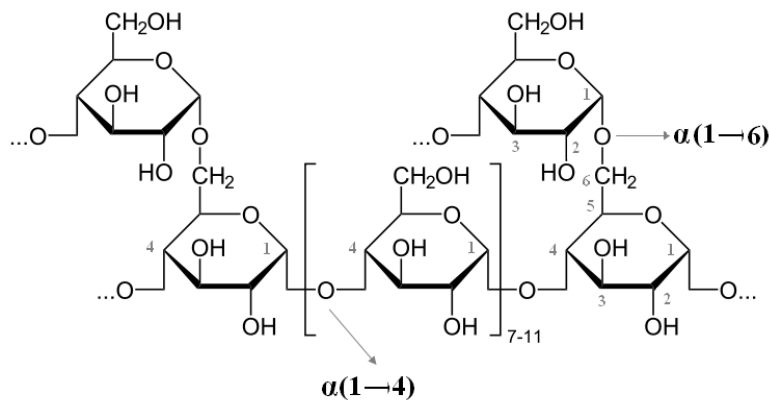


Fig.1 Estructura detallada del glicogen. En la figura es mostren els enllaços α (1 \rightarrow 4) entre els residus de glucosa i els punts de ramificació del glicogen els enllaços α (1 \rightarrow 6).

El glicogen no té una mida i massa establertes, la cadena de glicogen creix fins que no pot incorporar més residus de glucosa a causa d'impediment estèric (Melendez, Melendez-Hevia et al. 1998), forma així el que es coneix com a partícula β , que presenta un diàmetre d'uns 25 nm i un pes molecular de 10^7 Da. En el fetge, s'han observat la presència de partícules amb un diàmetre uns cinc cops més gran que aquesta partícula β , que es coneixen com partícules α , que estan formades per l'agregació en forma de roseta de partícules β (Drochmans 1962).

Moltes proteïnes s'uneixen al glicogen i gràcies a això s'afavoreixen interaccions entre elles. Algunes d'aquestes proteïnes són la glicogen sintasa (GS), la glicogen fosforilasa (GP), l'enzim desramificant (DBE), algunes proteïnes quinases (Cohen 1978), i les subunitats de les proteïnes fosfatases associades al glicogen (Newgard, Brady et al. 2000).

1.2 Control del metabolisme del glicogen

El metabolisme del glicogen presenta vies independents de síntesi i degradació (**Fig.2**). El que es produeixi síntesi o degradació i la seva velocitat depèn de la quantitat relativa de les formes actives de la GS i de la GP, respectivament. Aquestes dues vies però es també es troben relacionades.

En la síntesi de glicogen, la GS que exerceix el control principal en la via, està controlada a la vegada per la glucoquinasa (GK), l'enzim que s'encarrega de transformar la glucosa a glucosa 6-fosfat (Glc6P). La GK exerceix un gran control sobre la síntesi de glicogen, doncs els canvis en la seva activitat resulten en canvis en el flux de síntesi de glicogen (Agius, Peak et al. 1996). El control s'exerceix per la quantitat d'aquest metabòlit que promouen l'activació de la GS (Gomis, Ferrer et al. 2000). Els canvis en l'activitat de la GK es troben modulats per una proteïna reguladora (GKRP), que s'uneix a la GK en el nucli de l'hepatòcit formant un complex inactiu a baixes concentracions de glucosa (Van Schaftingen 1989; Van Schaftingen, Detheux et al. 1994). La GKRP presenta un control negatiu sobre la síntesi de glicogen, doncs la seva sobreexpressió comporta a una inhibició de la síntesi de polisacàrid (de la Iglesia, Mukhtar et al. 2000). Els canvis en la fosforilació de la GP també resulten en canvis en el flux de síntesi de glicogen, la GP té un coeficient de control negatiu molt alt sobre la síntesi de glicogen, i aquest control és atenuat per la sobreexpressió de la GK, indicant la dependència en d'altres enzims amb control alt sobre la via (Aiston, Hampson et al. 2001).

Les dues vies també es troben connectades per la proteïna fosfatasa-1 (PP1) que s'encarrega de defosforilar la GS si han augmentat els valors de Glc6P prèviament, i la PP1 és inhibida per la GP, però que es troba activa si prèviament inactiva a la GP per defosforilació. La GP a més es regula per unió a la G_L, subunitat reguladora de la PP1, que també pot modular l'activitat de la GS. La interacció entre la G_L i la GP es don a través del domini C-terminal de la G_L que s'uneix a la butxaca per AMP de la GP (Pautsch, Stadler et al. 2008). La interacció de la G_L amb la forma activa de la GP, suprimeix l'activitat de la PP1 sobre la GS, pel que es produeix inhibició de la síntesi de glicogen en fetge; pel contrari, si s'inhibeix aquesta interacció entre la GP i la G_L s'incrementa la síntesi de glicogen (Zibrova, Grempler et al. 2008). A més, l'acció glicogenogènica de la anomenada PTG, una altra subunitat reguladora de la PP1, és deguda no només a per un efecte directe com a fosfatasa de la sintasa (Brady, Printen et al. 1997) sinó també per inactivació de la GP (Green, Aiston et al. 2004).

A més a més, totes dues vies es troben connectades per la proteïna quinasa dependent d'AMPc (PKA) i per la fosforilasa quinasa (PhK), les quals mitjançant fosforilació activen la GP i simultàniament inactiven la GS.

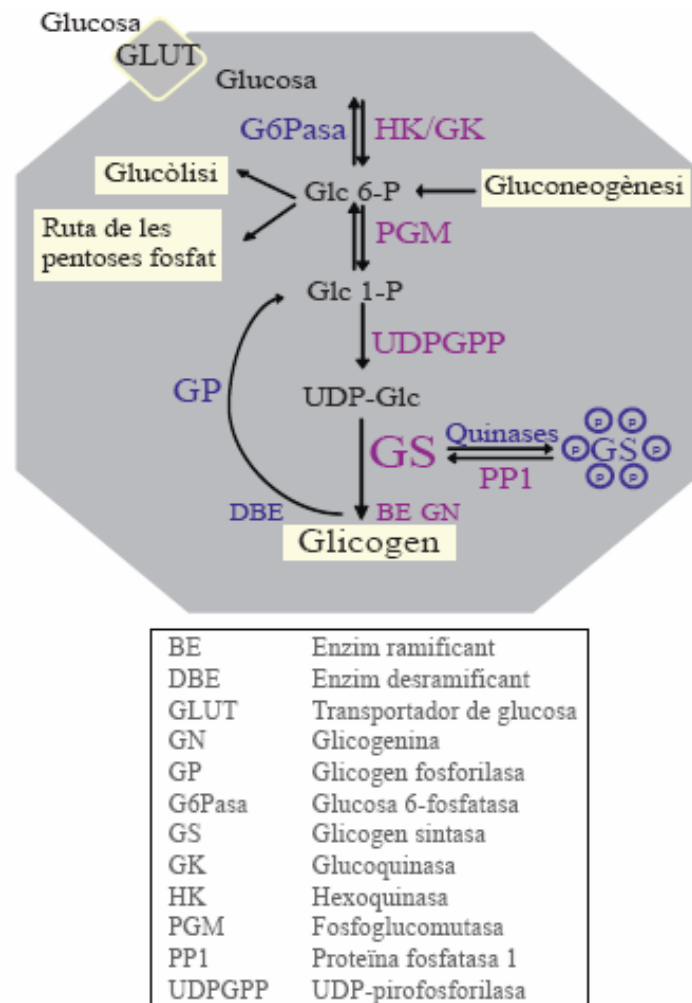


Fig.2 Esquema del metabolisme del glicogen. En la figura es mostren els principals enzims que intervien en la síntesi i degradació del glicogen.

1.3 Síntesi de glicogen

Existeixen dues vies de síntesi de glicogen. La via de síntesi directa és mecanisme general que es don en tots els teixits. En el fetge però el glicogen també es pot sintetitzar a través del què es coneix com via de síntesi indirecta. En tots els casos, es considera que l'etapa limitant en la síntesi de glicogen és la catalitzada per la GS.

1.3.1 Síntesi de glicogen : via directa

La glucosa entra a la cèl·lula per un transportador, que varia en funció del teixit, el que permet el pas de la glucosa a través de la membrana cel·lular (**Fig.2**). Un cop dins, la glucosa es fosforila i passa a Glc6P per acció d'una hexoquinasa, específica de cada teixit.

Si s'usa la Glc6P per a la síntesi de glicogen, aquesta és isomeritzada a glucosa 1-fosfat (Glc1P) per l'acció de la fosfoglucomutasa. Degut a que la conversió directa de Glc1P a glicogen i Pi es desfavorable termodinàmicament a totes les concentracions de Pi fisiològiques, es requereix un pas addicional pel que la Glc1P es combina amb trifosfat d'uridina (UTP) per a formar difosfat d'uridina-glucosa (UDPGlc) per acció de la UDP-glucosa-pirofosforilasa (Leloir 1957). La GS usa aquesta UDPGlc per a allargar un polisacàrid preexistent. La iniciació però és catalitzada per una proteïna encebadora, la glicogenina (GN) capaç d'autoglicosilar-se en un residu de tirosina i allargar la cadena fins a uns set residus de glucosa. Aquest oligosacàrid unit a la glicogenina és elongat per la GS i ramificat mitjançant enllaços α (1 \rightarrow 6) per l'enzim ramificant (BE) (Cao, Mahrenholz et al. 1993). La BE transfereix un fragment terminal de 6-7 residus de glucosa, des d'un extrem de com a mínim 11 residus de glucosa, a un grup hidroxil situat en la posició 6 d'un residu de glucosa del interior del polímer (Bollen, Keppens et al. 1998) (**Fig.3**). Cada segment transferit ha de provenir d'una cadena de com a mínim 11 residus de glucosa.

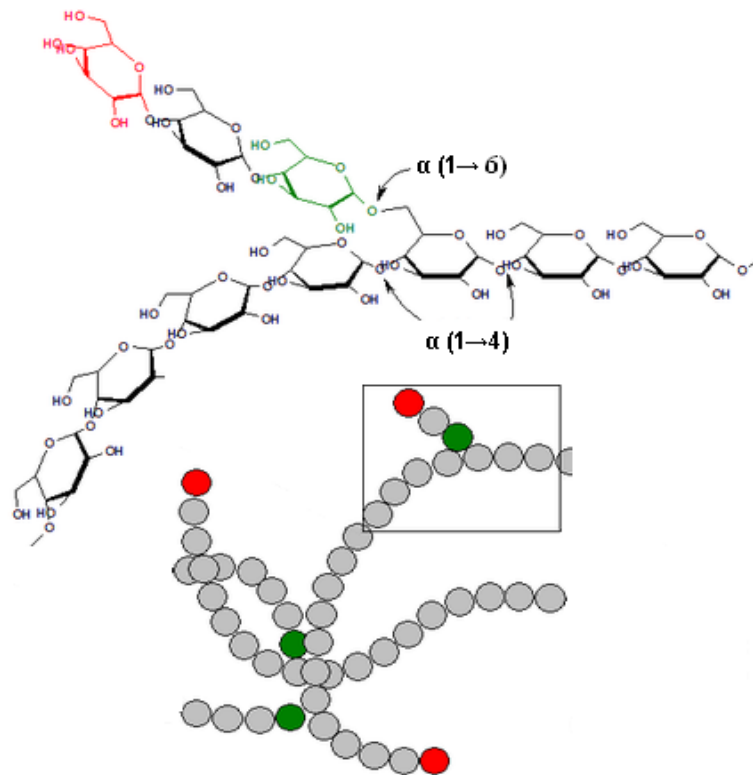


Fig.3 Ramificació del glicogen. En la figura es mostra que les ramificacions es formen mitjançant l'acció de l'enzim ramificant que transfereix un fragment terminal de 6-7 residus de glucosa, des d'un extrem de com a mínim 11 residus de glucosa, a un grup hidroxil situat a la posició 6 d'un residu de glucosa de interior del polímer.

1.3.1 Síntesi de glicogen : via indirecta

A part de la via directa de síntesi de glicogen, en el fetge el glicogen també es pot sintetitzar a través de la via indirecta. Sorprenentment davant d'una ingesta de glucosa, una gran fracció del glicogen hepàtic es sintetitza per la via indirecta i no pas per la directa, tal i com es mostra en diferents espècies (Shikama and Ui 1978; Radziuk 1982).

Per a que el glicogen es sintetitzi mitjançant la via indirecta, la glucosa és metabolitzada mitjançant la glucòlisi el que permet obtenir substrats de tres carbonis, que són

reconvertits a Glc6P mitjançant la gluconeogènesi. La Glc6P s'incorpora a glicogen, mitjançant etapes idèntiques a les de la via directa (Glc6P \rightarrow Glc1P \rightarrow UDP-glucosa \rightarrow glicogen) (Katz and McGarry 1984; Newgard, Moore et al. 1984).

La via indirecta no només pot ésser intrahepàtica on la conversió de la glucosa en precursors gluconeogènics es donaria a terme en el mateix òrgan, sinó que la conversió de la glucosa en precursors gluconeogènics també es pot dur a terme en els teixits perifèrics. El fetge incorporaria aquests precursors i els reconvertiria a Glc6P, el que posteriorment s'incorporaria a glicogen (Agius 2008). Estudis fisiològics suggereixen però que la glicòlisi intrahepàtica és la font majoritària de substrats de tres carbonis per a la síntesi indirecta de glicogen (Moore, Cherrington et al. 1991).

1.4 Enzims clau en la síntesi de glicogen, diferències entre fetge i múscul

La regulació de la síntesi de glicogen presenta diferències importants entre el fetge i el múscul. Aquestes diferències es troben tant en l'enzim responsable de la síntesi de glicogen com en d'altres elements.

1.4.1 Transportadors de glucosa

El transport de glucosa és el primer dels elements diferencials entre ambdós teixits. Aquests transportadors difereixen en la seva afinitat per glucosa i en la seva diferent capacitat de transport. El principal transportador de glucosa en el fetge és el GLUT-2, que permet la difusió facilitada del monosacàrid (Thorens, Cheng et al. 1990). En canvi, en el múscul trobem majoritàriament el transportador GLUT-4, que en presència d'insulina es mobilitza des de les vesícules intracel·lulars cap a la membrana (Ros-Baro, Lopez-Iglesias et al. 2001; Watson and Pessin 2001).

1.4.2 Hexoquinases

En vertebrats es poden trobar 4 hexoquinases codificades per diferents gens, l'hexoquinasa I, la II, la III i finalment la IV coneguda com glucoquinasa (GK).

Les hexoquinases I, II i III són enzims amb elevada afinitat per glucosa ($K_m < 0.2 \text{ mM}$) que presenten inhibició per producte, la Glc6P. De fet, en el múscul és l'hexoquinasa I (HK-1) la principal responsable de la fosforilació de la glucosa (Wilson 1998). L'expressió de les hexoquinases I, II i III és molt baixa en hepatòcits, i només constitueixen una petita fracció de l'activitat fosforilant de glucosa en aquestes cèl·lules en condicions fisiològiques normals (Reyes and Cardenas 1984).

La forma predominant d'hexoquinasa en fetge, i en les cèl·lules α i β pancreàtiques és la GK (Cárdenas 1995). La GK també s'expressa en les cèl·lules sensores de glucosa de l'hipotàlem i als enteròcits del intestí prim (Matschinsky, Magnuson et al. 2006). El gen de la GK conté dos promotors alternatius, el segon dels quals situat entre els exons 1 β i 1L, dirigeix l'expressió de la forma hepàtica de l'enzim (Magnuson and Shelton 1989), de fet en el fetge aquest enzim constitueix el 90% de l'activitat fosforilant de glucosa. La GK es diferencia de la resta d'hexoquinases per tenir menor afinitat per la glucosa, amb una K_m de 10mM, i per no ésser inhibida per Glc6P a concentracions fisiològiques. L'acció de la GK es veu afavorida per la presència en l'hepatòcit del transportador de glucosa GLUT-2 que facilita la difusió de la glucosa a través de la membrana plasmàtica i que té una elevada capacitat de transport (Thorens, Cheng et al. 1990).

L'expressió de la GK en fetge, a diferència dels altres llocs on també s'expressa, fluctua per tal d'adaptar-se als canvis nutricionals. La insulina incrementa la seva transcripció mentre que el glucagó, via AMPc, la disminueix (Iynedjian, Ucla et al. 1987; Iynedjian 1993).

A més, en el fetge la GK no només es troba regulada per l'expressió sinó que també està modulada per l'acció d'una proteïna reguladora de la seva activitat. La GKRP existeix en dues conformacions amb baixa i alta afinitat per la GK. La fructosa 6-P i la fructosa 1-P, que competeixen pel mateix lloc d'unió en l'estructura de la GKRP, afavoreixen els estats de baixa i alta afinitat respectivament (Veiga-da-Cunha and Van Schaftingen 2002). Com s'ha comentat prèviament, la GKRP a baixes concentracions de glucosa s'uneix a la GK en el nucli de l'hepatòcit, formant un complex inactiu (Van Schaftingen 1989; Van Schaftingen, Detheux et al. 1994). La translocació de l'enzim al citoplasma es produeix en resposta a un increment en la concentració de glucosa i de precursors de fructosa 1-P (Toyoda, Miwa et al. 1994; Agius and Peak 1997). Recentment, s'ha comprovat que l'activació de l'AMPK, sense que es produeixi una depleció de l'ATP, produeix una inhibició de la translocació induïda per glucosa, per un mecanisme que involucra la fosforilació de la GKRP i la PFK2, que catalitza la formació i degradació de fructosa 2,6 bifosfat (Hue and Rider 1987), que són les proteïnes a les que s'uneix la GK en el nucli i el citoplasma respectivament (Mukhtar, Payne et al. 2008). A part, la GKRP regula l'expressió de la GK a nivell post-transcripcional, estabilitzant-la i inhibint la seva degradació (Farrelly, Brown et al. 1999; Grimsby, Coffey et al. 2000). L'expressió relativa de la GKRP és induïda per altes concentracions de glucosa, per tal de restaurar l'homeòstasi de la Glc6P, però no per insulina (Farrelly, Brown et al. 1999; Ma, Robinson et al. 2006). La regulació a nivell transcripcional de la GKRP però no de la GK en resposta a glucosa pot ésser explicada per un reajustament de l'expressió gènica per tal de mantenir l'homeostasi de Glc6P. La inducció de la GKRP comportaria la inhibició de la GK, amb la conseqüent davallada de la quantitat de Glc6P (de la Iglesia, Mukhtar et al. 2000).

La GK juga un paper rellevant en la homeòstasi de la glucosa. Degut a la seva baixa afinitat per la glucosa, l'enzim està actua com a sensor de les concentracions del monosacàrid (Matschinsky 1990). En la diabetis tipus I o insulina dependent, l'expressió de la GK és molt baixa degut a l'absència d'insulina, i és aquesta una de les raons per les quals el fetge és incapaç de metabolitzar l'excés de glucosa en sang (Iynedjian 1993). Així mateix, les mutacions de l'enzim que en causen una pèrdua de funció resulten en un

subgrup de diabetis tipus II anomenada MODY, per *maturity onset diabetes of the young* (Froguel, Vaxillaire et al. 1992; Miller, Anand et al. 1999). Aquestes mutacions que produeixen una disminució en l'activitat, provoquen una disminució en la secreció d'insulina (Byrne, Sturis et al. 1994), i una disminució en la síntesi de glicogen hepàtic (Velho, Petersen et al. 1996). Els models knockout per a l'enzim en la cèl·lula β pancreàtica són letals, degut a una diabetis severa, en canvi la manca de GK en el fetge provoca una forma lleugera de la malaltia, amb una disminució en la secreció d'insulina i una moderada hiperglucèmia (Postic, Shiota et al. 1999).

1.4.3 Glicogen sintases

Com s'ha comentat prèviament, la GS catalitza l'últim pas de la síntesi de glicogen i tradicionalment s'ha considerat que exerceix gran part del control sobre aquesta via metabòlica.

Existeixen dos isoformes majoritàries de GS, que provenen de dos gens diferents, amb un 70% d'identitat de seqüència global, la muscular (MGS) que s'expressa en la majoria dels teixits, i l'hepàtica (LGS) que és específica del fetge (Bai, Zhang et al. 1990). Si es comparen ambdues seqüències s'observa que la zona central, que presenta els dominis d'unió de substrat i el centre catalític, està més conservada, mentre que els extrems N- i C-terminal, que contenen els llocs de fosforilació que controlen l'activitat de l'enzim, són els que presenten un menor grau d'homologia (Bai, Zhang et al. 1990). La isoforma muscular presenta nou llocs de fosforilació, 2 en l'extrem N-terminal i 7 en el C-terminal (**Fig. 4**). La importància relativa dels llocs de fosforilació en la MGS en termes d'activitat enzimàtica, acumulació de glicogen i distribució subcel·lular, ha estat objectiu de nombrosos estudis (Skurat, Wang et al. 1994; Skurat and Roach 1995; Skurat and Roach 1996; Wilson, Skurat et al. 2005). La isoforma hepàtica sembla contenir set llocs de fosforilació per comparació de seqüència amb la MGS. Aquests set llocs es trobarien repartits, 2 en l'extrem N-terminal (2 i 2a), i 5 en el C-terminal (3a, 3b, 3c, 4 i 5), la LGS doncs no conté els llocs de fosforilació 1a i 1b degut a que l'extrem carboxil és més curt que en la MGS (Hanashiro and Roach 2002). La importància relativa dels llocs de

fosforilació en la LGS en termes d'activitat enzimàtica, acumulació de glicogen i distribució subcel·lular, no ha estat objectiu de tants estudis com la MGS. De fet, només es coneix un mutant en els que sis de les set serines homòlogues a les presents en MGS han estat substituïdes per alanines (llocs 2, 3a, 3b, 3c, 4, 5) (Kadotani, Fujimura et al. 2007), per tant no es va estudiar la importància de cadascun dels llocs de fosforilació per separat.

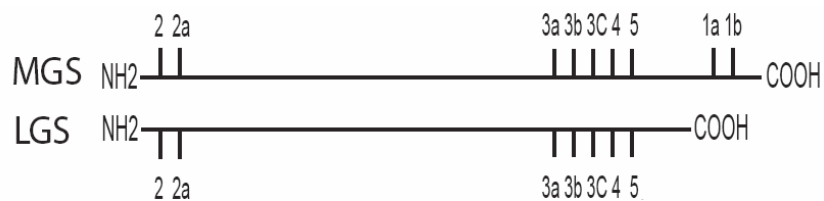


Fig.4 Comparació esquemàtica dels centres de fosforilació de les isoformes muscular i hepàtica de la glicogen sintasa de mamífer. Les línies verticals representen la localització relativa dels llocs de fosforilació, en les seqüències de la GS muscular (MGS) i l'hepàtica (LGS) indicades per una línia horitzontal. Només set de les nou serines presents en la seqüència de la MGS són presents en la seqüència de la LGS.

La GS és inactivada per fosforilació en aquests residus dels extrems N- i C-terminals. La fosforilació de la GS disminueix l'afinitat pel substrat la UDP-Glc (Roach and Lerner 1976; Roach, Takeda et al. 1976), i per l'activador al·lostèric la Glc6P (Roach and Lerner 1976; Roach, Takeda et al. 1976; Salavert, Roach et al. 1979; Skurat, Dietrich et al. 2000), i augmenta l'afinitat per l'ATP i el Pi, que tendeixen a antagonitzar l'activació per la Glc6P (Mathews and Holde 1996). *In vitro* tant la MGS com la LGS poden ésser fosforilades per diverses proteïnes quinases, incloent la proteïna quinasa dependent de AMPc (PKA), la proteïna quinasa C (PKC), la caseïna quinasa 1 i 2 (CK-I i CK-II), la proteïna quinasa estimulada per AMP (AMPK), la PhK i la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Roach 1986; Roach 1990).

La defosforilació de l'enzim causa la seva activació. La Glc6P presenta un paper molt important, doncs la seva unió a GS converteix a l'enzim en un millor substrat per a l'acció de les fosfatases, principalment la PP1, el que condueix a la seva activació (Villar-Palasi and Guinovart 1997). Aquestes fosfatases estan formades per una subunitat reguladora específica de teixit, i una altra ubíqua i catalítica (Bollen 2001). La subunitat G_M s'expressa principalment en múscul esquelètic (Tang, Bondor et al. 1991), la G_L s'expressa en fetge (Doherty, Moorhead et al. 1995), i la *protein targeting to glycogen* o PTG (Printen, Brady et al. 1997; Berman, O'Doherty et al. 1998) i la PPP1R6 (Armstrong, Browne et al. 1997) aquestes darreres són ubíquies. Recentment s'ha descrit la subunitat PPP1R3 o R3, que s'expressa en el fetge i múscul cardíac de rata, i en múscul esquelètic, múscul cardíac i fetge en humans (Munro, Ceulemans et al. 2005). Les subunitats dirigeixen la PP1 cap al glicogen, a on estan units els seus substrats la GS, la GP i la PhK, amb el que promouen la síntesi de glicogen i n'inhibeixen la seva degradació.

Com s'ha comentat, la Glc6P juga un paper molt important en la regulació de la GS, per un costat causa l'activació alostèrica de l'enzim i també promou la seva activació covalent doncs estimula la defosforilació de l'enzim. *In vitro*, quan la G6P està present a concentracions suficientment elevades (>6 mM), la seva unió reverteix la inactivació de la GS per fosforilació (Villar-Palasi and Guinovart 1997). De fet, l'activitat de l'enzim es mesura en absència i presència d'elevades concentracions de Glc6P. En la seva presència es mesuren totes les formes de GS presents, mentre que en la seva absència o a baixes concentracions, només es mesuren les formes actives de la GS. Per tant, la relació de les activitats mesurades en absència i en presència de Glc6P és una mesura no lineal de l'estat d'activació enzimàtica, valors propers a 0,1 són propis d'un enzim inactiu, i valors per sobre de 0,7 són equivalents a activació màxima (De Wulf and Hers 1967; De Wulf, Stalmans et al. 1970; Katz, Golden et al. 1979).

Els canvis en la distribució intracel·lular de la GS podrien ésser també importants per a la seva regulació. Les dues isoformes de GS presenten una distribució subcel·lular diferent, en absència i en presència de glucosa. La MGS es troba concentrada al nucli en absència

de glucosa, en canvi quan la concentració del monosacàrid augmenta l'enzim es mou al citoplasma (Ferrer, Baque et al. 1997). Aquesta distribució de la MGS entre nucli i citoplasma no es troba controlada per cap de les nou serines que regulen la seva activitat, sinó que depèn de un clúster d'arginines involucrat en l'activació al·lostèrica de l'enzim (Cid, Cifuentes et al. 2005). En canvi, la isoforma hepàtica es troba difusa en el citoplasma cel·lular en absència de glucosa, i es concentra en el còrtex cel·lular en presència d'aquesta, i és aquí on s'inicia la síntesi de glicogen (Fernandez-Novell, Bellido et al. 1997; Garcia-Rocha, Roca et al. 2001; Fernandez-Novell, Lopez-Iglesias et al. 2002).

1.5 Degradació del glicogen

La degradació del glicogen succeeix per acció de la glicogen fosforilasa (**Fig.2**). El producte de la reacció és una molècula de Glc1P, que es converteix en Glc6P per acció de l'enzim fosfoglucomutasa. La GP no pot trencar els enllaços α (1 \rightarrow 6) de la molècula de glicogen. De fet, l'activitat GP s'atura 4 residus abans d'arribar al punt d'inici de la ramificació, l'eliminació de la qual requereix l'acció de l'enzim desramificant (DBE). La DBE presenta dues activitats glicosil transferasa i glucosidasa. La primera elimina els tres residus terminals de glucosa de la ramificació i transfereix aquest trisacàrid a l'extrem d'alguna altra ramificació externa. El residu de glucosa que encara queda unit a la cadena per un enllaç α (1 \rightarrow 6) pot ésser alliberada per acció de l'activitat glucosidasa. Aquest residu de glucosa no està fosforilat ja que la reacció catalitzada per la glucosidasa no és fosforolítica.

En el múscul la demanda d'ATP provoca la conversió del glicogen en Glc6P que pot llavors ésser usada com a substrat per a la glicòlisi. En canvi en el fetge la Glc6P pot ésser hidrolitzada per la glucosa 6-fosfatasa (GP6asa), produint ortofosfat i glucosa, i aquesta última es pot alliberar al torrent circulatori per a ésser usada per la resta de teixits.

1.6 Enzims clau en la degradació del glicogen, la glicogen fosforilasa

En mamífers, s'han identificat tres isoformes de GP, codificades per tres gens diferents, que reben el nom del teixit on preferentment s'expressen, la muscular, l'hepàtica i la de cervell (Browner and Fletterick 1992).

Com la GS, l'activitat de la GP també està controlada per interaccions al·lostèriques, d'inhibició en el cas de la glucosa, l'ATP o la Glc6P, i d'activació principalment per l'AMP. A més també pot ésser modificada per fosforilació reversible. De fet, la GP només es fosforila en un residu, la Ser 14, gràcies a l'acció de la fosforilasa quinasa, el que suposa la conversió de la forma inactiva de l'enzim (GP-b) a l'activa (GP-a) (Browner and Fletterick 1992). *In vivo*, el canvi de conformació de l'enzim hepàtic no és possible sense la presència de la fosforilasa quinasa, pel que els efectors al·lostèrics hi juguen un paper secundari (Clark and Haynes 1988). La defosforilació de la Ser 14 la duu a terme la PP1, i provoca la inactivació de l'enzim.

La unió del glucagó, hormona secretada per les cèl·lules α pancreàtiques en resposta a baixes concentracions de glucosa en sang als seus receptors hepàtics, estimula l'activació de l'adenilat ciclasa (AC), el que condueix a un increment en la quantitat d'AMPc. Aquest augment produeix l'activació de la PKA, que fosforila i per tant activa la fosforilasa quinasa. El resultat últim és una inducció de la degradació del glicogen (Bollen, Keppens et al. 1998). En canvi, en el múscul l'activació de la cascada és el resultat de la unió de l'adrenalina als seus receptors musculars. La regulació de la PhK també està afectada per mecanismes que impliquen canvis en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} . De fet la unió del calci a la subunitat de l'enzim coneguda com calmodulina provoca un canvi conformacional que estimula l'activitat catalítica de la PhK cap al seu substrat la GP-b.

1.7 Glucòlisi i gluconeogènesi

La glucòlisi és la via metabòlica en la que la glucosa és transformada en dos molècules de piruvat, que són capaces de seguir altres vies metabòliques, i així continuar entregant energia a l'organisme. Aquesta via presenta tres funcions principals. La primera és la generació de molècules d'alta energia (ATP i NADH) com a font d'energia cel·lular en processos de respiració aeròbica i anaeròbica. La segona és que el piruvat pot ésser decarboxilat a acetil-CoA, que entra en el cicle de Krebs on és oxidat a CO₂ i H₂O. Finalment la tercera és la producció d'intermediaris de 6 i 3 carbonis que poden ésser usats per d'altres processos cel·lulars, com el triacilglicerol a partir del gliceraldehid 3-fosfat, la L-alanina a partir del piruvat i el glicogen a partir de la Glc6P (Mourrieras, Foufelle et al. 1997; Bollen, Keppens et al. 1998).

El fetge, produeix gairebé el 80% de la glucosa necessària pel correcte funcionament dels altres teixits en resposta a un dejuni de 12 hores, com per exemple les neurones i els eritròcits que en són absolutament dependents. El 45% d'aquesta glucosa prové de la mobilització del glicogen (Petersen, Price et al. 1996). La gluconeogènesi ocorre majoritàriament en el fetge en un 90%, i l'altre 10% als ronyons (Ekberg, Landau et al. 1999). A part de la glicogenòlisis, la síntesi de glucosa per part del fetge es don a partir de diferents precursors, incloent aminoàcids (excepte la leucina i la lisina), piruvat, lactat, glicerol i qualsevol dels intermediaris del cicle dels àcids tricarbòxílics com a fonts de carboni. En la regulació dels enzims que hi participen hi juguen un paper clau les hormones glucagó i insulina. La primera estimula la gluconeogènesi i la glicogenòlisi, mentre que la segona estimula la síntesi de glicogen i inhibeix la gluconeogènesi.

Molts dels enzims que participen en la gluconeogènesi són comuns als que participen en la glucòlisi (**Fig.5**); ambdues rutes es diferencien per tres reaccions irreversibles que usen enzims específics d'aquest procés i que condicionen les dues vies:

a) Conversió de glucosa a Glc6P (catalitzada per una hexoquinasa) i viceversa (catalitzada per la glucosa 6-fosfatasa, G6Pasa). El flux net que s'estableix determina la producció neta o captació de glucosa per part del fetge. Aquest punt és fonamental pel manteniment de la glicèmia en situació de dejuni, així com a la tolerància a la glucosa provinent de la ingesta en situacions d'hiperglucèmia postprandial (Barzilay and Rossetti 1993; Clore, Stillman et al. 2000) (**ampliació punts 1.4.2 i 1.8.1**).

b) Conversió de fructosa 6-fosfat a fructosa 1,6-bisfosfat (catalitzada per la fosfofructoquinasa, PFK-1) i viceversa (catalitzada per la fructosa 1,6-bisfosfatasa, FBPasa). En el fetge, el control d'aquest cicle recau en la fructosa 2,6-bisfosfat, que activa el primer enzim i inhibeix el segon (Van Schaftingen 1987). La quantitat d'aquest efector al·lostèric és regulada per un enzim bifuncional que presenta dues activitats catalítiques, una quinasa (PFK-2) i una fosfatasa (FBPasa-2) (Okar, Manzano et al. 2001). Durant el dejuni, la concentració de fructosa 2,6-bisfosfat és molt baixa pel que el cicle només funciona en sentit gluconeogènic, doncs aquesta concentració no és capaç d'activar la PFK-1 (Neely *et al* 1981). En canvi, en la realimentació la quantitat de l'efector augmenta i es produeix un flux glucolític net, doncs activen la PFK-1 (Bartrons, Hue et al. 1983; Bartrons, Carreras et al. 1985).

c) Conversió de fosfoenolpiruvat a piruvat (catalitzada per la L-piruvat quinasa, LPK) i viceversa (catalitzada per la piruvat carboxilasa Pc i la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa, PEPCK). Quan una de les activitats és estimulada l'altre és inhibida, i així s'aconsegueix un flux net en una o altra direcció. L'activitat de la L-PK quinasa es troba regulada a curt termini per fosforilació dependent d'AMPc, el que comporta la seva inactivació, o bé per efectors al·lostèrics com l'ATP i l'alanina que l'inhibeixen, o la fructosa 1,6-bisfosfat que l'activen (Ljungstrom, Berglund et al. 1974). El glucagó, a través de l'augment d'AMPc, inhibeix la transcripció del gen de la L-PK, mentre que la glucosa i altres carbohidrats en presència d'insulina l'estimularia (Decaux, Antoine et al. 1989; Casado, Bosca et al. 1995). Com s'ha comentat, en la gluconeogènesi el pas invers és el de la conversió de piruvat a fosfoenolpiruvat, que el duen a terme dos enzims, la Pc i la PEPCK. La Pc transforma el piruvat en oxacetat, mentre que la PEPCK catalitza la transformació de

l'oxalacetat en fosfoenolpiruvat. La Pc és un enzim intramitocondrial en vertebrats, que no presenta regulació covalent i la seva activitat fluctua segons la concentració intracel·lular del seu substrat ja que la seva Km pel piruvat es troba dins del rang fisiològic. Només quan hi ha una elevada relació ATP/ADP o una gran quantitat d'acetil-CoA l'activitat Pc es troba estimulada (Jitrapakdee and Wallace 1999). En canvi, l'activitat de la PEPCK es regula a nivell d'expressió gènica (*ampliació punt 1.8.2*).

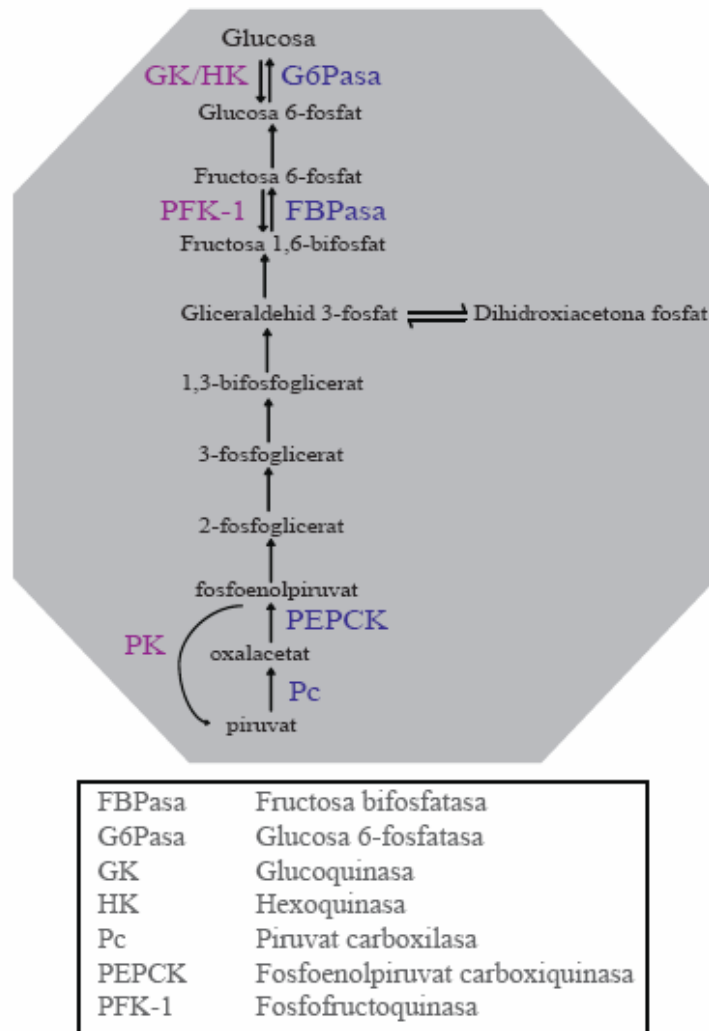


Fig.5 Esquema de la glucòlisi i la gluconeogènesi. En la figura es mostren els principals enzims que intervenen en la glicòlisi (lila) o en la gluconeogènesi (blau).

1.8 Enzims clau en la gluconeogènesi en fetge

Hi ha quatre enzims exclusivament gluconeogènics, la P_c, la PEPCK, la FBPasa i la G6Pasa. Els seus gens són regulats exclusivament a nivell transcripcional, amb l'excepció de la FBP, que és inhibida al·lostèricament per la fructosa 2,6-bifosfat i AMP, i la P_c, que és activada al·lostèricament per acetil-coA. Els dos enzims que es regulen principalment a nivell transcripcional estan altament relacionats amb malalties que es caracteritzen per la pèrdua de la homeòstasi de glucosa.

Les mutacions que afecten l'activitat de la G6Pasa causen un desordre metabòlic anomenat malaltia de *von Gierke* o glucogenosi tipus 1, que es caracteritza per hipoglucèmia severa i per desordres en el metabolisme lipídic i del glicogen (Cori and Cori 1952). Així mateix, els animals que tenen una activitat G6Pasa elevada són obesos, presenten una excessiva gluconeogènesi i són resistents a la insulina (Trinh, O'Doherty et al. 1998). Aquests animals presenten hiperinsulinèmia i intolerància a la glucosa així com una reducció en el contingut de glicogen hepàtic, un fenotip similar a la diabetis tipus II.

La PEPCK també és un enzim clau en la regulació de la homeòstasi de la glucosa, i s'ha descrit que la sobreexpressió de l'enzim en ratolins causa diabetis tipus II (Valera, Pujol et al. 1994). La desregulació de la PEPCK és un factor que contribueix a la patogènesi de la diabetis I i II. Els animals que sobreexpressen la PEPCK en el fetge tenen una taxa de producció de glucosa augmentada, en part perquè augmenta l'expressió de l'enzim G6Pasa (Valera, Pujol et al. 1994). A més, aquests animals presenten hiperglucèmia en dejuni, disminució en el contingut de glicogen hepàtic i intolerància a la glucosa, símptomes semblants als de la diabetis tipus II i que suggereixen resistència a la insulina.

1.8.1 Glucosa 6-fosfatasa

La G6Pasa és un complex enzimàtic situat al reticle endoplasmàtic (Mithieux, Vidal et al. 1996). El complex està format per una hidrolasa i una translocasa. El centre catalític de la hidrolasa es troba al lumen del reticle endoplasmàtic, i la translocasa és la responsable del transport transmembrana del substrat la Glc6P i probablement dels seus productes, és a dir, la glucosa i el fosfat inorgànic (Gerin, Veiga-da-Cunha et al. 1997).

L'activitat de l'enzim es troba disminuïda després d'una ingesta de carbohidrats, degut a l'efecte de la insulina secretada pel pàncrees i l'adiponectina secretada pel teixit adipós (Newgard, Foster et al. 1984; Minassian, Daniele et al. 1995; Streeper, Svitek et al. 1997; Combs, Berg et al. 2001).

En condicions de dejuni, la transcripció del gen de la G6Pasa es veu incrementada, i això es deu a terme mitjançant tres camins:

a) En el primer, el glucagó incrementa la concentració d'AMPc el que activa a la PKA, i aquesta fosforila al factor de transcripció CREB (*CRE binding protein*) (Mayr and Montminy 2001). Es produeix llavors el reclutament de coactivadors transcripcionals al promotor de la G6Pasa, com el PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1*), el que comporta l'augment en la seva transcripció (Herzig, Long et al. 2001). El PGC-1 α interacciona directament amb el factor FOXO1, que en el nucli també interacciona amb el factor CREB, i el resultat és l'increment de l'expressió tant de la G6Pasa com de la PEPCK (Puigserver, Rhee et al. 2003; Barthel, Schmoll et al. 2005; Koo, Flechner et al. 2005; Mounier and Posner 2006; Schilling, Oeser et al. 2006). Recentment es proposa que l'acció de la interacció de FOXO1 amb el coactivador transcripcional PGC-1 α és indirecta, i es donaria a terme mitjançant la unió al receptor nuclear HNF-4 α (Schilling, Oeser et al. 2006; Cheng and Saltiel 2009).

b) En el segon, l'activació de PKA bloqueja la fosforilació de TORC2 (*transducer of regulated CREB activity 2*) per part de la quinasa SIK2, amb el que TORC2 no pot translocar al citoplasma i per tant augmenta l'expressió del gen de la G6Pasa, doncs s'amplifica la transactivació per part de CREB (Koo, Flechner et al. 2005; Cheng and Saltiel 2006), comentada en el punt anterior (**Fig.6**).

c) En el tercer, el factor SRC-2 (*steroid receptor coactivator 2*) s'uneix al receptor nuclear ROR α (*retinoid-related orphan receptor α*) (Chopra, Louet et al. 2008) (**Fig.6**), el que transactiva el promotor de G6Pasa. A diferència dels altres factors, SRC-2 i ROR α no controlen l'expressió d'altres enzims gluconeogènics com la PEPCK o la G6P translocasa (Xu and Li 2003; Chopra, Louet et al. 2008).

A part, l'expressió del gen de la G6Pasa està estimulada per glucosa i leptina. En el cas de la glucosa, tot i la paradoxa aparent, sembla que la funció que tindria seria el manteniment d'una concentració adequada de Glc6P davant d'una alta activitat GK (Aiston, Trinh et al. 1999).

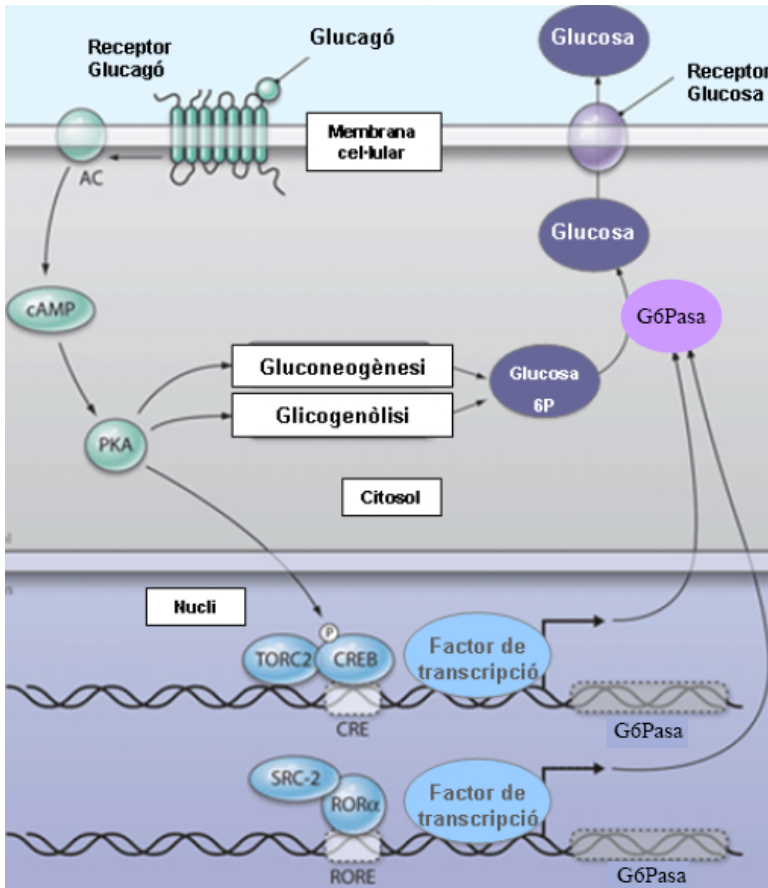


Fig.6 El promotor de G6Pasa amb els factors de transcripció i coactivadors que en regulen la seva expressió en el dejuni. El glucagó s'uneix al receptor el que causa l'activació de l'adenil ciclasa (AC), que incrementa la quantitat d'AMPC i en conseqüència s'activa PKA. Aquesta estimula les vies gluconeogènica i glicogenolítica el que comporta un augment en la concentració de glucosa 6-P, que per acció de la G6Pasa es transformada en glucosa que es alliberada al torrent circulatori. La G6Pasa està regulada pel complex CREB i TORC2 que s'uneixen a l'element de resposta CRE, i el complex RORα i SRC-2 que s'uneixen a l'element de resposta RORE. Figura adaptada de (Cheng and Saltiel 2009).

Figura adaptada de (Cheng and Saltiel 2009).

1.8.2 Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa

Trobem dues isoformes de PEPCK, la mitocondrial (PEPCKm) i la citosòlica (PEPCKc). La primera presenta una expressió constitutiva, mentre que l'expressió de la segona fluctua en funció d'hormones i dieta. La forma citosòlica de la PEPCK és un enzim clau en el control de gluconeogènesi, i la seva activitat està regulada per la transcripció del seu gen. El glucagó, els glucocorticoides i les hormones tiroidees estimulan la transcripció del gen de la PEPCK, mentre que la insulina i la ingesta de carbohidrats la inhibeixen.

Per entendre la seva regulació és necessària la descripció de l'organització del seu promotor en mamífers (**Fig.7**). Els elements reguladors es poden dividir en quatre regions (Croninger, Chakravarty et al. 2002):

a) La regió 1 conté un element de resposta a AMPc (CRE) al que també es pot unir la proteïna CREB (*CRE binding protein*). A través del lloc d'unió CRE i competint amb el CREB trobem el factor ATF3 (*activating transcription factor 3*), possiblement estabilitzant la unió del factor NF1 (*nuclear factor 1*) al seu lloc d'unió i potenciant-ne el seu efecte negatiu sobre la transcripció del gen. El factor ATF3 reprimeix la transcripció del gen en el fetge (Allen-Jennings, Hartman et al. 2002).

b) La regió 2 conté els elements d'unió al factor HNF-1 (*hepatic nuclear factor 1*) que controlen l'expressió a teixit renal, i el lloc P3(I), a través del qual els factors de transcripció C/EBP α i β en controlen la transcripció al fetge i al teixit adipós (Hanson and Reshef 1997). La deleció d'aquesta regió en el promotor de la PEPCK (Patel, Yun et al. 1994), o bé la deleció del factor de transcripció C/EBP α (Wang, Finegold et al. 1995). En aquesta regió també s'ha descrit una zona d'unió a SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein*), que exerceix un potent efecte negatiu sobre la transcripció.

c) La regió 3 presenta una unitat de resposta a glucocorticoides (GRU), unitats de resposta a glucosa (GRE), una regió AF1 a la qual s'hi uneixen els factor HNF4- α , el PPAR α - γ (*peroxisome proliferator activated receptor*), el RXR (*retinoic X receptor*), i un possible lloc d'unió del SREBP-1c. El factor PGC-1 α coactiva l'HNF4- α .

d) La regió 4 presenta dos llocs d'unió de PPAR γ 2, que són necessaris per l'expressió a teixit adipós.

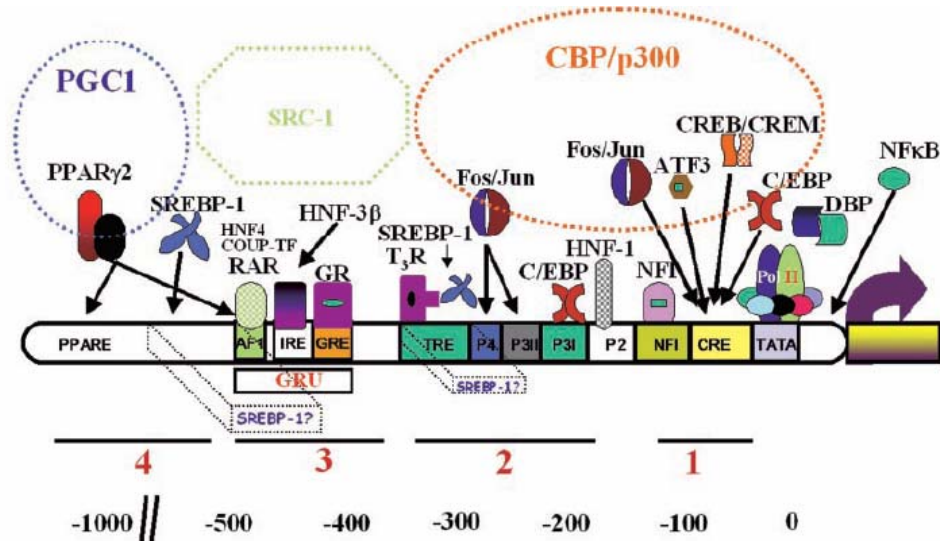


Fig.7 El promotor de PEPCCK amb els factors de transcripció i coactivadors que en regulen la seva expressió. T3R, thyroid hormone receptor; DBP, D-binding protein; CREM, cAMP regulatory element modifier; RAR, retinoic acid receptor; TRE, thyroid hormone regulatory element; Pol II, RNA polymerase II; GRE, glucocorticoid regulatory element; P2, P3(I), P3(II), and P4, are protein binding sites identified by DNase I footprinting; PPARE, peroxisome proliferator-activated receptor element; IRE, insulin response element. Figura adaptada de (Croninger, Chakravarty et al. 2002).

1.8.3 Fructosa 1,6-bifosfatasa

Troben dues isoformes de FBPasa. La FBPasa 1 que s'expressa en fetge, en ronyó, pròstata, testicle, ovari, glàndula i còrtex suprarenal, estómac, cor, intestí prim, pulmó, pàncrees (Yanez, Nualart et al. 2003). La FBPasa 2, que es codifica per un altre gen i la funció de la qual roman desconeguda (Herzog, Waltner-Law et al. 2000).

La FBPasa 1 es regula principalment per inhibició al·lostèrica, per la fructosa 2,6-bifosfat i AMP. A més, trobem pocs estudis que profunditzin sobre els canvis en la transcripció de l'enzim en resposta a diferents estímuls. Es coneix que l'abundància d'ARNm de FBPasa es troben incrementats per un increment intracel·lular d'AMPc i una baixada en la quantitat d'insulina (el-Maghrabi, Pilkis et al. 1988; Andrikopoulos, Rosella et al. 1993).

Estudis del promotor de la FBPasa 1 humana mostren que hi ha regions d'unió per la família de factors de transcripció Sp, involucrats en la regulació transcripcional de gran varietat de gens housekeeping, i pels factors de transcripció upstream stimulatory factor 1 i 2, els que també estan involucrats en la regulació d'altres gens involucrats en el metabolisme de la glucosa i àcids grassos (Herzog, Waltner-Law et al. 2000). Un dels altres elements que en regulen la transcripció és el factor NF- κ B que com en el cas de la PEPCK funcionaria com un repressor. Els factors HNF1, l' HNF3 i l' HNF4, que com ja s'ha comentat prèviament juguen un paper important en la regulació de la PEPCK i la G6Pasa, també en regularien la transcripció.

2. DIABETIS I METABOLISME DEL GLICOGEN HEPÀTIC

La diabetis *mellitus* és una malaltia caracteritzada per una deficiència de síntesi d'insulina per part de les cèl·lules β pancreàtiques, o bé per la incapacitat de l'hormona d'actuar en teixits diana com el múscul, el fetge o el teixit adipós, el que comporta un augment de la glicèmia.

Nombrosos estudis demostren que la pèrdua de la regulació de la deposició del glicogen presenta un paper central en els mecanismes que condueixen a la hiperglucèmia (Magnusson, Rothman et al. 1992; Cline, Rothman et al. 1994; Velho, Petersen et al. 1996). No és sorprenent doncs que en pacients diabètics i en estats pre-diabètics existeixin alteracions en el metabolisme del polisacàrid, caracteritzat per una disminució en la seva deposició tant en fetge com en múscul. Degut a que la reacció catalitzada per la GS ha estat considerada clàssicament com el pas limitant en la síntesi de glicogen, diversos estudis han cercat si es produïen mutacions en les regions codificants o promotores de la GS que expliquessin una reducció en la seva activitat en l'estat diabètic, però aquests han estat infructuosos.

Trobem dues formes majoritàries de diabetis:

2.1 Diabetis tipus I

La diabetis dependent d'insulina, o diabetis tipus I, és una malaltia autoimmunitària que es manifesta en l'adolescència i en la que es produeix una destrucció de les cèl·lules β dels illots de Langerhans del pàncrees. Aquesta destrucció és conseqüència d'una inapropiada resposta immunològica, i condueix a una hiperglucèmia i cetoacidosi, per incapacitat de metabolitzar la glucosa. D'altra banda, en el fetge s'activa la gluconeogènesi i la glicogenòlisi, el que contribueix a augmentar la glicèmia. Els símptomes característics són polifàgia, polidipsia, poliúria i pèrdua de pes.

Com s'ha comentat prèviament, els malalts que no reben suficient insulina per a corregir la hiperglucèmia, presenten una disminució en el contingut de glicogen hepàtic disminuïts (Hwang, Perseghin et al. 1995). La molècula de LGS no es troba alterada (Rao, Pugazhenthí et al. 1995), però la forma defosforilada i per tant activa de la LGS es troba reduïda significativament, resultat d'una disminució en l'activitat de la proteïna fosfatasa 1 (PP1) i d'un augment en l'activitat de la GSK-3, que defosforilen i fosforilen a la LGS respectivament (Foulkes and Jefferson 1984; Pugazhenthí and Khandelwal 1990; Rao, Pugazhenthí et al. 1995). La contribució de la via directa en la síntesi de glicogen hepàtic es troba disminuïda tant en models rosegadors de diabetis tipus I com en pacients humans controlats amb administració perifèrica d'insulina (Soares, Viegá et al. 2009), aquest fet es descriu com a conseqüència d'una activitat GK disminuïda (Velho, Petersen et al. 1996), o bé per un increment en la contribució a la via indirecta deguda a un augment en l'activitat de la PEPCK (Kramer, Giffin et al. 1999).

En dejuni, la gluconeogènesi es troba augmentada (DeFronzo, Simonson et al. 1982), encara que hi ha una disminució en la glicogenòlisi respecte a subjectes no diabètics (Bischof, Krssak et al. 2001). La reducció en la glicogenòlisi és en part conseqüència de la hiperglucèmia, que inhibeix l'acció de la GP (Petersen, Laurent et al. 1998).

Després de les ingestes els diabètics tipus I tampoc supprimeixen la producció de glucosa (Pehling, Tessari et al. 1984), el que encara agreuja més la hiperglucèmia postprandial.

La teràpia d'insulina intensiva permet un increment en l'emmagatzematge de glicogen hepàtic i una millora en la seva mobilització, el que serveix per poder resistir els episodis d'hipoglucèmia (Bischof, Krssak et al. 2001).

2.2 Diabetis tipus II

La diabetis mellitus no dependent d'insulina o tipus II (NIDDM) és una malaltia multifactorial que apareix de manera gradual amb l'edat (Melton, Palumbo et al. 1983), associada el 90% dels casos amb l'obesitat (Ohlson, Larsson et al. 1985), però també hi es troben involucrades la hipertensió, la hiperlipidèmia i la hiperuricèmia (Reaven 1995). Aquesta malaltia es caracteritza per resistència a la insulina per part dels teixits perifèrics, especialment en múscul esquelètic i teixit adipós, un augment de la producció hepàtica de glucosa, i alteracions en la secreció d'insulina per la cèl·lula β pancreàtica (DeFronzo 1992; DeFronzo 1999; Matthaei, Stumvoll et al. 2000). Existeixen evidències que suggereixen que aquests defectes són resposta d'una barreja complexa de factors genètics i ambientals, en particular la dieta i l'activitat física. Es considera que la resistència a la insulina generalment precedeix a la hiperglucèmia, amb el que la hiperinsulinèmia i d'hiperplàsia dels illots són respostes compensatòries que intenten contrarestar la manca d'acció de l'hormona.

La concentració de glicogen hepàtic, i també muscular, es troba disminuïda en els pacients amb diabetis tipus II respecte a subjectes sans després de les ingestes. Com que una gran part de la glucosa provinent dels àpats es converteix en glicogen hepàtic (Moore, Cherrington et al. 1991), una disminució en la síntesi de glicogen hepàtic agreuja encara més la hiperglucèmia postprandial (Magnusson, Rothman et al. 1992; Krssak, Brehm et al. 2004).

Després d'un dejuni de 23 hores, els pacients amb diabetis tipus II presenten un augment en la producció de glucosa, tot i que la glicogenòlisi es troba disminuïda (Magnusson, Rothman et al. 1992). L'augment de la gluconeogènesi no comporta un augment de la captació de precursors gluconeogènics per part del fetge, doncs no es troben variacions en els valors d'alanina, lactat i piruvat captats entre pacients i subjectes control.

Diverses hipòtesis postulen que els defectes en el metabolisme del glicogen hepàtic en aquests pacients són conseqüència de la hiperglucèmia, un increment en la disponibilitat lipídica i les alteracions en les secrecions de les hormones que regulen l'homeòstasi de la glucosa. Estudis on els nivells circulants de les hormones insulina i glucagó, la glucosa i els àcids grassos lliures han estat controlats en aquests pacients i eren semblants als dels subjectes control, demostren que la síntesi de glicogen hepàtic es troba igualment alterada, amb el que l'augment del contingut de lípid intracel·lular pot jugar un paper clau en el desenvolupament dels defectes en el metabolisme del glicogen hepàtic en els pacients diabètics tipus II (Krssak, Brehm et al. 2004).

En la diabetis MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), subgrup de diabetis tipus II causada per mutacions en el gen de la GK, també es produeix menys acumulació de glicogen hepàtic en l'estat postprandial. Estudis en aquests pacients mostren que la disminució en la quantitat de glicogen hepàtic succeeix no només després del primer àpat, quan la concentració d'insulina es troba disminuïda respecte a subjectes sans, sinó que també ocorre en els demés àpats, quan la insulinèmia i la concentració de glucagó són semblants en ambdós grups. A part de la disminució en l'acumulació de glicogen hepàtic, els pacients també presenten una elevada gluconeogènesi després de les ingestes, el que contribueix encara més a la hiperglucèmia postprandial. La descompensació en la hiperglucèmia postprandial, més que un increment en la concentració de glucosa circulant en el dejuni, està associada amb la transició de la intolerància a la glucosa a diabetis *mellitus* en aquests pacients (Velho, Petersen et al. 1996).

2.3 Teràpies antidiabètiques

En la diabetis tipus I es duu a terme la teràpia substitutòria d'insulina el que pot arribar a controlar la hiperglucèmia. Però el principal problema que en resulta és la manca de regulació fisiològica de l'alliberació de la insulina injectada, el que condueix a episodis d'hipoglucèmia i una morbiditat significativa. Una alternativa és el transplantament de

pàncrees o d'illots pancreàtics, encara que aquesta presenta el possible rebuig com a principal complicació. Actualment s'està intentant aproximacions per a la teràpia gènica, que es poden dividir en tres grans blocs. El primer seria el desenvolupament de mecanismes de prevenció de la destrucció autoimmunes de les cèl·lules β . El segon seria el transplantament de cèl·lules productores d'insulina derivades de les cèl·lules β , d'altres tipus cel·lulars (cèl·lules hepàtiques o musculars) o obtingudes per diferenciació de cèl·lules mare embrionàries o adultes. El tercer és la reducció de la hiperglucèmia diabètica mitjançant un increment en la captació i utilització de la glucosa per part del fetge i/o teixits perifèrics.

En la diabetis tipus II es duu a terme el tractament farmacològic i el seguiment d'una dieta. Els principals fàrmacs antidiabètics usats són:

a) Sulfonilurees (glicazida, glimepiridina, gliburida). Actuen unint-se al receptor de sulfonilurees de la superfície de les cèl·lules β del pàncrees, promovent la secreció d'insulina. Aquesta és suficient per a compensar la resistència dels teixits perifèrics a la hormona, incrementant el transport de glucosa a les cèl·lula musculars i reduint la producció de glucosa per part del fetge (Simonson, Ferrannini et al. 1984). Els efectes adversos són hipoglucèmia i increment de pes. Malauradament, s'acaba produint una pèrdua en l'eficàcia del control de la glucèmia, amb el que és necessària la complementació de la teràpia amb l'administració d'insulina.

b) Inhibidors d' α -glucosidasa. Actuen com a inhibidors competitiu de l'enzim, que es troba en la paret apical dels enteròcits de la part proximal de l'intestí prim, i que catalitza la degradació dels disacàrids a monosacàrids assimilables. Endarrereixen doncs la taxa d'absorció de carbohidrats, que s'acaba produint en la part més distal de l'intestí prim. Aquest retràs disminueix lleugerament la glicèmia postprandial en els pacients. Els efectes secundaris es produeixen a nivell gastrointestinal i són principalment diarrea i dolor abdominal.

c) Tiazolidineidones (rosiglitazona, pioglitazona). Actuen com a lligands selectius del receptor nuclear PPAR γ , que s'expressa principalment en teixit adipós. L'activació de la PPAR γ incrementa la capacitat de redirigir l'excés d'àcids grassos lliures en sang, amb la consegüent sensibilització a insulina en els teixits perifèrics i la reducció de gluconeogènesis hepàtica (Hanson and Reshef 2003). Els efectes secundaris són un augment en la quantitat de colesterol LDL, augment de pes, anèmia, edema pulmonar i fallada cardíaca congestiva.

d) Biguanidines (metformina). La diana molecular de la metformina és el complex I de la cadena de transport d'electrons al que bloqueja, i això condueix a una baixada en la concentració intracel·lular d'ATP (Brunmair, Staniek et al. 2004). Aquesta senyal produeix l'activació de l'AMPK (Zou, Kirkpatrick et al. 2004), que a nivell hepàtic activa vies de producció d'ATP com la captació i ús de glucosa i la β -oxidació, i inhibeix vies que en consumeixen com la gluconeogènesi i lipogènesi. Dintre del mecanisme d'acció, la metformina també promou un augment en el transport de glucosa en el múscul (Musi, Hirshman et al. 2002). Els efectes adversos són la diarrea i l'acidosi làctica (Stumvoll, Nurjhan et al. 1995). Recentment, s'ha demostrat que la metformina inhibeix la gluconeogènesi hepàtica mitjançant la regulació del receptor nuclear orfe SHP (*small heterodimer partner*) per activació de la AMPK (Kim, Park et al. 2008). L'activació de l'AMPK produiria un augment en l'expressió d'SHP, que s'uniria a factors de transcripció com el factor nuclear hepàtic HNF3 β (FoxA2) o el factor HNF-4 α , entre d'altres (Seol, Choi et al. 1996), impedit la seva acció el que finalment conduiria a una disminució en la transcripció dels gens de la PEPCK o la G6Pasa, inhibint així la gluconeogènesis hepàtica.

Els tractaments farmacològics actuals però no resulten totalment eficaços, i hi ha una disminució gradual de la funció de les cèl·lules β associada a un increment en la de glicèmia al llarg del temps, amb el que molts dels pacients necessiten injeccions d'insulina per tal d'aconseguir un millor control de la glicèmia.

2.4 Estratègies que incrementen la deposició de glicogen hepàtic i millora de la diabetis

Diverses aproximacions en rosegadors han intentat augmentar la capacitat d'acumulació de glicogen en fetge per a la millora de l'estat diabètic.

Una d'aquestes aproximacions és la sobreexpressió de la GK, el principal enzim fosforilador de glucosa en hepatòcits, qui exerceix un fort control positiu en la síntesi de glicogen. La sobreexpressió de la GK en fetge de rata (O'Doherty, Lehman et al. 1999) o en ratolí (Hariharan, Farrelly et al. 1997; Niswender, Shiota et al. 1997) mitjançant injecció d'adenovirus purificats per vena caudal, es capaç de provocar una disminució en la glicèmia, però aquest efecte s'acompanya d'un increment fatal en la quantitat de triglicèrids i àcids grassos lliures en sang (O'Doherty, Lehman et al. 1999), que es troben incrementats en malalts diabètics tipus II. Els models transgènics que sobreexpressen moderadament la GK en fetge, no presenten un increment en la quantitat de triglicèrids circulants però sí una lleugera millora en l'homeòstasi de la glucosa (Hariharan, Farrelly et al. 1997). Per tant, és necessari assolir una activitat GK que causa un risc per elevació excessiva dels triglicèrids circulants i en fetge, per a que es produeixi el benefici d'un control adequat de la glicèmia en la diabetis (Agius 2009).

Una altra aproximació descrita és la sobreexpressió de la PTG, subunitat reguladora de la PP1, en fetge de rata, mitjançant la injecció per vena caudal d'adenovirus purificats. Aquesta aproximació produeix una baixada en la glicèmia, sense que es produeixi cap alteració lipídica (O'Doherty, Jensen et al. 2000). Però els animals que sobreexpressen la PTG no poden reduir la quantitat de glicogen acumulada en fetge en resposta a senyals glicogenolítiques (Yang, Cao et al. 2002). Aquest efecte de no mobilització de glicogen es pot evitar si enlloc de la PTG es sobreexpressa una altra subunitat de la PP1, una versió truncada de les subunitats G_M i G_L , anomenada $G_M\Delta C$ (Yang, Cao et al. 2002). La sobreexpressió d'aquesta subunitat mixta en fetge de rata sota una dieta grassa (Gasa, Clark et al. 2002) o en el model de rata diabètica tipus I STZ (Yang and Newgard 2003),

produeix una disminució en la glicèmia sense que es produeixi cap alteració en d'altres paràmetres metabòlics. A més, les concentracions de triglicèrids, cossos cetònics i àcids grassos lliures circulants es troben disminuïts en aquestes rates. La baixada en la glicèmia es pot explicar parcialment degut a que la sobreexpressió de la $G_M\Delta C$ produeix una disminució en l'expressió del gen de la G6Pasa, encara que no en el de la PEPCK o la Pc. Un dels altres efectes que ajuda a restaurar l'homeòstasi de la glucosa en aquestes rates és la disminució de la ingesta respecte als animals STZ control per un mecanisme encara desconegut.

SREBP-1c, un dels factors de transcripció que modula la resposta a insulina, es troba disminuït en l'estat diabètic perquè la transcripció del seu gen depèn de l'hormona (Yamashita, Kudo et al. 2000). La sobreexpressió d'aquest factor de transcripció mitjançant la injecció per vena caudal d'adenovirus purificats en ratolins STZ produeix una disminució en la glicèmia, mentre que les quantitats de glicogen i triglicèrids hepàtics es troben incrementats respecte als animals control (Becard, Hainault et al. 2001). La sobreexpressió de SREBP-1c també causa un increment en l'expressió dels gens de la GK i la sintasa d'àcids grassos (FAS), així com una disminució en l'expressió del gen de la PEPCK, el que pot ajudar a entendre en part la millora de l'estat diabètic dels animals STZ que sobreexpressen aquest factor.

La sobreexpressió hepàtica del protooncogen c-Myc, protegeix davant el desenvolupament de diabetis induïda per destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques o per dieta (Riu, Bosch et al. 1996; Riu, Ferre et al. 2003). Els animals que sobreexpressen c-Myc tenen un increment en la glicogenogènesi, una gluconeogènesi disminuïda i una disminució en la generació de cossos cetònics. Un increment en la quantitat del protooncogen es correlaciona amb un augment en l'expressió dels gens de la GK, la PFK2 la LPK i el factor SREBP1, i una disminució en l'expressió del gen de la PEPCK. Però c-Myc està involucrat en molts processos cel·lulars a part del metabolisme, com el creixement, la diferenciació i l'apoptosi (Meyer and Penn 2008).

La inhibició de l'activitat de la GP, a part d'augmentar el contingut de glicogen hepàtic, permet la inhibició de la producció de glucosa mitjançant la via glicogenolítica (Treadway, Mendys et al. 2001). Però el risc potencial d'aquests agents és l'efecte negatiu en la funció muscular durant l'exercici, doncs afecta la capacitat d'exercici aeròbic dels pacients (Baker, Greenhaff et al. 2006). Recentment s'ha demostrat que la sola interrupció de la interacció entre PP1-G_L i la GP, mitjançant la mutació d'un residu de la GP (Tyr284Phe) (**Punt 1.2**), és capaç de millorar la tolerància a la glucosa en rosegadors (Kelsall, Rosenzweig et al. 2009). Aquests models animals presenten una activitat GS incrementada, encara que els valors de glicogen acumulats en fetge dels animals tractats no són significativament diferents dels animals control.

Finalment, un altre mètode descrit que incrementa la deposició de glicogen en fetge és l'administració de compostos inhibidors de GSK-3, que imiten l'efecte de la insulina en l'activació de la GS (Coghlan, Culbert et al. 2000). Aquests compostos a més a més produeixen una disminució en la glicèmia degut a que són capaços d'inhibir la transcripció dels gens de la G6Pasa i la PEPCK en línies cel·lulars hepàtiques (Lochhead, Coghlan et al. 2001). El mecanisme roman desconegut, però s'ha determinat que no és resultat de l'activació de la PKB o de la inhibició del factor de transcripció FOXO1. Tot i que l'administració d'aquests compostos produeix una millora en la tolerància a glucosa en rates obeses Zucker ZDF (fa/fa), model de rata diabètica tipus II (Cline, Johnson et al. 2002), cal remarcar que la GSK-3 juga un paper clau en el control de la ruta de Wnt que es troba afectada en molts càncers (Giles, van Es et al. 2003). Per tant, la inhibició de la GSK-3 podria promoure la formació de càncers per estabilització de la β -catenina i activació de les proteïnes oncogèniques c-Jun i c-Myc (Jope and Johnson 2004).

3. ADENOVIRUS

El gran coneixement de la biologia dels adenovirus (Ad) ha permès que el seu genoma hagi pogut ser adaptat per a introduir-hi gens aliens i preparar partícules víriques capaces d'infectar però no de replicar-se (Berkner 1992; Graham and Prevec 1995). Existeixen 51 serotipus d'adenovirus immunològicament diferents, els serotips d'adenovirus més usats però són els del tipus 2 (Ad 2) i els del tipus 5 (Ad 5). La partícula viral presenta simetria icosaèdrica (20 superfícies triangulars i 12 vèrtexs), i té un diàmetre de 70-90 nm. El seu genoma està constituït per un DNA de doble cadena de 36kb, on es donen tres pautes de lectura i els gens es transcriuen des de 5' a 3' i al revés, amb una capacitat codificadora per a 20 proteïnes, i que uneix covalentment a cada extrem una proteïna de 55kDa. De manera arbitrària, el genoma de l'adenovirus es divideix en 100 unitats de mapa (mu), cadascuna de les quals correspon a 360 parells de bases.

Les estratègies de disseny dels adenovirus en aquest projecte, es van basar en l'eliminació de la regió E1 (2.8 kb) de l'adenovirus 5, i la posterior substitució d'aquesta porció del genoma, el que permet que els inserts de DNA d'elevada mida s'empaquetin. L'eliminació de la regió E1, gen que s'expressa en la fase primerenca del cicle lític, permet la generació d'adenovirus que no tenen capacitat de proliferació quan infecten. Els productes del gen E1 són els primers en donar-se després de la infecció viral, i resulten ésser reguladors de la transcripció. La regió E1a està involucrada en l'activació transcripcional dels gens virals i també és necessària per a la replicació del virus. Aquesta regió és suficient per a la immortalització de les cèl·lules primàries i coopera amb d'altres oncògens, com la regió E1b, en l'establiment d'un fenotipus transformat en les cèl·lules primàries. Aquesta regió E1 l'aporten en *trans* les cèl·lules embrionàries de ronyó humà les 293 o Ad293 (Graham, Smiley et al. 1977), essent aquestes les úniques cèl·lules on els adenovirus poden proliferar. No es va eliminar la regió E3, el que en principi augmenta la bioseguretat dels vectors, perquè el gen E3-gp19K d'aquesta regió incrementa la persistència del transgen en alguns models de rosegadors (Bruder, Jie et al. 1997).

3.1 Avantatges i inconvenients dels adenovirus com a vectors de transferència gènica

Els vectors virals presenten una potencial aplicació a la teràpia gènica. Els retrovirus MMLV (retrovirus de leucèmia murina de Moloney), els adenovirus, els adenovirus adenosassociats (AAV), els lentivirus i els herpes virus són els vectors virals més usats (*Taula 1*). Els retrovirus MMLV han estat els vectors clàssics d'elecció en la majoria d'assajos clínics, però actualment són els adenovirus els més usats, de fet l'any 2009 hi ha 370 protocols en funcionament en fases clíniques tipus I i II (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>).

Vectors	Avantatges	Desavantatges
Adenovirus	Elevada eficiència Infecció de cèl·lules quiescents	Expressió transitòria Resposta immunitària
Virus adenoassociats	Estabilitat elevada per integració Infecció de cèl·lules quiescents	Poca capacitat pel DNA exogen Producció ineficaç
Retrovirus (MMLV)	Expressió estable per integració	No infecció de cèl·lules quiescents
Lentivirus	Expressió estable per integració Infecció de cèl·lules quiescents	Patogenicitat
Herpes virus	Infecció de cèl·lules quiescents	Expressió transitòria Neurotoxicitat
Lípids i polímers catiónics	Fàcil producció Infecció de cèl·lules quiescents	Baixa eficàcia Citotòxics

Taula 1. Vectors transferència gènica. Avantatges i inconvenients.

Els adenovirus Ad 2 i Ad 5 són molt comuns entre els humans, doncs són els principals causants dels refredats comuns i conjuntivitis, per això en el 90% de la població humana existeix una resposta immunològica humoral prèvia contra les proteïnes virals de la càpside, pel que es requereix la immunosupressió abans de la seva administració (Schagen, Ossevoort et al. 2004). A part, els adenovirus també desencadenen una resposta immunològica innata en les primeres 24 hores, que activa diversos gens inflamatoris (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ i IL-12) i recluta macròfags, com les cèl·lules Kupffer, neutròfils, cèl·lules citocides naturals (*natural killer*), el que fa extensiva la senyal de dany tissular i efecte sistèmic (Worgall, Wolff et al. 1997; Zhang, Chirmule et al. 2001). En 4 i 7 dies post-infecció també es desencadena la resposta immunològica cel·lular, per les cèl·lules presentadores d'antigen que internalitzen els antígens estranys, que són presentats en la membrana unit a una molècula del complex major d'histocompatibilitat, el que estimula a les cèl·lules T que s'uneixen als pèptids transformant-se en limfòcits T citotòxics. Aquests eliminen les cèl·lules que contenen en la seva superfície els pèptids presentats i això porta a la disminució de l'expressió del transgen (Yang, Nunes et al. 1994; Liu, Zaiss et al. 2003).

Hi ha diverses generacions de vectors adenovirals de diferents serotipus i que no infecten humans, que han intentat superar la barrera de la resposta immunològica. S'han generat vectors de segona generació on s'han eliminat les regions virals E1-E2-E3-E4, però la seva aplicació *in vivo* ha continuat aportant els mateixos inconvenients associats als vectors adenovirals de primera generació anteriorment comentats (Lusky, Christ et al. 1998). Hi ha vectors de tercera generació anomenats *gutless* (sense regions virals codificants), *helper dependents* (depenen d'un ajudant per a produir-se), i d'alta capacitat (inserts fins a 36kb), però no eviten la resposta immunològica humoral contra les proteïnes de la càpside, tal i com passa pels de primera generació (Brunetti-Pierri, Palmer et al. 2004). Actualment doncs no hi ha un vector ideal per a la teràpia gènica en humans, tanmateix els assajos clínics en animals tampoc han pogut predir els inconvenients de la teràpia gènica en humans o la variació entre pacients (Raper, Chirmule et al. 2003), i per conseqüència és necessari una major experimentació en quant a l'estudi de la resposta immunitària.

El vector ideal hauria de presentar les següents característiques: gran eficiència de transferència de material genètic, especificitat pel teixit diana, baixa resposta immunològica, expressió del transgen duradora, fàcil i econòmica producció i manipulació i purificació, fàcil escalat a nivell industrial.

3.2 Infecció d'hepatòcits per sistema adenoviral

En la infecció viral, el reconeixement mitjançant la càpside implica l'existència de receptors específics a la superfície cel·lular que interaccionen amb algun component viral. Però el mecanisme d'infecció dels hepatòcits no es gaire conegut. Anàlisis *in vitro* demostren que la infecció està iniciada quan la una proteïna de la càpside del virus anomenada *fiber*, que s'uneix al receptor de coxsackievirus i d'adenovirus (CAR) en la superfície cel·lular tant del fetge com del cor, pulmó i cervell (Bergelson, Cunningham et al. 1997; Tomko, Xu et al. 1997). La unió posterior d'una proteïna de la càpside anomenada *penton base*, a les integrines $\alpha\beta_3$ o $\alpha\beta_5$ facilita la internalització de la partícula adherida a la cèl·lula (Wickham, Carrion et al. 1995). Malauradament, cap de les interaccions anteriorment citades són essencials per l'entrada dels adenovirus tipus 5 als hepatòcits (Alemany and Curiel 2001; Smith, Idamakanti et al. 2002; Smith, Idamakanti et al. 2003). A més, després d'una infecció intravenosa, els adenovirus es queden retinguts al fetge (Brunetti-Pierri, Palmer et al. 2004; Lievens, Snoeys et al. 2004; Hodges, Taylor et al. 2005). Diverses aproximacions que intentaven la prevenció d'infecció mitjançant l'ús d'adenovirus deficients en les proteïnes que s'uneixen als CAR o les integrines han demostrat que han que existir d'altres mecanismes d'entrada als hepatòcits (Ni, Bernt et al. 2005; Parker, Waddington et al. 2006). De fet, altres estudis han demostrat que la infecció dels hepatòcits té lloc a través de factors de coagulació sanguinis dependents de vitamina K, incloent els factors VII, IX, X i la proteïna C (Shayakhmetov, Gaggar et al. 2005; Parker, Waddington et al. 2006; Kalyuzhniy, Di Paolo et al. 2008). Quan els adenovirus es troben al torrent sanguini, interaccionen amb aquests factors de coagulació, que consegüentment s'uneixen al receptor lipoproteïc LRP

o als proteoglicans de tipus heparan sulfat (HSPG) en els hepatòcits, el que permet l'entrada del virus. Aquest mecanisme és molt eficient i pot ésser bloquejat específicament per lactoferrina, que competeix per la unió als factors de coagulació per la unió als LPR i als HSPG en les cèl·lules hepàtiques (Parker, Waddington et al. 2006). Els adenovirus usen l'endocitosi per receptor com a via d'entrada a la cèl·lula, aquests queden envoltats per una invaginació de la membrana plasmàtica que es recobreix de la proteïna clatrina, formant una vesícula que es fusiona amb l'endosoma (Meier and Greber 2004). A mesura que l'endosoma avança fins al nucli, el pH àcid al que és exposat inicia la disrupció de la càpside, i finalment traspasa la membrana nuclear per un complex de porus (Trotman, Mosberger et al. 2001).