



UNIVERSITAT DE BARCELONA

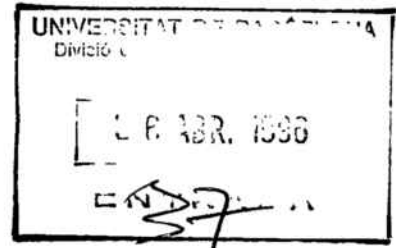
Regulació del transportador de glucosa GLUT1 en cèl·lules endotelials i musculars

Francesc Viñals Canals

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.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



UNITAT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR B
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

043
UB
VIN
reg

**REGULACIÓ DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT1 EN
CÈL·LULES ENDOTELIALS I MUSCULARS**



FRANCESC VIÑALS CANALS
Barcelona, abril de 1996

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700185073

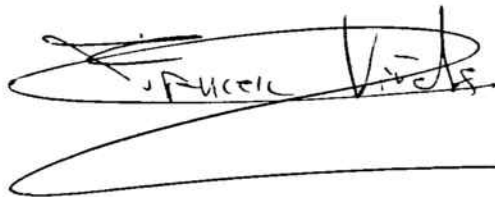
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOQUÍMICA, BIENNI 1989-1991

Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Biologia per en

FRANCESC VIÑALS CANALS

L'interessat,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'FRANCESC VIÑALS', with a long, sweeping horizontal flourish extending to the right.

Francesc Viñals Canals

Vistiplau
del director

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Zorzano Olarte', with a long, sweeping horizontal flourish extending to the right.

Dr. Antonio Zorzano Olarte
Catedràtic de Bioquímica
i Biologia Molecular
Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular
Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIO

1. EL TRANSPORT DE GLUCOSA

La glucosa és un dels principals substrats utilitzats per les cèl.lules animals. Això es deu a que és el principal component dels polisacàrids formats per les cèl.lules vegetals en la fase fosca de la fotosíntesi, i en conseqüència, una de les molècules biològiques més abundants de la Terra. Dins de les cèl.lules animals la glucosa és utilitzada per a dues funcions bàsiques: la producció d'ATP (de forma oxidativa o no oxidativa), i per a la producció de macromolècules en les reaccions anabòliques. Alguns teixits, com ara el cervell, són totalment dependents de l'aport de glucosa com a font d'energia, de manera que els mamífers han desenvolupat complexos mecanismes homeostàtics per tal de mantenir una concentració constant d'aquest sucre a la sang d'entre 5 i 10 mM. Diferents òrgans participen en aquest control, com ara el fetge, el múscul esquelètic i el teixit adipós, i el paper que ha de jugar cada un en cada moment bé donat per l'alliberament a la sang o no de diferents hormones com la insulina o el glucagó.

Un dels mecanismes que col.laboren al manteniment d'aquest equilibri homeostàtic es la regulació de l'entrada o sortida de glucosa de la cèl.lula. La glucosa és una molècula hidròfila, i com a tal, ha de superar la barrera que representa la membrana cel.lular (de naturalesa lipòfila) per poder entrar o sortir. La solució adoptada en el cas dels sucres i altres molècules hidròfiles és el pas a través de proteïnes que formen un porus a través de la membrana, els anomenats transportadors. Les proteïnes transportadores tenen la missió de resoldre dos problemes: en primer lloc i com ja hem comentat, superar la necessitat d'energia del pas de molècules hidròfiles a través d'una membrana lipòfila, i en segon lloc, la necessitat d'especificitat en el reconeixement del substrat. En els darrers anys ha quedat palès que el transport de glucosa en els teixits dels mamífers té lloc mitjançant dos tipus de proteïnes transportadores: sistemes de transport actius o dependents d'energia i sistemes de transport passius o per difusió facilitada. Els primers són proteïnes que poden transportar la glucosa en contra del seu gradient de concentració a l'utilitzar l'energia del gradient electroquímic de sodi o de protons (Hediger i Rhoads, 1994; Wright i col., 1994), i que només s'expressen en les cèl.lules de teixits epitelials. Pel contrari, els sistemes de transport passiu són sistemes independents d'energia i que per tant només poden transportar el substrat a favor de la concentració d'aquest (Kakuda i MacLeod, 1994). Aquest tipus de transport per a la glucosa és el que és present a quasi bé totes les cèl.lules dels teixits dels mamífers.

El transport de glucosa per difusió facilitada en les cèl.lules de mamífer no té lloc per un únic sistema de transport, sinó que està mitjançat per tota una família de proteïnes, productes de diferents gens i que estan expressats de manera altament controlada i específica del teixit (Baldwin, 1993; Bell i col., 1993; Gould i Holman, 1993). Aquesta família reb el nom de GLUT (per "glucose transporters"), seguint la nomenclatura de Fukumoto i col. (1989). Els mecanismes pels quals la glucosa és distribuïda entre els diferents teixits i cèl.lules de l'organisme en diferents condicions metabòliques són dependents de la correcta expressió i regulació de les diferents isoformes dels GLUTs.

En els darrers deu anys s'han publicat més de mil treballs en el camp del transportadors de glucosa de la família GLUT. Donat aquest allau d'informació, en aquesta memòria hem centrat la nostra atenció en el que serà el principal protagonista del nostre treball, el transportador GLUT-1, i en les situacions i mecanismes que regulen la seva activitat i expressió.

2. TRANSPORTADORS DE GLUCOSA PER DIFUSIO FACILITADA (GLUTs).

Com ja s'ha dit, la majoria de cèl.lules dels mamífers capten glucosa per un procés de difusió facilitada. No va ser fins l'any 1977 que Kasahara i Hinkle van lograr purificar per primer cop un transportador de glucosa d'aquest tipus (el que anys després seria anomenat GLUT-1) a partir de membranes d'eritròcits humans (Kasahara i Hinkle, 1977). Es tractava d'una proteïna de membrana altament glicosilada i que tenia una mobilitat electroforètica al voltant de 55 kDa. Quan es reconstituïa en liposomes permetia el transport de glucosa amb una cinètica idèntica a la trobada en els eritròcits. A més, unia un inhibidor específic del transport de glucosa independent de sodi, la citocalassina B (que al capdavant va ser el que va permetre la seva purificació), amb alta afinitat i amb una estequiometria que indicava que era l'únic component del sistema de transport. Gràcies a la generació d'anticossos contra aquesta proteïna es va poder clonar el seu cDNA a l'any 1985 (Mueckler i col., 1985). Però diferències trobades en estudis cinètics, d'especificitat front diferents inhibidors i de la regulació hormonal del transport de glucosa en els diferents teixits, indicaven que havien d'existir altres transportadors diferents al ja clonat. Utilitzant el cDNA de GLUT-1 com a sonda per a realitzar clivellatges amb baixa astringència de llibreries per a diferents teixits, s'han clonat al llarg dels darrers anys els cDNAs corresponents a sis transportadors diferents (GLUT-1,

2, 3, 4, 5 i 7, en funció de l'ordre cronològic de clonatge) i que formen l'anomenada família de transportadors de tipus GLUT. GLUT-1, 2, 3 i 4 són transportadors de glucosa, mentre que GLUT-5 seria un transportador de fructosa. GLUT-6 és un pseudogen incapaç de transportar, i GLUT-7 és el transportador de glucosa dels microsomes de fetge de rata (Waddell i col, 1992). La construcció de l'arbre filogenètic indica que GLUT-1 i 4, GLUT-2, i GLUT-3 i 6 són molt similars entre ells, mentre que GLUT-5 és més divergent, el que es correspondria amb la seva funció (els primers com a transportadors de glucosa i el segon de fructosa) (Baldwin, 1993).

Les isoformes de la família presenten més d'un 40% d'identitat i un 50-76% de similitut al comparar la seqüència d'aminoàcids, conservant-se 128 exactament invariants en totes les isoformes. A més, el patró d'hidrofobicitat de totes elles és superimposable (12 putatius segments transmembrana), sent en la seqüència d'aquests segments la més conservada. En canvi, les longituds i les seqüències dels extrems C- i N-terminals i de les zones de connexió entre els segments transmembrana divergeixen molt més.

Altres característiques generals per a tots els transportadors de tipus GLUT són: 1) tots transporten glucosa, encara que amb diferents eficiències i cinètiques; 2) la seva expressió és teixit específica i una mateixa cèl.lula pot expressar més d'un tipus de transportador; 3) la seva expressió està regulada pel desenvolupament i per altres factors com hormones, factors de creixement, etc; i 4) tots uneixen citocalassina B encara que no amb la mateixa afinitat.

Per últim, cal destacar que la família de transportadors del tipus GLUT pertany a una superfamília de proteïnes transportadores per a diferents molècules, totes amb un patró d'hidrofobicitat de 12 segments transmembrana (Baldwin, 1993, 1994). Dins d'aquesta superfamília es dona una alta similitut en la seqüència, el que comportaria una estructura tant secundària com terciària molt similar, i una sensibilitat semblant front diferents inhibidors com la forscolina o la citocalassina B. Aquesta superfamília, a més dels transportadors de tipus GLUT, inclou cotransportadors de sucres i protons bacterians, transportadors d'àcids carboxílics i antibiòtics també bacterians, transportadors de sucres en llevats i paràsits, i un transportador de glucosa depenent d'energia de la planta *Arabidopsis thaliana*. Curiosament, no pertanyen a aquesta família els transportadors de glucosa sodi depenents.

2.1. GLUT-1

La isoforma Glut-1 també es coneix com a transportador de l'eritròcit/cervell o d'HepG2, ja que es va clonar a l'any 1985 a partir de llibreries de cDNA de cèl.lules HepG2 (Mueckler i col., 1985) i de cervell de rata (Birnbaum i col., 1986), gràcies a la utilització d'anticossos contra la proteïna de l'eritròcit humà. És l'única isoforma que s'ha pogut purificar a partir del teixit natural (no per expressió heteròloga) i amb la que s'han pogut fer experiments de reconstitució (Wheeler i Hinkle, 1981). Fins al moment s'ha clonat el GLUT-1 procedent de diferents espècies (humà, rata, ratolí, conill, porc, i de bou), i en tots els cassos s'ha vist que es tracta d'una proteïna de 492 aminoàcids entre les quals hi ha més d'un 97% d'identitat. Es troba heterogèniament glicosilada a partir d'un únic punt de glicosilació (l'asparragina 45). Es sintetitza com una proteïna de 38 kDa, es glicosila parcialment passant a una forma de 42 kDa (Haspel i col., 1985), i és ràpidament traslladada des del reticle fins al Golgi, a diferència del que passa amb GLUT-4, que té un temps de retenció molt més llarg (Hresko i col., 1994). La proteïna madura del Golgi, ja endoH insensible, és una forma d'entre 46 i 55 kDa, depenent del tipus cel.lular degut a diferències de glicosilació (Haspel i col., 1986; Camps, 1994; McMahon i Frost, 1995) que és la que passarà a la membrana plasmàtica. D'allà pot ser internalitzada per a ser reciclada o bé és degradada en els lisosomes (Ortiz i col., 1992).

Els estudis cinètics indiquen que GLUT-1 pot transportar un ampli nombre de substrats, encara que el preferit és la glucosa (amb una K_m d'aproximadament 7 mM). A més d'hexoses, també s'ha descrit que pot transportar vitamina C (àcid ascòrbic) (Vera i col., 1993) i nicotinamida (Sofue i col., 1992), i que, juntament amb els altres transportadors, pot servir com a canal d'aigua (Fischbarg col., 1990). GLUT-1 és potentment inhibit per la citocalassina B, amb una K_d de 120 nM.

GLUT-1 és especialment abundant a l'etapa fetal. El seu mRNA ja es detecta a l'òdit i al blastocist (Hogan i col., 1991; Aghayan i col., 1992), i en el fetus s'expressa en altes quantitats en teixits com el cor, el múscul o el TAB, teixits que tenen una baixa expressió de GLUT-1 en l'adult (Santalucía i col., 1992). En l'adult té una distribució molt àmplia, expressant-se a quasi bé totes les cèl.lules dels diferents teixits, encara que moltes vegades en nivells molt baixos, en correspondència amb l'expressió d'altres isoformes de la família GLUT. En tots aquests teixits on GLUT-1 és coexpressat amb altres membres de la família, seria el responsable de l'aport de glucosa en codicions basals. Això es demostra tant es estudis sobreexpressant-lo en cèl.lules en cultiu (Robinson i col., 1993), com en estudis amb animals transgènics

sobreexpressant GLUT-1 en el múscul esquelètic (Ren i col., 1993; Marshall i col., 1993). En tots dos tipus d'estudi s'observa que la sobreexpressió de GLUT-1 condueix a que el transport basal estigui incrementat.

GLUT-1 és molt abundant en cèl.lules endotelials i epitelials, formant part de teixits que formen barreres front la sang, com els capilars de la "blood brain barrier", teixits de l'ull, de la placenta, en el fetge en els hepatòcits al voltant de les vènules hepàtiques, etc, raó per la qual es pensa que tindria un paper important en el transport de glucosa tant transepitelial com transendotelial (Harik i col., 1990; Takata i col., 1993; Maher i col., 1994). En els capilars del cervell s'ha descrit la seva presència en ambdues cares de la cèl.lula, tant a la luminal com a la contraluminal, suggerint que seria el responsable de l'entrada i sortida de glucosa de les cèl.lules endotelials, permetent el creuament de l'endoteli

. Un defecte en el transportador seria el causant d'una malaltia cerebral (De Vivo i col., 1991). En les cèl.lules epitelials de la retina i de la placenta GLUT-1 també està expressat tant en la membrana basolateral com en l'apical, el que també l'implicaria en el tràfic de glucosa cap a les cèl.lules parenquimals d'aquests teixits (Takata i col., 1993). Per últim, en els eritròcits humans també és molt abundant (representa un 6% del total de proteïna de la membrana), encara que el seu paper fisiològic no és clar (Baldwin, 1993).

2.2. GLUT-2

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

En les cèl.lules epitelials, GLUT-2 s'expressa exclusivament a la membrana basolateral on treballa de manera coordinada amb el transportador de glucosa sodi-dependent, expressat en la membrana apical, per tal d'intervenir en l'absorció o reabsorció de glucosa del lumen intestinal o de l'orina que s'està

formant. En les cèl.lules hepàtiques i en les cèl.lules β -pancreàtiques, GLUT-2 forma, conjuntament amb la glucoquinasa (isoenzim de l'hexoquinasa que també té una K_m per a la glucosa molt alta), un sensor per a la concentració circulant de glucosa. Aquest sensor respon a canvis en la concentració de glucosa circulant (siguin grans o petits) amb canvis proporcionals en la quantitat de glucosa transportada, gràcies a l'elevada K_m del conjunt transportador-glucoquinasa. Al fetge, aquest sistema serveix per a controlar la concentració de glucosa circulant, bé captant-la (en estats d'anabolisme), bé alliberant la produïda en la gluconeogènesi (en estats catabòlics). En les cèl.lules β -pancreàtiques la síntesis i secreció d'insulina depenen de la captació i posterior metabolisme de la glucosa.

2.3. GLUT-3

Aquest transportador és la principal isoforma expressada en les cèl.lules parenquimals del cervell (Kayano i col., 1988). S'han aïllat clons humans, de ratolí i de pollastre. Les proteïnes codificades tenen entre 493 i 496 aminoàcids, amb un 83 d'homologia entre elles, i amb un 64% d'identitat amb GLUT-1. La seva K_m és baixa comparada amb la de GLUT-1 (Gould i col., 1991), el que s'interpreta com una adaptació a les baixes concentracions de glucosa presents en el líquid intersticial del cervell comparat amb les trobades a la sang. A conill, mono i ratolí GLUT-3 només s'expressa al cervell, principalment a les neurones. Als humans s'expressa també a la placenta (on intervindria a la transferència de glucosa al fetus), en el fetge i en el ronyó (Gould i col., 1992). A més, GLUT-3 s'expressa a les cèl.lules musculars L6 (Bilan i col., 1992).

2.4. GLUT-4

La isoforma GLUT-4 o també anomenada sensible a la insulina (encara que no és l'única) s'expressa només en teixits que responen a la insulina incrementant el transport de glucosa, com el cor, el múscul esquelètic i els teixits adiposos blanc i marró (James i col., 1989). S'han clonat els cDNAs humà, rata i ratolí. Les proteïnes tenen 509 o 510 aminoàcids, amb una identitat en la seqüència de més del 95%, i 65% amb GLUT-1. La seva cinètica difereix de la de GLUT-1 en que té una K_m més baixa que la de GLUT-1, en que és simètrica i no pateix el fenomen de la trans-acceleració.

Es sap que GLUT-4 és el responsable de l'estimulació per part de la insulina del transport de glucosa en els teixits on s'expressa per una sèrie

d'evidències experimentals: 1) és la forma més abundant en els teixits musculars i adiposos (Holman i col., 1990; Marette i col., 1992); 2) la seva expressió al llarg de la diferenciació dels adipòcits 3T3L1 es correlaciona amb l'adquisició de la resposta a la insulina (Tordjman i col., 1989); 3) el nivell de l'expressió en els diferents tipus cel.lulars es correspon al nivell d'efecte de l'hormona (James i col., 1989; Henriksen i col., 1990) i 4) cèl.lules L6 transfectades sobreexpressant GLUT-4 exhibeixen un major transport de glucosa estimulable per la insulina (Lawrence i col., 1992).

El mecanisme pel qual la insulina estimula el transport de glucosa en aquests teixits es coneix des de fa quinze anys gràcies a treballs ja clàssics de Cushman i Wardzala per un costat i Suzuki i Kono de manera independent (Cushman i Wardzala, 1980; Suzuki i Kono, 1980). Aquest mecanisme consisteix en la translocació des d'un compartiment intracel.lular cap a la membrana plasmàtica de transportadors de glucosa (Birnbaum, 1992; James i col., 1994; Zorzano i col., 1996). La translocació afecta només a GLUT-4 en el cas del múscul esquelètic (Douen i col., 1990), mentre que tant a adipòcits (Zorzano i col., 1989) com a cardiomiòcits (Muñoz, 1995) la insulina provoca la translocació tant de GLUT-1 com de GLUT-4, encara que l'efecte és molt més gran sobre aquest darrer. Altres tipus de tractament també estimulen el transport en els mateixos model cel.lulars pel mateix tipus de mecanisme, com ara la contracció muscular (Douen i col., 1990).

2.5. GLUT-5

Aquest és el transportador més divergent de tota la família. La seva seqüència té només un 40% d'homologia amb les altres isoformes (Kayano i col., 1990). Això és consistent amb que, com ja s'ha dit, es tractaria més d'un transportador de fructosa que no de glucosa (Burant i col., 1992). El cDNA codifica per a una proteïna de 501 aminoàcids i s'expressa a la membrana apical de les cèl.lules de l'intestí prim, a l'espermatozoo, i en baixos nivells, al ronyó, al múscul esquelètic i teixit adipós. La seva funció seria la captació de la fructosa de la dieta en el cas de l'intestí (Davidson i col., 1992; Mahraoui i col., 1992), i la captació del mateix sucre del líquid seminal en el cas dels espermatozoos (Burant i col., 1992).

3. CARACTERISTIQUES GENERALS DELS TRANSPORTADORS DE GLUCOSA

3.1. MODEL DE TRANSPORT

El transport de glucosa per part dels transportadors de tipus GLUT exhibeix una cinètica de tipus Michaelis-Menten o hiperbòlica quan es mesura el transport en diferents condicions: zero-trans, en condicions d'equilibri, etc (Baldwin, 1993). Però les Km i Vmax que s'obtenen amb aquests diferents tipus d'estudi són diferents per a l'entrada que per a la sortida del substrat de la cèl.lula, el que indica que el transport no és simètric. Aquesta observació, juntament amb el fenomen de la trans-estimulació que presenta el transport de glucosa (l'estimulació del fluxe d'un substrat marcat en una direcció si a l'altre costat de la membrana hi ha el substrat sense marcar), han portat a postular un model de transport per aquests transportadors anomenat de "conformació alternativa d'un únic lloc d'unió per al substrat" (Baldwin, 1993). Aquest model postula que existiria un únic lloc d'unió en el transportador per al substrat i que només pot estar exposat cap a un dels costats de la membrana (o bé una conformació "cap a dins" o bé una conformació "cap a fora"). Aquest lloc, per efecte d'un canvi conformacional, es mouria oferint-se a l'altre costat. En el cas que el lloc d'unió es trobés ocupat per un substrat, el canvi conformacional comportaria el trasllat i per tant el transport del substrat. La velocitat del canvi conformacional seria més gran en el cas d'haver substrat lligat al transportador que en el cas que estigui buit, el que explicaria el fenomen de la trans-estimulació.

Malgrat que aquest model explica bé els resultats obtinguts al mesurar el transport, altres tipus d'experiments, com estudis amb inhibidors reversibles que s'uneixen a un costat o altre del transportador, indiquen que seria més correcte un model on es donaria el canvi conformacional però on existirien a la vegada els dos llocs d'unió, dins i fora (Carruthers, 1986; Carruthers i Helgersen, 1991). Una possible explicació seria l'existència d'homooligòmers que poguessin exposar a la vegada el lloc d'unió al substrat a cada costat de la membrana, com proposa el grup de Carruthers (Hebert i Carruthers, 1992).

3.2. LLOC D'UNIO DEL SUBSTRAT

La glucosa pot unir-se tant a la part externa del transportador com a la part interna. L'existència dels dos llocs d'unió a la vegada o de manera

exclusiva no està clara, però si ha estat demostrada l'existència d'ambdós i que tindrien estructures diferents. Així, diferents anàlegs d'hexoses (amb diferents modificacions en alguns dels carbonis de l'anell) que no es poden transportar però que sí inhibeixen el transport, només ho fan quan es troben dins de la cèl.lula (els modificats en el carboni 1) però no quan es troben fora, o només inhibeixen quan es troben fora i no quan estan dins (els modificats en el carboni 4 i 6) (Barnett i col., 1975).

L'estudi del lloc precís d'unió de la glucosa s'ha abordat gràcies a l'existència d'una sèrie d'inhibidors específics i reversibles del transport, la unió dels quals és competida per la glucosa. Aquests inhibidors són la citocalassina B i la forscolina (que s'uneixen a la part interna del transportador), i derivats de la bis-manosa (com l'ATB-BMPA), que s'uneixen a la part externa. Aquest inhibidors s'uneixen reversiblement a la proteïna, però utilitzant el fotomarcatge podem unir-les al transportador i conèixer el seu lloc d'unió (Cairns i col., 1984; Shanahan i d'Artel-Ellis, 1984; Wadzinski i col., 1987; Clark i Holman, 1990). A partir d'aquest tipus d'estudi, juntament amb la utilització de la mutagènesi dirigida per a modificar determinats residus (Mueckler i col., 1994; Hashiramoto i col., 1992; García i col., 1992; Katagiri i col., 1991; Inukai i col., 1994), sembla que el lloc d'unió extracel.lular implicaria als segments transmembrana 5, 7, 8 i 9, mentre que les hèlix 10 i 11 contribuirien al lloc d'unió citoplasmàtic.

3.3. CANVI CONFORMACIONAL

Les proves en favor de que existiria un canvi conformacional implicat en el mecanisme de transport es basen en la interferència, tant per part dels substrats com de diferents inhibidors del transport, sobre diferents estudis que es poden realitzar amb els transportadors. Com ja hem citat en l'apartat anterior, s'ha demostrat mitjançant experiments de fotomarcatge que inhibidors del transport interaccionen amb el transportador, alguns amb la part extracel.lular (ATB-BMPA, glucopiranososa, etc) i altres amb la part citoplasmàtica (forscolina i citocalassina B). Aquests inhibidors es creu que interaccionarien amb el transportador estabilitzant alguna de les dues conformacions que es postulen, la "cap a dins" o la "cap a fora". Els diferents tractaments sobre els transportadors que es veuen afectats per la presència de substrats o d'aquests inhibidors són:

1) reactius que modifiquen grups amino o sulfidril inactiven irreversiblement els transportadors. Es va demostrar que la velocitat de la

inactivació es veu modificada per substrats com la glucosa, i a més, de manera diferent si aquesta es troba dins de la cèl.lula o fora (Edwards, 1973). El mateix diferent comportament front aquests inactivadors el tenen reactius que es sap que interaccionen amb la part extracel.lular del transportador i l'estabilitzarien en la conformació "cap a fora" (com la maltosa) (Krupka, 1971), o amb reactius que interaccionen amb la part intracel.lular i l'estabilitzarien en la conformació "cap a dins" (com la citocalassina B) (Barnett i col., 1975).

2) l'emissió de fluorescència per part dels transportadors es veu modificada per substrats com la glucosa o per inhibidors, com la forscolina o la citocalassina B (Chin i col., 1992; Gorga i col., 1982).

3) la susceptibilitat a diferents proteases (termolisina, tripsina, papaïna) es veu modificada per la unió de diferents substrats o inhibidors, i de manera diferent segons aquests afectin a la part extra o a la part intracel.lular (Gibbs i col., 1988; Clark i Holman, 1990. King i col., 1991; Asano i col., 1992).

4) la unió de diferents anticossos a GLUT-1 es veu alterada quan s'incuben en presència de glucosa o de citocalassina B (Nishimura i col., 1992)

Quina seria la zona responsable del canvi conformacional?. Realitzant estudis de conformació amb el model proposat per a GLUT-1 (Gould i Holman, 1993), es va veure que el putatiu segment transmembrana 10 podia patir grans canvis de conformació, canvis que serien els responsables d'exposar el lloc d'unió de l'hexosa cap a dins o cap a fora. A l'estudiar aquesta zona dels transportadors s'observa que hi ha una seqüència molt conservada dins del segment 10, F₃₇₈FEVGGPIPW₃₈₈, que es conserva en tots els transportadors de glucosa (GLUT-1, 2, 3, 4 i 7) i es manté molt conservada a GLUT-5. Estudis realitzats en altres proteïnes de membrana indiquen que les zones riques en prolines i en glicines, com la del segment transmembrana 10, tindrien un paper important com a zones d'alta flexibilitat de la cadena. Tamori i col. (1994) han mutat la prolina 385 per una isoleucina, i han observat que el mutant disminueix la seva capacitat per a transportar glucosa i per a unir l'anàleg ATB-BMPA, mantenint en canvi la capacitat per a unir citocalassina B. Els autors postulen un model en el qual la regió del segment 10 patiria un canvi conformacional quan el transportador canvia a la conformació "cap a fora" o a la conformació "cap a dins". Al voltant d'aquest punt de pivotatge es mourien els segments 11 i 12, que podrien oscil.lar cap a la part d'unió de fora (segments 7, 8 i 9) o cap a la de dins (en la base del 10, on s'uneix la citocalassina B). També per estudis de mutagènesi dirigida s'ha postulat que la

tirosina 293 estaria implicada en el canvi conformacional que porta al transportador a adoptar la conformació "cap a dins" (Mori i col., 1994), formant part d'una zona hidrofòbica que es tancaria darrera del substrat separant-lo de la solució externa i ajudant en el procés de catàlisi del transport.

3.4. ESTRUCTURA

3.4.1. Estructura secundària

Fins el moment, no es coneix l'estructura exacta dels transportadors de tipus GLUT, cosa que no succeirà fins que no es cristalitzi alguna de les isoformes. El que sí que es va fer ja a l'any 1985, una vegada es va clonar el primer membre de la família, va ser introduir la seqüència d'aminoàcids dins de l'ordinador i realitzar una predicció de l'estructura secundària que adoptaria el transportador en funció del seu patró d'hidrofobicitat. Aquest model prediu l'existència de 12 regions prou llargues (d'uns 21 residus) i prou hidrofòbiques com per poder atravesar la membrana plasmàtica en forma d'hèlixs α (totalment hidrofòbiques o anfipàtiques), mantenint els dos extrems C i N-terminals dins de la cèl.lula i amb un gran fragment entre els segments transmembrana 6 i 7, també citoplasmàtic (Mueckler i col., 1985). Aquest model d'estructura amb 12 segments transmembrana ha demostrat ser el més comú per a proteïnes amb la funció de transportar substrats, sigui sucres, aminoàcids, etc (Baldwin, 1994).

Malgrat no tenir la confirmació cristallogràfica, diferents estudis recolzarien aquest model per als transportadors de glucosa com el més acceptable:

1) experiments d'espectroscopia i de dicromisme circular realitzats amb el transportador GLUT-1 purificat d'eritròcit indiquen que és ric en zones amb hèlixs α (Chin i col., 1987), i on el pla de les hèlixs seria perpendicular al pla de la bicapa lipídica (Chin i col., 1986; Cairns i col., 1987).

2) la utilització d'anticossos i la digestió amb tripsina indiquen que l'extrem C-terminal i el gran segment central entre els putatius segments transmembrana 6 i 7 de GLUT-1 són citoplasmàtics (Cairns i col., 1987; Davies i col., 1987; Haspel col., 1988).

3) la regió que envolta a l'asparragina 45 és extracel.lular ja que

s'ha demostrat que aquest residu és el lloc d'N-glicosilació (Cairns i col., 1987).

4) la cisteïna 429 també és, molt probablement, extracel.lular, ja que pot ser modificada des de fora per un agent reductor impermeable, quan s'expressa GLUT-1 en oòcits de *Xenopus* (May i col., 1990).

5) marcant GLUT-1 en cèl.lules intactes amb un agent impermeable a la membrana que transfereix grups de biotina, i digerint posteriorment amb tripsina, es demostra que la lisina 300 també estaria a la part extracel.lular (Preston i Baldwin, 1993).

6) insertant una seqüència "consensus" per a glicosilació a cada un dels troços que separen els diferents segments transmembrana, expressant els constructes en oòcits de *Xenopus* i veient quins són sensibles o resistents a l'acció de l'Endo H, s'ha demostrat que la distribució intra o extracel.lular dels diferents fragments entre els segments transmembrana es correspon exactament al que prediu el model dels 12 segments (Hresko i col., 1994).

7) si s'aliniem les seqüències dels transportadors de la gran família de la que formen part els GLUTs, tots amb 12 segments transmembrana, s'observa que les zones corresponents als segments transmembrana s'aliniem molt bé i amb molt poques variacions en la longitud. En canvi, les zones de connexió contenen moltes més deleccions i insercions (Baldwin, 1993).

8) el patró d'introns dins dels gens humà (Fukumoto i col., 1988) i de rata (Williams i Birnbaum, 1988) per a GLUT-1 es corresponen al que s'espera, és a dir, que tots els introns es trobin o bé a fora o bé en el límit de les zones corresponents als segments transmembrana.

3.4.2. Estructura terciària

A l'igual que amb l'estructura secundària, molt poc es sap de l'estructura que adopten els transportadors en l'espai. Sí es coneix, per experiments d'intercanvi de grups hidrogen, que dins de la proteïna existiria un canal hidrofílic que penetraria cap a dins de la membrana (Jung i col., 1986). Un canal d'aquesta naturalesa ha estat proposat que podria formar-se gràcies als segments transmembrana de naturalesa anfipàtica, les hèlixs 3, 5, 7, 8 i 11 (Mueckler i col., 1985). Aquests segments són, a més, rics en residus que

poden formar ponts d'hidrogen (és a dir, amb grups hidroxil i grups amida, serines, treonines, asparragines, glutamines i tirosines), que serien els necessaris per interaccinar amb els grups OH del substrat.

Un altre punt a tenir en compte és el fet que observant la seqüència dels transportadors de glucosa i proteïnes de la família, s'observa que es poden dividir en dues meitats simètriques (la N-terminal i la C-terminal), separades per la gran zona central i dins de les quals es repeteixen diferents motius (Baldwin, 1993). Així, el motiu D-R/K-X-G-R-R/K que formaria un gir β entre les hèlixs 2 i 3 es repeteix entre les hèlix 8 i 9 com a D/E-R/K-X-G-R-R/K. De manera anàloga, la seqüència E-X-X-X-X-X-R es repeteix entre els segments transmembrana 4 i 5, i els 10 i 11. El motiu P-E-S-P-R que es troba a l'extrem C-terminal de l'hèlix 6, es repeteix en la forma P-E-T-K-G després de l'hèlix 12. Totes aquestes evidències indiquen que aquests transportadors s'haurien originat de la duplicació d'un gen ancestral de només 6 segments transmembrana (Baldwin, 1993). Això indicaria que les dues meitats dels transportadors actuals es podrien ordenar en dos conjunts de 6 hèlixs. Això s'ha confirmat en el cas de la permeasa Lac d'*E. coli*, per a la qual s'ha demostrat que co-expressant les dues meitats es recupera l'activitat de transport, suggerint que es poden processar i associar a la membrana (Bibi i Kaback, 1990). Això és així també en el cas de GLUT-1, per al que s'ha demostrat que expressant les dues meitats per separat en cèl.lules Sf9, es perd la capacitat d'unir reactius a la part C-terminal com l'ATB-BMPA o la citocalassina B, malgrat que les dues meitats arriben a la membrana plasmàtica (Cope i col., 1994). En canvi, quan es coexpressen les dues meitats, es recupera la capacitat d'unir els reactius, el que indica que tots dos dominis es poden plegar adequadament i reconeixen a la membrana (Cope i col., 1994). Tots aquest experiments indiquen que malgrat haver pogut originar-se per una duplicació, totes dues meitats dels transportadors actuals són imprescindibles per a que pugui tenir lloc el transport. Malgrat que tots els lligands que s'han estudiat fins el moment, siguin transportats o no, s'uneixen a la meitat C-terminal, la part N-terminal tindria un paper important, bé formant part ella mateixa del porus o bé perquè establitzaria a la part C-terminal en una conformació adequada per a lligar el substrat.

3.4.3. Oligòmers

No està clar que els transportadors formin oligòmers a la membrana. El grup de Carruthers ha proposat que a la membrana d'eritròcits i a la de cèl.lules CHO que sobreexpressin GLUT-1, el transportador es trobaria en forma

d'homotetràmers formats gràcies a interaccions no covalents, estabilitzades a la seva vegada per la formació de ponts disulfur dins de cada subunitat (Hebert i Carruthers, 1992; Zottola i col., 1995). Proves a favor de l'existència d'oligòmers són: 1) mesures del pes molecular per estudis d'inactivació per radiació indiquen un pes 124.000 a 220.000 daltons (Jung i col., 1980); 2) solubilitzant les membranes els transportadors apareixen en forma de tetràmers, mentre que si es fa en condicions reductores apareixen majoritàriament com a dímers (Hebert i Carruthers, 1991); i 3) expressant transportadors quimeres formats per la major part de GLUT-1 amb l'extrem C-terminal de GLUT-4, i reconeixent les formes presents a membrana després de la solubilització i immunoprecipitació, sembla que es formen oligòmers (Pessino i col., 1991). Malgrat que sembla, per tots aquests estudis, que els transportadors es trobarien en la membrana en forma oligomèrica, altres estudis indiquen que la forma funcional seria monomèrica. Entre aquests destaquen l'expressió funcional en oòcits de *Xenopus* (Burant i Bell, 1992) i estudis de reconstitució en vesícules (Baldwin i col., 1991). Sembla que l'oligomerització podria ser important en quan a la maduració o a aspectes de la regulació.

4. REGULACIO DE GLUT-1

Com ja s'ha dit, GLUT-1 s'expressa de manera quasi bé ubíqua, moltes vegades acompanyat per l'expressió d'altres isoformes. La seva funció seria: 1) l'aport de glucosa en condicions basals, 2) el transport de glucosa en cèl.lules que formen una barrera entre el teixit i la circulació, com per exemple les cèl.lules endotelials dels capilars del cervell, i 3) l'aport de glucosa als diferents teixits en l'estat fetal. A més, GLUT-1 és el transportador expressat majoritàriament a les cèl.lules en cultiu. Això es deu, en primer lloc, a la desdiferenciació que pateixen les cèl.lules en cultiu, tornant a un estat més "fetal", estat en el que, com ja hem dit, GLUT-1 és el transportador més expressat. I en segon lloc, degut a que en estats de divisió cel.lular activa es precisa un major aport energètic i biosintètic, situacions en les quals l'expressió de GLUT-1 seria més adequada.

El fet que sigui el responsable del transport basal de glucosa fa que GLUT-1 estigui fortament regulat per situacions de l'entorn cel.lular (canvis en els requeriments energètics de la cèl.lula, canvis en l'ambient hormonal, etc). Així, s'ha descrit que un gran nombre d'agents que poden modificar l'activitat de GLUT-1. Entre aquests, hi han la majoria, sinó tots, de factors mitògens i moltes hormones, com la insulina, hormona tiroïdal, hormona de creixement,

sèrum, IGF-1, PDGF, FGF, TNF- α , TNF- β , dexametassona, etc. També incrementen o disminueixen l'activitat o quantitat de GLUT-1 situacions com la concentració de glucosa del medi, la hipòxia, la denervació del múscul esquelètic o la transformació cel.lular, i productes com el vanadat, els ésters de forbol, les sulfonilurees, etc. Per un altre costat, el fet que tant l'mRNA com la proteïna de GLUT-1 tinguin una vida mitja curta (Cornelius i col., 1990; Sargeant i Pâquet, 1993) comparat, per exemple, amb la de GLUT-4 (Sargeant i Pâquet, 1993) afavoriria que sigui més fàcil modificar ràpidament els seus nivells.

Per què és tant important regular la capacitat de transportar glucosa a la membrana, i no, per exemple, modificar la seva metabolització?. El transport net de glucosa dins d'una cèl.lula és el producte de la permeabilitat de la membrana a la glucosa i de la diferència de concentració entre els dos costats de la membrana (Ismail-Beigi, 1993). A la majoria de cèl.lules, una vegada ha entrat la glucosa dins de la cèl.lula és ràpidament fosforilada a glucosa-6-fosfat, de manera que la concentració intracel.lular de glucosa lliure sempre és molt baixa comparada amb la concentració fora de la cèl.lula. En aquestes cèl.lules (que podem anomenar "amb baixa concentració de glucosa intracel.lular") variacions en aquesta concentració intracel.lular de glucosa no es traduiran en canvis importants en la captació neta de glucosa. Un canvi important en la captació de glucosa en aquestes cèl.lules només es donarà si hi ha un canvi important en la permeabilitat, en la capacitat de transportar. A diferència d'aquestes cèl.lules, existeixen uns quants models cel.lulars, com l'hepatòcit o els eritròcits humans (amb un elevat número de transportadors en la membrana), en els que la velocitat d'entrada de glucosa és més gran que la fosforilació (i el posterior metabolisme), de manera que la concentració intracel.lular de glucosa s'acosta a la concentració extracel.lular. En aquestes cèl.lules "d'alta concentració intracel.lular de glucosa", el metabolisme més que el transport és el pas limitant per a la seva captació neta. Així, un petit canvi en la concentració intracel.lular (més o menys metabolització, per exemple) portarà a grans canvis (relatius) en la diferència de concentració i a grans canvis en la captació neta de glucosa. Com ja hem dit, la majoria de cèl.lules pertanyen al primer grup, de "baixa concentració de glucosa", on és el transport a través de la membrana el pas limitant per a la captació de glucosa. D'aquesta manera, si volem modificar la capacitat de captar-la (per exemple, davant d'un major requeriment energètic), haurem de modificar el transport a la membrana.

4.1. TIPUS DE REGULACIO

4.1.1. REGULACIO A CURT TERMINI

S'entén com a regulació a curt termini aquella que té lloc en temps inferiors a les dues hores. L'estimulació a curt terme sembla ser un efecte general per a situacions d'estrès, com la infecció vírica, xoc tèrmic, exposició a inhibidors de la respiració, o modificacions del pH. No s'afecta per inhibidors de la síntesi de mRNA o de proteïnes i no es modifiquen les quantitats de proteïna o mRNA per a GLUT-1. En aquest mecanisme es modifica la quantitat de transportadors presents a la membrana plasmàtica o l'activitat de transportadors prèviament existents.

4.1.1.1. Translocació

En diferents situacions, s'ha demostrat que GLUT-1 pot modificar la seva localització subcel.lular, incrementant o disminuint el número de transportadors presents en la membrana plasmàtica. Aquest tipus de regulació s'ha demostrat en el cas de GLUT-1 en cèl.lules BHK en resposta al sèrum i l'estrès (Widnell i col. 1990), en cèl.lules Clon 9 en resposta a un pH alcalí (Hakimian i Ismail-Beigi, 1991), en fibroblasts humans en resposta a la dexametassona (Horner i col., 1987), i en el cas de la insulina també es dóna translocació de GLUT-1 en fibroblasts 3T3-L1 (si aquests es troben en situació de confluència, no si es troben en la fase proliferativa), i en adipòcits, encara que en un grau molt menor que en el cas de GLUT-4 (Zorzano i col., 1989).

Quin és el mecanisme responsable de modificacions en la localització subcel.lular de GLUT-1?. S'ha demostrat, en el cas de la insulina, que l'efecte es trobaria a nivell de la modificació de les constants d'endocitosi i d'exocitosi (Verhey i col., 1995). Així la insulina incrementaria la constant d'exocitosi i disminuiria la constant d'endocitosi, provocant un major tràfic de GLUT-1 cap a la membrana. La informació que regula aquest efecte i la localització subcel.lular tant de GLUT-1 com de GLUT-4, es troba en la seqüència aminoacídica dels transportadors, com s'ha demostrat en experiments de sobreexpressió o d'expressió heteròloga (Haney i col., 1991; Hudson i col., 1992; Asano i col., 1992). Així, s'han identificat regions en els extrems COOH-terminal i NH₂-terminal de la seqüència, que determinarien la major retenció de GLUT-4 en localitzacions intracel.lulars, i que serien les responsables de la major exocitosi en resposta a la insulina d'aquest transportador envers GLUT-1 (Verhey i col., 1995; Marsh i col., 1995; Haney i col., 1995)

4.1.1.2. Activitat intrínscica

El nom d'activitat intrínscica del transportador respon a tota activació o inhibició de l'activitat de transport en una situació donada, quan aquesta activació o inhibició no pot ser explicada per un canvi en el número de transportadors presents en la membrana en qüestió (Czech i col., 1992). Dins d'aquest cul de sac s'inclouen, per exemple, els efectes del cadmi (Harrison i col., 1991) o d'inhibidors de la síntesi de proteïnes Clancy i col., 1991) en adipòctis 3T3-L1, on provoquen una ràpida estimulació del transport de glucosa sense que es pugui evidenciar cap canvi en la distribució de transportadors GLUT-1 i GLUT-4. També explicaria la repressió que patirien els transportadors de tipus GLUT-1 en l'adipòcit 3T3-L1 en absència d'insulina, ja que no s'explica l'alta quantitat de transportadors en membrana plasmàtica, i la baixa activitat de transport de les cèl.lules. Per un altre costat, modificacions d'aquests tipus explicarien el fet que l'activitat dels transportadors sigui més gran quan es troben en la cèl.lula sencera que quan es reconstitueixen en liposomes (Czech i col., 1992). Mecanismes que puguin explicar canvis en l'anomenada activitat intrínscica són modificacions posttraduccional del tipus fosforilació, l'acomplexament amb altres proteïnes o reguladors, i la formació d'oligòmers.

4.1.1.2.1. Fosforilació

A diferència dels resultats obtinguts amb GLUT-4, del que la seva activitat sí sembla estar sotmesa a regulació mitjanant mecanismes de fosforilació-desfosforilació (Begum i Draznin, 1992; Reusch i col., 1993; Begum i col., 1993), tots els estudis realitzats fins ara coincideixen en la poca importància que tindria la fosforilació en el cas de GLUT-1. En primer lloc, GLUT-1 no es troba fosforilat en l'estat basal (Gibbs i col., 1986; Joost i col., 1987). A més, l'únic estímul descrit fins el moment que pot incrementar el seu estat de fosforilació és l'activació de la proteïna quinasa C, tant "in vitro" (Witters i col., 1985) com "in vivo" mitjançant la incubació de cèl.lules amb ésters de forbol (Witters i col., 1985; Gibbs i col., 1986; Joost i col., 1987). Malgrat que els ésters de forbol incrementen el transport de glucosa (Gibbs i col., 1986; Allard i col., 1987) i la translocació de transportadors GLUT-1 i GLUT-4 a la membrana (Saltis i col., 1991), no s'ha comprovat, mitjançant experiments de reconstitució dels transportadors fosforilats o no, si la fosforilació modifica la capacitat de GLUT-1 per a transportar glucosa, o si la fosforilació estaria implicada en el mecanisme de translocació.

4.1.1.2.2. Oligòmers

Com ja s'ha descrit anteriorment, GLUT-1 podria formar oligòmers, concretament tant homotetràmers com homodímers (Hebert i Carruthers, 1992; Zottola i col., 1995). El mateix grup que ha demostrat la seva existència postula que la unitat funcional de GLUT-1 seria l'homotetràmer. Defensa un model per al transport en el qual l'homotetràmer funcionaria presentant a la vegada llocs d'unió cap a dins i llocs d'unió cap a fora (dos i dos). La unió del substrat provoca la conversió dels llocs cap a fora en llocs cap a dins i al revés, però mantenint sempre la presència de les dues orientacions. En canvi, en els dímers les dues conformacions serien una independent de l'altra. Els homotetràmers, presentant les dues conformacions a la vegada, serien més eficients transportant glucosa (senzillament per la velocitat en la que apareixen de nou punts d'unió al substrat en una orientació determinada), oferint una manera de regular la capacitat de transport modificant la relació de formes presents a la membrana. S'ha demostrat que la formació dels homotetràmers depèn de la formació de ponts disulfur dins de cada subunitat entre les cisteïnes 347 i 421 (Zottola i col., 1995). Modificant la formació d'aquests ponts disulfur podem afavorir una conformació o una altra, fent el transport més eficient o menys. Malgrat aquestes evidències, tot això són només especulacions ja que encara no s'ha trobat cap tractament que modifiqui la formació d'oligòmers de cap transportador de glucosa.

4.1.1.2.3. Interacció amb altres proteïnes

S'ha descrit la interacció de GLUT-1 amb diferents proteïnes. Una de les primeres va ser la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (Lachaal i col., 1990), que s'unia a vesícules molt riques en el transportador per la part citoplasmàtica d'aquest. Aquesta unió era incrementada per ATP, i no modificava l'activitat del transportador però sí la de l'enzim, inhibint-lo (Lachaal i col., 1990).

Per un altre costat, s'ha postulat que la interacció de l'extrem COOH-terminal de GLUT-1 amb un proteïna citosòlica seria la responsable de la disminució de la seva capacitat de transport en cèl.lules Clon 9 (Shi i col., 1995). Efectivament, en el mateix estudi s'evidencia interacció de dues proteïnes citosòliques, de 28 i 70 kDa amb l'extrem COOH-terminal de GLUT-1, encara que es desconeix si realment tindrien un paper en l'activitat del transportador (Shi i col., 1995). Aquestes proteïnes també s'uneixen a

GLUT-4, i la de 70 kDa a GLUT-2. La unió de la proteïna de 70 kDa s'havia demostrat en un altre estudi, i es veu inhibida per la presència d'ATP (Liu i col., 1995).

4.1.1.2.4. Interacció amb altres reguladors

Una de les molècules que s'ha descrit que interacciona amb GLUT-1 modificant les seves característiques cinètiques és l'ATP. En diferents estudis realitzats pel grup d'Anthony Carruthers (Hebert i Carruthers, 1986; Carruthers, 1986) es va demostrar que l'ATP provoca una disminució tant en la V_{max} com en la K_m de GLUT-1 per a l'entrada de glucosa en l'eritròcit i un increment de la K_m per a la sortida. Aquestes modificacions no es deuen a cap modificació en el número de transportadors presents, sinó a una modificació de l'activitat dels mateixos (Carruthers, 1986). Fins el moment no s'ha demostrat si aquest efecte de l'ATP és per la seva interacció directa amb el transportador o per la interacció amb una altra proteïna que seria la que afectaria a GLUT-1, ja que l'existència d'aquestes proteïnes ha estat descrita (veure l'apartat anterior). Aquest mecanisme d'inhibició alostèrica per part de l'ATP sobre l'activitat de GLUT-1 podria estar relacionada amb l'estimulació del transport en condicions en que els nivells d'ATP són baixos, com anòxia, inhibició de la fosforilació oxidativa, etc.

4.1.2. REGULACIO A LLARG TERMINI

S'entén per aquesta tot efecte sobre GLUT-1 que necessiti de més d'unes 12 hores per a tenir lloc. Normalment es tracta de processos que són sensibles als inhibidors de la síntesi de proteïnes o d'mRNAs. Es dona, per exemple, per l'exposició a diferents factors de creixement i hormones, com el sèrum, el PDGF, l'FGF i els ésters de forbol, i en la resposta a llarg termini a l'azida o a la deprivació de glucosa. En tots els casos es detecta un increment o disminució en el número de transportadors total presents en la cèl.lula.

4.1.2.1. Activitat transcripcional

Diferents tractaments, com l'exposició perllongada a insulina, el tractament amb sèrum, etc, activen o reprimeixen l'activitat transcripcional del gen de GLUT-1. El gen per aquest transportador es troba en el braç curt del

cromosoma 1 (Shows i col., 1987). Es va clonar a partir de llibreries genòmiques humanes (Fukumoto i col., 1988), de rata (Williams i Birnbaum, 1989) i de ratolí (Murakami i col., 1992), utilitzant com a sonda els corresponents cDNAs. Ocupa unes 35 kilobases, i està format per 10 exons i 9 introns, trobant-se aquests darrers en zones que formarien segments transmembrana en el model proposat (característica comuna en moltes proteïnes transmembrana). La distribució dels exons és molt asimètrica. Així, els 2250 pb de la part final del cDNA estan codificats en una zona de 5000 pb del DNA genòmic, mentre que els 300 pb inicials del cDNA estan distribuïts al llarg de més de 20 kilobases del genòmic. El primer exó conté tota la zona 5' no traduïda així com els nucleotids que codifiquen per als 6 primers aminoàcids. El lloc d'inici de la transcripció és, en el cas del gen de rata i ratolí (Williams i Birnbaum, 1989; Murakami i col., 1992), a la posició -151 respecte a l'origen de traducció, podent començar la transcripció a partir de qualsevol de les dues adenines d'aquest punt. En el cas del gen de rata també es va posar de manifest que podien existir altres llocs d'inici de la transcripció minoritaris, concretament a la posició -221 respecte a l'inici de traducció (Williams i Birnbaum, 1989).

L'anàlisi de la zona 5' que flanqueja l'inici majoritari de transcripció (des d'on a partir d'ara contarem com a punt 0) conté diferents seqüències concensus per a elements de control de la transcripció, entre els que destaquen una TATA box a -30 pb, una caixa CCAAT a -45, quatre dominis d'unió per a factors de la família SP1 (un d'ells ja dins de la zona codificant), i un element de resposta a ésters de forbol (TGAGTCA) dins de la zona 5' no traduïda.

A diferència del fet per a GLUT-4 (Liu i col., 1992; Olson i col., 1992; Olson i Pessin, 1995), no existeix en el cas de GLUT-1 cap estudi encaminat a obtenir ratolins transgènics que expressin troços del promotor del gen de GLUT-1, amb l'objectiu de conèixer quina és la zona realment responsable de la regulació pels diferents agents o situacions. Així, els estudis realitzats es limiten a utilitzar plasmidis amb troços del promotor lligat a un gen reporter (CAT o luciferasa), a introduir-los per transfecció transitòria o estable en cèl·lules en cultiu, i en aquestes condicions, mesurar la capacitat de regular el promotor. Amb aquest tipus d'estudis, Murakami i col. (1992) van demostrar que la regió 5' propera a l'inici de transcripció no era suficient per a conferir activació per sèrum, per PDGF ni per l'oncogen ras, encara que si s'activava per l'oncogen src. Això els va portar a buscar altres zones del promotor del gen de GLUT-1 que si poguessin respondre a l'activació per aquests factors. Van obtenir dues zones "enhancers", una situada entre -3.3 kb i -2.7 kb (enhancer 1), i l'altra situada dins del segon intró, concretament entre +16.7 kb i +18 kb (enhancer 2), que els incrementava l'activitat del promotor "basal" 8 vegades

en el primer cas, 14 en el del segon, i 23 vegades conjuntament. Aquestes zones són clars "enhancers", ja que també estimulen l'activitat quan es situen en la direcció oposada respecte al CAT, i a que també estimulen l'activitat d'un promotor heteròleg com és el cas del promotor de la timidina kinasa (Murakami i col., 1992). A més, aquestes dues zones enhancers serien les responsables de la resposta a sèrum i PDGF (Murakami i col., 1992) i a insulina (Todaka i col., 1994), mentre que només l'enhancer 1 seria l'únic responsable de la inducció de GLUT-1 per la hipòxia (Ebert i col., 1995).

4.1.2.2. Estabilitat de l'mRNA

S'han descrit diferents agents que modifiquen la quantitat d'mRNA per a GLUT-1 independentment dels seus efectes sobre la velocitat de transcripció del gen. Així, la insulina o la hipoglucèmia (Maher i Harrison, 1990), el $TNF\alpha$ (Cornelius i col., 1990), l'AMPc (Cornelius i col., 1991), el TPA o l'àcid okadaic (Stephens i col., 1992) estableixen l'mRNA per a GLUT-1, incrementant la seva vida mitja i pujant, en conseqüència, els nivells de proteïna i de transport. L'estabilitat d'un missatger ve donada per la seva interacció amb proteïnes que s'uneixen a la zona 3' no traduïda. En el cas de GLUT-1 es va demostrar que existia una zona a la part 3' del seu missatger molt rica en A i U. Es va demostrar que aquesta zona unia el factor "adenosine-uridine binding factor" (AUBF) (Stephens i col., 1992), factor que com ja s'havia demostrat incrementava la vida mitjana d'altres mRNAs, i que l'activitat d'unió de l'AUBF pujava després del tractament amb $TNF\alpha$, l'AMPc, el TPA o l'àcid okadaic (Stephens i col., 1992).

4.1.2.3. Estabilitat de la proteïna

S'ha demostrat que la transformació de fibroblasts de pollastre amb l'oncogèn v-src, provoca un increment en la quantitat de la proteïna GLUT-1 degut a una disminució de la seva degradació, sense cap efecte sobre la velocitat de biosíntesi a cap nivell (ni de l'mRNA ni de la traducció) (Shawver i col., 1987). Aquest efecte no es dona en fibroblasts de rata (White i Weber, 1988), però sí quan es transfecta el transportador humà en fibroblasts de pollastre (White i Weber, 1990). Es desconeixen els mecanismes pels quals es modifica l'estabilitat de la proteïna, però els mateixos autors descarten que es tracti de mecanismes dependents de fosforilació/defosforilació (Shawver i col., 1987).

Per un altre costat, també el tractament perllongat amb insulina perllonga

la vida mitjana de la proteïna tant per a GLUT-1 com per a GLUT-4 en adipòcits 3T3-L1 (Sargeant i Paquet, 1993), encara que només en el cas de GLUT-1 també estimula la seva síntesi. Així mateix, la quantitat de glucosa present en el medi també modifica la vida mitja de GLUT-1, disminuint-la en condicions d'hipoglucèmia (McMahon i Frost, 1995).

4.1.2.4. Glicosilació

Els transportadors de glucosa de la família GLUT contenen un únic lloc d'N-glicosilació conservat entre tots els membres de la família. Es tracta de l'asparragina 45 de la seqüència de GLUT-1, que es troba dins de la zona concensus d'N-glicosilació (Asn-X-Thr/Ser), entre els segments transmembrana 1 i 2 en el llarg "loop" extracel.lular. Experiments realitzats tractant cèl.lules Swiss 3T3 amb l'inhibidor de l'N-glicosilació tunicamicina, demostren que la pèrdua de la glicosilació comporta una disminució de la V_{max} del transport de glucosa sense canvi en la K_m (Kitagawa i col., 1985). Asano i col., creant mutants de l'asparragina 45 i transfectant-los en cèl.lules CHO, també observen modificacions en l'activitat de transport, augmentant la K_m per la glucosa (Asano i col., 1991). En el mateix estudi, observen que la manca de glicosilació provoca una modificació en l'estructura del transportador (detectada per canvis en la sensibilitat al marcatge per ATB-BMPA), de manera que conclouen que la glicosilació, si bé no imprescindible per a l'activitat de transport, sí mantindria una estructura del transportador més afí per la glucosa, augmentant així el transport (Asano i col., 1991). Un estudi posterior del mateix grup (Asano i col., 1993), revela que la no glicosilació provoca una retenció dels transportadors dins de la cèl.lula i una major inestabilitat de la proteïna.

S'han descrit diferències en la glicosilació de GLUT-1 segons el teixit on s'expressi (Maher i col., 1994; Camps, 1994; Kumagai i col., 1994). Així per exemple, la forma de GLUT-1 expressada en les cèl.lules endotelials de la "blood brain barrier" té un pes molecular de 55 kDa, mentre que la forma expressada en les cèl.lules del "Choroid plexus" té un pes de 47 kDa (Kumagai i col., 1994). Totes aquestes diferències són degudes a canvis en l'N-glicosilació, sense canvis en l'O-glicosilació. Es desconeix si aquestes diferències en la glicosilació tenen una importància en la funció del transportador. Sí que s'han descrit casos en que s'utilitzaria la capacitat de modificar la glicosilació de GLUT-1 per tal de regular la capacitat de transportar glucosa. Així, mutants de la línia de fibroblasts de hamster V79 deficients en la capacitat d'obtenir energia mitjançant la cadena respiratòria, presenten un increment de 3 vegades en la V_{max} per al transport de glucosa

(Pratt i Germinario, 1994). Aquests mutants no presentaven cap modificació ni en els nivells totals de transportadors expressats ni en la quantitat de transportadors presents en la membrana plasmàtica, però aquests transportadors presentaven una major mobilitat electroforètica. Per experiments de tractament amb endoglicosidasa F es va demostrar que les diferències es devien a una major glicosilació en els mutants (Pratt i Germinario, 1994). També híbrids somàtics transformats tenen una isoforma de GLUT-1 glicosilada de manera diferent que la isoforma expressada en els híbrids no transformats (Bramwell i col., 1990). Aquestes diferències en la glicosilació provoquen canvis en la K_m , disminuint-la. Això es postula que podria ser important a nivell dels tumors sòlids, on la irrigació sanguínea és probra i la concentració de glucosa baixa (White i McCubrey, 1995). Per últim, altres estudis han demostrat que el TGF- β 1 canviaria el patró d'N-glicosilació de GLUT-1 en fibroblasts 3T3, passant d'una forma de 55 kDa a les cèl.lules no tractades a una forma de 65 kDa a les cèl.lules tractades amb TGF- β 1 (Masumi i col., 1994). Aquest increment en la glicosilació es correspon amb un increment en la V_{max} i amb una disminució en la K_m per al transport, sense cap canvi en la distribució subcel.lular de la proteïna (Masumi i col., 1994).

4.3. REGULACIO PER LA HIPERGLUCEMIA

La disminució de la utilització de glucosa pels teixits és un dels principals efectes observats en la diabetis. Diferents aproximacions experimentals indiquen que, a més de la resistència a la insulina que hi ha en aquests teixits, la mateixa hiperglucèmia participaria provocant i/o mantenint un baix consum de glucosa (Sasson i col., 1993; Dimitrakoudis i col., 1992). El fenomen seria similar a l'observat en el cas de la disminució del número de receptors per a una hormona en presència d'altres concentracions de l'hormona. Així, altes concentracions de glucosa en el medi provocarien una disminució en el transport de glucosa, mentre que una baixa concentració del sucre donaria lloc a un increment en el transport. Aquest efecte de la concentració de glucosa sobre el seu propi transport s'ha observat en diferents models cel.lulars en cultiu, com per exemple mioblasts (Koivisto i col., 1991; Walker i col., 1989 i 1990; Mayor i col., 1992), en adipòcits 3T3-L1 (Reed i col., 1990; Kitzman i col., 1993), en cèl.lules de la glia (Walker i col., 1988), en fibroblasts (Yamada i col., 1983), en cèl.lules de ronyó (Haspel i col., 1991), i també en múscul esquelètic (Dimitrakoudis i col., 1992a i b). L'efecte de la glucosa és molt més marcat sobre GLUT-1 que sobre GLUT-4 (Tordjman i col., 1990; Koivisto i

col., 1991). Tot això ha portat a parlar de GLUT-1 com d'una GRP, una "glucose-regulated protein" (Wertheimer i col., 1991). Les GRPs es van identificar inicialment com a proteïnes específicament sintetitzades en resposta a la deprivació de glucosa (Lee, 1987). Posteriorment es va descobrir que el tractament amb agents que bloquejaven la glicosilació, que eliminaven els diposits de calci, o que en general, afectaven al plegament de les proteïnes, també augmentaven la producció de GRPs (Lee, 1987). Diferents tractaments que provoquen la inducció de GRPs indueixen també la producció de GLUT-1 (Wertheimer i col., 1991), el que ha fet proposar als autors que podrien existir zones en els promotors de totes aquestes proteïnes que les fessin respondre de manera similar en situacions d'estrès (Sasson i col., 1993).

Quin és el mecanisme que utilitza la glucosa (o la seva absència) per a modificar el transport sembla dependre del model cel·lular. Així, s'ha descrit que l'absència de glucosa provoca un increment en l'mRNA per a GLUT-1 en mioblasts (Walker i col., 1989 i 1990), en cèl·lules de la glia (Walker i col., 1988) i en adipòcits 3T3-L1 (Reed i col., 1990; Tordjman i col., 1990). Aquest increment de l'mRNA tant es pot donar per un increment en la transcripció (Walker i col., 1990), com per un increment en la vida mitjana de l'mRNA (Maher i Harrison, 1990; Maher i col., 1991). A més, també pot modificar la degradació de la proteïna (Ortiz i col., 1992) o el turnover en general (Haspel i col., 1986) en el cas de fibroblasts, sense que sembli canviar la quantitat d'mRNA o la velocitat de síntesi de la proteïna (Haspel i col., 1986). Per un altre costat, la concentració de glucosa modifica la quantitat de transportadors GLUT-1 presents en la membrana plasmàtica en adipòcits 3T3-L1 (Tordjman i col., 1990), a mioblasts (Walker i col., 1990; Grco-Perotto i col., 1992) i a cèl·lules de ronyó (Haspel i col., 1991). Tots aquests resultats es compliquen quan es té en compte que la hipoglucèmia provoca l'aparició de formes estranyes de GLUT-1, de pes molecular inferior a l'observat en la cèl·lula normal, i que resultarien de la glicosilació anormal provocada per la manca de glucosa en el medi (Haspel i col., 1986; Haspel i col., 1991; Kitzman i col., 1993).

El mecanisme pel qual la concentració de glucosa modificaria tant els nivells com l'activitat de GLUT-1 encara són desconeguts. S'admet que probablement estaria implicada una molècula producte de la metabolització de la glucosa, però la seva naturalesa encara és desconeguda. Alguns autors impliquen a la glucosamina en la resposta a la hiperglucèmia, al menys regulant la baixada en la resposta a la insulina incrementant el transport de glucosa provocada per altes concentracions de glucosa (Marshall i col., 1991; Robinson i col., 1993). Altres autors, basant-se en la substitució de la glucosa per anàlegs

no metabolitzables (com la 3-O-metilglucosa), o parcialment metabolitzables (com la 2-deoxi-glucosa), intenten estudiar fins a quin punt seria un efecte directe de la glucosa o d'algun pas posterior en la metabolització, però els resultats no són clars (Haspel i col., 1986; Koivisto i col., 1991; Maher i Harrison, 1990). Podria ser que la molècula senyal fos dependent del tipus cel·lular, o que els diferents efectes (efecte sobre l'acumulació d'mRNA, efecte sobre l'acumulació de formes diferentment glicosilades del transportador, activitat intrínseca, etc) depenguessin de diferents senyals (Haspel i col., 1986; Maher i Harrison, 1990). Cal destacar que el mecanisme podria ser el mateix que provoca un increment, tant en la síntesi com en la translocació cap a la membrana plasmàtica, de GLUT-1 en resposta a la hipòxia (Bashan i col., 1992) o a inhibidors de la cadena respiratòria (Bashan i col., 1993), tractaments tots ells que es caracteritzen per una disminució en els nivells d'ATP. Si podria estar implicat el mecanisme d'inhibició del transport dependent de l'ATP (veure l'apartat 4.1.1.2.4) o no encara no s'ha estudiat.

4.4. REGULACIO PER LA INSULINA

Generalment GLUT-1 es considera un transportador constitutiu i poc regulat hormonalment, idea equivocada com hem estat veient al llarg de tot aquest capítol. Aquesta idea està causada, probablement, pels efectes que té la insulina a curt termini sobre GLUT-1. En primer lloc, la insulina té pocs efectes sobre GLUT-1 en els teixits sensibles a la insulina (múscul esquelètic, cor i teixit adipós), on la major part de l'efecte és degut a la translocació de GLUT-4. Com ja hem dit, GLUT-1 sí es transloca en l'adipòcit i en els cardiomiòcits, encara que en un grau molt menys important del que ho fa GLUT-4 (Harrison i col., 1990; Zorzano i col., 1989; Holman i col., 1990; Muñoz, 1995), però sembla que no ho fa en el múscul esquelètic (Douen i col., 1990). En segon lloc, la insulina no té cap efecte o molt poc important estimulant el transport a la "blood-brain barrier" (Namba i col., 1987) o en la placenta (Challier i col., 1986), teixits on GLUT-1 és la isoforma predominant i malgrat que sí expressen receptors funcionals per a l'hormona. L'excepció és la glàndula mamària. La glàndula mamària de rates alletants conté majoritàriament cèl·lules epitelials, cèl·lules en les que està absent GLUT-4, de manera que en aquest moment del cicle reproductiu la isoforma majoritària d'aquest teixit és GLUT-1 (Burnol i col., 1990; Camps i col., 1994). En aquestes condicions, la glàndula mamària de rates alletants en dejuni o en estat postabsortiu responen de manera ràpida a la insulina incrementant el transport

de glucosa (Threadgold i Kuhn, 1984; Burnol i col., 1987). El mecanisme pel qual la insulina faria el seu efecte estimulant la translocació de GLUT-1 o incrementant la seva activitat intrínseca) encara és desconegut.

A llarg termini la insulina estimula la síntesi de GLUT-1 en la majoria de models cel·lulars estudiats: mioblasts (Walker i col., 1989; Koivisto i col., 1991), adipòcits 3T3-L1 (Reed i col., 1990; Sargeant i Paquet, 1993) i fibroblasts (Todaka i col., 1994). L'efecte de l'hormona tant pot ser estimulant el gen (Todaka i col., 1994) o estabilitzant l'mRNA (Maher i Harrison, 1990). S'ha descrit que la zona del promotor del gen de GLUT-1 que respondria a la insulina es trobaria en els enhancers 1 i 2, sense cap efecte sobre el promotor basal (Todaka i col., 1994). Els mateixos autors identifiquen un element de resposta a insulina idèntic a l'SRE ("serum response element") dins de l'enhancer 1.

4.5. REGULACIO PER LA TRANSFORMACIO CEL·LULAR

La transformació cel·lular es caracteritza per una reducció en els requeriments de sèrum per a proliferació, pèrdua de la inhibició del creixement per contacte intercel·lular, capacitat de provocar aparició de tumors en animals i un increment en el transport de glucosa (White i McCubrey, 1995). La glucosa que entra es metabolitzarà cap a lactat malgrat la presència d'oxigen, el que s'anomena glucòlisi anaeròbica (Ismail-Beigi, 1993; White i McCubrey, 1995) i que és característica de les cèl·lules transformades.

S'ha demostrat que la transformació cel·lular incrementa el transport de glucosa pujant els nivells de proteïna tant de GLUT-1 com de GLUT-3, i que el mecanisme pel que ho fa depèn del tipus cel·lular (White i McCubrey, 1995). Així, en fibroblasts de rata (White i Weber, 1988; Flier i col., 1987) i en cèl·lules hematopoiètiques (White i McCubrey, 1995), la transformació condueix a un increment en l'mRNA per a GLUT-1, pujada que és deguda a un increment en la transcripció del gen (Birnbaum i col., 1987; White i McCubrey, 1995). Pel contrari, en fibroblasts de pollastre la transformació no dona lloc a cap increment en l'mRNA per a GLUT-1, però sí a majors nivells de la proteïna degut a una disminució de seva degradació (Shawver i col., 1988). Però aquests fibroblasts de pollastre sí incrementen l'mRNA de GLUT-3 (White i col., 1991). A més de tots aquests mecanismes a nivell d'incrementar els nivells de la proteïna, la transformació pot afectar també a la glicosilació,

incrementant en aquest cas també l'afinitat del transportador per la glucosa (White i McCubrey, 1995).

No està clar quin és el requeriment que fa que el transport de glucosa en una cèl.lula transformada puji, si els majors requeriments d'energia i de metabolits, o una desregulació dels factors que normalment controlen els nivells dels transportadors de glucosa. Cèl.lules en fase proliferativa, per exemple, després de l'addició de sèrum o d'un mitogen (PDGF, etc), tenen un major transport de glucosa basal, degut bàsicament a una major quantitat de GLUT-1 (Hiraki i col., 1988). Aquest increment es dona ràpidament després de l'addició de sèrum, fins i tot als 30 minuts (més ràpid que myc i igual que fos), i es deu a un increment en la quantitat d'mRNA (Hiraki i col., 1988). Així, l'efecte de la transformació podria senzillament incrementar aquesta resposta davant de mitògens.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Com hem vist, GLUT1, el responsable del transport basal de glucosa, està regulat per un ampli ventall de factors, entre ells diferents hormones i factors de creixement, el sèrum, els nivells de glucosa, o per situacions com el desenvolupament i la transformació cel·lular. El nostre grup de recerca ha estat interessat en els darrers anys en estudiar la regulació de diferents transportadors de glucosa en l'animal "in vivo" per diferents situacions. Així, s'han estudiat els efectes de la diabetis i el dejuni en l'expressió de GLUT4, el perfil d'expressió de GLUT1 a la glàndula mamària al llarg de la lactància, la regulació de GLUT1 i GLUT4 pel desenvolupament en els teixits sensibles a la insulina, l'efecte de l'hipotiroidisme congènit i la denervació muscular. L'estudi dels mecanismes implicats en aquesta regulació són difícils de realitzar en l'animal sencer. L'abordament de l'estudi de la regulació gènica només és possible, per exemple, mitjançant la utilització d'animals transgènics, tècnica de difícil accés en el nostre entorn. Donades aquestes dificultats, la utilització de cultius cel·lulars semblava la via més informativa per als estudis que ens plantejàvem.

En aquest context, l'objectiu general d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar mecanismes de regulació de l'activitat de GLUT1 en cèl·lules endotelials i musculars en cultiu.

El primer objectiu que ens vàrem plantejar va ser estudiar l'efecte de la hiperglucèmia sobre l'expressió de transportadors de glucosa en cèl·lules endotelials en cultiu. La hiperglucèmia dels pacients diabètics s'ha implicat directa o indirectament en les principals complicacions que pateixen aquestes persones, la retinopatia diabètica, la nefropatia diabètica i l'increment de complicacions cardiovasculars. La raó cal buscar-la en els efectes que tenen les altes concentracions de glucosa en la cèl·lules endotelial, que li provoca una menor capacitat d'entrar en cicle cel·lular, i un increment en la secreció de llàmina basal. Per un altre costat, un dels principals efectes de la hiperglucèmia, descrits en la majoria de models cel·lulars, és la disminució en l'activitat del transportador de glucosa GLUT1, provocat per una disminució en la síntesi de transportador, una menor presència a la membrana plasmàtica, o una menor activitat intrínscica. Amb aquests antecedents, la raó d'aquest estudi era evidenciar si existia alguna relació entre els efectes de la hiperglucèmia observats en les cèl·lules endotelials, i els seus efectes sobre els transportadors de glucosa. Per tal de portar-lo a terme, en primer lloc ens vàrem plantejar buscar un model de cèl·lula

endotelial en cultiu, a continuació, caracteritzar-lo des del punt de vista del transport i transportadors de glucosa, i a per últim, estudiar l'efecte de la hiperglucèmia.

El segon objectiu que ens vàrem plantejar va ser estudiar la regulació de GLUT1 en cèl·lules musculars. Com ja hem comentat, al llarg del desenvolupament els teixits sensibles a la insulina, i en concret, el múscul esquelètic i cardíac, modifiquen el seu patró d'expressió de transportadors de glucosa. Així, en el fetus l'únic transportador expressat és GLUT1. A llarg de l'ontogènia la quantitat d'aquest va disminuint, mentre que la de GLUT4 puja fins arribar a ser el majoritari en l'adult. En aquest mecanisme s'ha implicat la participació d'hormones tiroïdals i de factors depenents de la innervació. Donada la dificultat de continuar els estudis en l'animal "in vivo", vàrem abordar l'estudi en cèl·lules musculars en cultiu. En primer lloc, es tractava de trobar un model muscular en cultiu que reproduís el comportament descrit per a l'expressió de transportadors de glucosa en el múscul esquelètic "in vivo". En segon lloc, es va abordar la regulació del transport de glucosa en aquestes cèl·lules per part de l'enzim fosfatidilinositol 3-quinasa. I en tercer, i darrer lloc, es van estudiar els mecanismes implicats en la regulació de l'expressió gènica de GLUT1 en les cèl·lules musculars, intentant identificar els factors implicats en aquesta regulació.

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL.LULARS

La manipulació de cèl.lules s'ha realitzat sempre sota condicions d'estricta esterilitat per tal d'evitar contaminacions (bacterianes, de llevats, etc). Així, s'ha treballat sempre dins d'una campana de fluxe laminar vertical (ESI) tenint la precaució de netejar sempre les superfícies amb etanol tant abans de començar com en acabar, i amb l'ajut d'un encenador Bunsen (per a flamejar el material). Tot el material utilitzat ha de ser estèril, bé ja de fàbrica (com tot el de plàstic, pipetes, tubs, ampolles i plaques de cultiu, etc), bé esterilitzant-lo nosaltres mateixos mitjançant la utilització de l'autoclau. En el cas dels reactius, s'ha intentat sempre que ha estat possible que fossin de qualitat per a cultius cel.lulars (normalment ja estèrils), i s'han manipulat sota la campana. En el cas que no ho fossin, s'han esterilitzat autoclavant-los dins d'ampolles de vidre (cas de les solucions salines), o bé s'han filtrat a través de filtres de $0,22 \mu\text{m}$ de mida del porus (Schleicher & Schuell) en el cas de tots els medis, l'Hepes, etc.

Una altra consideració a tenir en compte ha estat que sempre hem intentat treballar amb cèl.lules no molt envellides, és a dir, cèl.lules que no tinguessin més enllà d'unes 8 divisions d'antiguitat (considerant com a primera divisió el primer tractament amb tripsina o pancreatina després de la descongelació). Mai s'han intentat congelar cèl.lules que tinguessin més enllà d'aquestes 9 divisions, ja que les cèl.lules adoptaven morfologies estranyes i, en el cas de les cèl.lules musculars, no es diferenciaven bé.

1.1. LINIES CEL.LULARS

1.1.1. Cèl.lules endotelials: línia ECV 304

Cèl.lules obtingudes per l'equip de Takahashi i col. (1990) per immortalització espontània a partir de cèl.lules endotelials de vena de cordó umbilical humana. Tenen l'avantatge de créixer ràpidament en presència de baixes concentracions de sèrum i no requereixen la presència de cap factor de creixement específic. Conserven moltes característiques de les cèl.lules endotelials originals com l'expressió del factor de Von Willebrand, la presència de cossos de Weibel-Palade, activitat ACE ("angiotensin-converting enzyme"), etc. Les que s'han utilitzat procedeixen de la ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures). Es cultivaven en medi 199 en presència d'un 10% de sèrum boví fetal.

1.1.2. Cèl.lules musculars

1.1.2.1. L6E9

La línia muscular L6E9 ens va ser proporcionada pel Doctor Bernardo Nadal-Ginard, de Harvard University (Boston, USA), el mateix que la va aïllar com un subclon de la línia L6 (Nadal-Ginard, 1978). La línia L6 va ser obtinguda per David Yaffe (Yaffe, 1968) després de tractar cultius primaris de cèl.lules de múscul esquelètic de la cuixa de nadons de rata amb el carcinogen "metilcolantrene". Això va donar lloc a una nova línia cel.lular transformada de mioblastes que es podia mantenir creixent al llarg de mesos i que, en les condicions adequades (en un medi pobre en factors de creixament), es podia diferenciar cap a miotubs multinucleats (que presenten moltes de les característiques a nivell morfològic i bioquímic dels miotubs del múscul esquelètic de l'animal).

Aquestes cèl.lules, en l'estadi de mioblastes, creixen en medi DMEM (4,5 g/l de glucosa) amb un 10% de sèrum boví fetal. Quan es volen diferenciar s'utilitza el mateix medi però amb un 3,5% de sèrum de cavall o bé un 2% de sèrum boví fetal.

1.1.3. Sol8

La línia de cèl.lules musculars Sol8 ens va ser proporcionada pel grup de Christian Pinset i Jean Pierre Changeux de l'Institut Pasteur de Paris. Aquesta línia va ser obtinguda pel mateix grup de treball a l'any 1988 (Mulle i col., 1988), a partir de cultius primaris de cèl.lules satèlits de múscul "soleus" de ratolins C3H de quatre setmanes d'edat. Les cèl.lules es van "clonar" mitjançant dilució en plaques "multiwell" de 24 pous. Un d'aquests clons de mioblastes és el que es va anomenar Sol8, en el qual les característiques de creixement i de diferenciació no es van modificar al llarg de 12 mesos en cultiu. A l'igual qu les L6E9, aquestes cèl.lules es poden diferenciar en les condicions de medi adequades cap a miotubs multinucleats que fins i tot es poden contraure. En el cas de les Sol8 les condicions de medi de creixament és DMEM en presència també d'un 10% de sèrum boví fetal, però les condicions de diferenciació són en medi DMEM amb un 5% de sèrum de cavall inactivat.

1.2. MEDIS DE CULTIU, SOLUCIONS I REACTIUS

1. Medi 199 (BioWhittaker) amb 1 g/l de glucosa.

2. Medi DMEM (BioWhittaker), amb 4,5 g/l de glucosa.
3. Glutamina (BioWhittaker) 200 mM.
4. Penicilina/estreptomicina (BioWhittaker) 10.000 U/ml:10.000 mg/ml.
5. Hepes 1,25 M pH 7,4, filtrat per 0,22 i guardat a 4°C.
6. Tripsina-EDTA (Boehringer Mannheim).
7. Versene: EDTA 20% pH 8, filtrat per 0,22 i guardat a -20°C.
8. PBS-Versene: Versene diluït 1/1000 en PBS.
9. Pancreatina (Gibco). Es dilueix en PBS-Versene.
10. Sèrum boví fetal (BioWhittaker): prèviament a la seva utilització s'inactivava escalfant-lo a 55°C al llarg de 30 minuts. A continuació s'aliqota en tubs de 50 ml i es guarda a -20°C.

11. Sèrum de cavall (Gibco). Si s'ha d'inactivar es fa exactament igual que amb el sèrum boví fetal.

Preparacions de medis

- Medi bàsic: preparat per nosaltres mateixos afegint en aigua bidestil.lada:

- * Vitamines (Serva).
- * Aminoàcids no essencials (BioWhittaker).
- * Aminoàcids essencials (Sigma).
- * Penicil.lina 100 U/ml : estreptomicina 100 mg/ml.
- * Bicarbonat de pH 7,4, 0,075% final.
- * Glutamina 2 mM.
- * Piruvat 1 mM.
- * Hepes 25 mM.
- * Glucosa (en la molaritat desitjada).

Es portava a pH 7,4, es filtrava per 0,22 i es guardava a 4°C.

- Medi de creixement o de diferenciació complet: al medi comercial DMEM o 199 se li afegia:

- * Penicil.lina 100 U/ml / estreptomicina 100 mg/ml.
- * Glutamina 2 mM.
- * Sèrum.
- * Hepes 25 mM.

Es guardava a 4°C fins un màxim de 4 setmanes.

1.3. TECNIQUES GENERALS

1.3.1. DIVISIO O "SPLIT"

La divisió o "split" consisteix en la separació de les cèl.lules de la superfície on estan creixent gràcies a la utilització d'una proteasa (tripsina o pancreatina), i la seva sembra (és a dir, col.locar-les sobre una superfície adequada per tal que s'hi fixin i puguin dividir-se) en un nombre més petit. El seu objectiu és en primer lloc, obtenir prou cèl.lules i en el tipus de flascó o placa de cultiu adequats per tal de realitzar els experiments previstos, i en segon lloc, mantenir les cèl.lules en òptimes condicions de creixement (si es deixen arribar a confluència i s'hi mantenen, les cèl.lules poden perdre la capacitat de créixer). Així, sempre s'han dividit cèl.lules en una confluència no superior al 70% (70% d'ocupació de la superfície de la placa) per tal d'assegurar-nos que es trobessin en fase de creixement.

Protocol

1. Es treu el medi de cultiu i es renta dues vegades amb PBS-Versene (al portar EDTA i quelar els ions calci del medi ajuda al desenganxament de les cèl.lules de la matriu extracel.lular).

2. S'afegeix un volum adequat de la proteasa, tripsina (per a les cèl.lules ECV) o pancreatina (cas de les cèl.lules musculars) per tal que tota la superfície quedi ben coberta pel líquid. En aquest moment ja s'ha d'observar l'eixecament de les cèl.lules de la superfície, efecte que es pot afavorir picant suaument la placa o ampolla amb les mans. L'eixecament total de les cèl.lules es controla amb la lupa.

3. Una vegada desenganxades totes les cèl.lules de la placa o flascó, immediàtament s'afegeix cinc vegades el volum de proteasa de medi complert amb un 10% de sèrum, component que conté inhibidors de proteases que aturen l'acció d'aquestes. És molt important que el temps que passen les cèl.lules en presència de la proteasa activa sigui mínim, ja que deixar-les massa temps en la seva presència pot malmetre moltes de les proteïnes de la superfície cel.lular afavorint un canvi en el seu fenotip.

4. Es recull tot el volum de líquid que conté les cèl.lules i es col.loca dins d'un tub que es centrifuga a unes 500 g al llarg de 5 minuts a 4°C.

5. Es treu el sobrenadant i es resuspèn el precipitat amb cura en el volum que desitgem de medi complert (en funció del número de cèl.lules, de les plaques a sembrar, etc). A continuació, s'agafa una mostra i es compten el número de cèl.lules que tenim amb l'ajut d'una càmera de Neubauer. Per últim, es sembren el número de cèl.lules que desitjem per placa o flascó.

1.3.2. CONGELACIO I DESCONGELACIO

1.3.2.1 Protocol de congelació

1. Tripsinitzar o pancreatinitzar les cèl.lules com s'ha descrit a l'apartat 1.3.1. Una vegada aturada l'acció de la proteasa afegint medi complert, comptar el número de cèl.lules que tenim.

2. Centrifugar-les 5 minuts a 500 g a 4°C.

3. Es treu el sobrenadant i es resuspenen en una densitat de 1-2 milions de cèl.lules per mililitre d'una solució del 10% de DMSO (Sigma) en sèrum boví fetal (també es pot fer en medi complert 10% de sèrum boví fetal però sense antibiòtics).

4. Col.locar-les en tubs de crioprotecció (Nunc) i rotular bé el tub, indicant el número de passes abans de congelar-les, la data, etc. Congelar-les deixant-les en primer lloc una nit a -80°C. A l'endemà ja es poden col.locar en nitrogen líquid.

1.3.2.2. Protocol de descongelació

1. Col·locar el tub de crioprotecció a 37°C per tal de descongelar-les ràpidament.

2. Una vegada descongelades, afegir el volum de cèl·lules a una placa o flascó amb unes 10 vegades el volum de cèl·lules de medi complet.

3. A les 3-4 hores canviar el medi.

1.3.3. DIFERENCIACIO

1. Una vegada les cèl·lules assoleixen un 70-80% de confluència, es treu el medi de la placa i es renta dues vegades amb PBS.

2. S'afegeix medi de diferenciació:

- medi complet amb un 2% de sèrum de cavall per a les L6E9.
- medi complet amb un 5% de sèrum de cavall per a les Sol8.

2. VALORACIO DE LA CONCENTRACIO DE PROTEINES.

Hem emprat el mètode de Bradford (Bradford, 1976), basat en el canvi de color del blau brillant de Comassie quan es lliga a proteïnes, passant el màxim d'absorbància d'aquest cromòfor de 465 nm (sense proteïnes) a 595 nm (quan està lligat).

2.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

- Solució comercial "BioRad Protein Assay" de la casa BioRad (Blau brillant de Comassie, àcid fosfòric i metanol), conservat a 4°C.

- Solució de gamma-globulina bovina 0,1% en tampó fosfat pH 7,4, conservada a -20°C.

2.2. PROTOCOL.

1. Es dilueix la quantitat necessària de reactiu "Bio-Rad" 1:5 en aigua bidestil.lada i es filtra.

2. Es dilueixen les mostres a valorar en tampó Hepes 30 mM (pH 7,4) o en aigua.

3. Directament en cubetes d'espectrofotòmetre d'un sol ús, es prepara per duplicat la patró (a partir de la solució de gamma-globulina), normalment entre 0 i 20 μg per cubeta. En paral.lel, es dipositen en altres cubetes les mostres a valorar.

4. S'afegeixen a cada cubeta 1,3 ml del reactiu de Bio-Rad ja diluit. S'agiten per inversió i deixen reposar al llarg de 5-10 minuts. Passat aquest temps es fa la lectura de l'absorvència a 595 nm.

3. TRANSPORT DE DOG O 3-O-MeGLUCOSA.

3.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Tampó de transport, pH 7,4:

- NaCl 137 mM.
- KCl 4,7 mM.
- MgSO_4 1,2 mM.
- KH_2PO_4 1,2 mM.
- CaCl_2 2,5 mM.
- Hepes 20 mM.
- Piruvat 2 mM.

El tampó es manté a 37°C.

2. Solució radioactiva preparada en tampó de transport:

- 2-Deoxiglucosa (DOG) o 3-O-Metilglucosa 100 μM .
- (^3H)-DOG o (^3H)-3-O-Metilglucosa, 1 $\mu\text{Ci/ml}$.

3. Solució d'aturada: PBS amb 50 mM glucosa i mantingut a 4°C.

4. Solució de NaOH 0,1 N i SDS 0,1%.

3.2. PROTOCOL.

1. Es treu el medi de les cèl.lules i es neteja dues vegades amb tampó de transport.

2. S'afegeix 1 ml de la barreja radioactiva i es deixa a temperatura ambient al llarg del temps de captació o transport.

3. Per parar la captació o el transport s'afegeixen 2 ml de la solució d'aturada. Immediatament es treu aquesta barreja i es fan dos rentats més amb el PBS fred 50 mM glucosa.

4. S'afegeix 1 ml de la solució de NaOH 0,1 N i SDS 0,1% i s'agita bé amb la punta de la pipeta. Per comptar s'agafen 200 μ l i es col.loquen a un vial de cintil.lació amb 5 ml de líquid de cintil.lació. A més, es compten sempre 30 μ l de la barreja radioactiva per tal de conèixer exactament l'activitat específica. Per un altre costat, es mesuren les proteïnes per tal de poder corregir l'activitat de transport (per si existissin diferències en la quantitat de cèl.lules entre els diferents pous). S'utilitza el mètode de Bradford, tenint cura d'afegir a la patró el mateix volum de NaOH 0,1 N i SDS 0,1% que afegim de mostra.

4. RELACIO DOG FOSFORILADA/NO FOSFORILADA.

El mètode utilitzat per tal de valorar la relació DOG fosforilada/ DOG no fosforilada (com a estima de l'activitat hexoquinasa) es basa en la utilització d'una cromatografia d'intercanvi iònic. Al fer passar la mostra a través d'una fase estacionària formada per una resina amb grups funcionals carregats positivament, només quedaran retingudes les molècules carregades negativament (en el nostre cas la DOG fosforilada), mentre que no ho faran les molècules sense càrrega (la DOG). Afegint a continuació una gran quantitat de grups carregats (per exemple, HCl) podrem desplaçar la DOG fosforilada unida i fer que també surti de la columna.

4.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Tampó de transport: el mateix que l'utilitzat en els experiments de transport ja descrits a l'apartat 3.

2. Solució radioactiva, preparada en tampó de transport:

- DOG 100 μ M.
- (³H)-DOG, 2 μ Ci/ml.

3. Solució d'aturada: PBS amb 50 mM glucosa conservat a 37°C.

4. Acid perclòric 6%.

5. Solució de trietanolamina 0,5 M i KOH 2 M.

6. Indicador universal (Merck).

7. Resina AG-1-X8 Formate (BioRad). Abans d'utilitzar-se s'afegeix aigua bidestil.lada i es guarda a 4°C.

8. HCl 2 M.

4.2. PROTOCOL.

1. Es treu el medi i es renta dues vegades amb 2 ml de tampó de transport. A continuació s'afegeix 1 ml de barreja radioactiva i s'incuba al llarg de deu minuts. S'atura la captació amb 2 ml de la solució d'aturada, es treu aquesta barreja i es renta dues vegades més amb PBS fred més glucosa.

2. S'arranquen les cèl.lules de la superfície en 2 ml d'àcid perclòric 6% i es col.loquen a un tub de 10 ml.

3. S'homogenitza la barreja mitjançant la utilització d'un "polytron" al llarg de 30 segons a velocitat 5.

4. Es centrifuga 15 minuts a 5.500 g i es recull el sobrenedant.

5. S'addicionen 25 μ l d'indicador universal, s'agita i es va afegint trietanolamina-KOH fins que el color indiqui que s'ha arribat a pH 7. Apuntem el volum afegit.

6. Es centrifuga de nou 15 minuts a 5.500 g. El sobrenedant que s'obté és la mostra que utilitzarem per a realitzar la cromatografia d'intercanvi iònic. Una alíquota del sobrenedant es comptarà per a veure quantes dpm totals estem carregant (la suma de DOG i DOG fosforilada)

7. Immediatament abans de carregar la mostra es prepara la columna amb la resina. Per això, s'utilitzen xeringues de 2 ml a les que s'ha obturat l'orifici inferior amb fibra de vidre. A continuació s'afegeix barreja de resina amb aigua fins que les boletes de resina ocupin un volum d'empaquetament de 0,5 ml. És molt important impedir sempre que la resina quedi seca de líquid. Es carrega la mostra (en el nostre cas 1 ml del sobrenedant) i es van recullint fraccions de 0,5 ml directament sobre vials de cintil·lació. Immediatament després que la mostra s'ha introduït dins la resina s'afegeixen 2 ml d'aigua, que també es recullen. Aquestes primeres 6 fraccions de 0,5 ml són les que contenen la DOG no fosforilada.

8. A continuació, s'afegeixen 3 ml de HCl 2 M que també recullim en fraccions de 0,5 ml directament en vials de cintil·lació i que contindran tota la DOG fosforilada que s'ha lligat a la columna. Els vials es compten i es sumen les dpm obtingudes en les sis diferents fraccions de DOG fosforilada o de DOG no fosforilada i es calcula la relació entre una i altra.

5. VALORACIO DE LA CONCENTRACIO DE GLUCOSA

Per a determinar com evoluciona al llarg del temps la concentració de glucosa en el medi on creixien les cèl·lules, s'ha utilitzat un mètode basat en l'oxidació de la glucosa a gluconat en presència de glucosa oxidasa (GOD). El H_2O_2 que es forma s'utilitza en una segona reacció en la qual, en presència de peroxidasa (POD) i fenol, la 4-aminofenazona dona lloc a la formació de 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona. Aquest compost és de coloració rosada i presenta un màxim d'absorbància a 510 nm (Trinder, 1969). Els reactius d'aquest sistema venen comercialitzats en forma de "kit" (Boehringer).

Abans de valorar la concentració de glucosa hem de tenir la precaució de desproteïnitzar i neutralitzar les mostres.

5.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Solució per a la valoració de glucosa ("kit" de Boehringer)

- vial 1: enzims (GOD i POD) i 4-aminofenazona en tampó fosfat.
- vial 2: fenol.

Dissolem el contingut del vial 1 en 200 ml d'aigua destil.lada i afegim el contingut del vial 2. Ho conservem a 4°C i protegit de la llum (és estable durant 4 setmanes).

2. Solució de trietanolamina 0,5 M-KOH 2 M.

3. Acid perclòric 6%.

4. Indicador universal (Merck)

5.2. PROTOCOL

5.2.1. Preparació de les mostres

1. Es recullen 50 μ l dels medis procedents dels diferents temps d'incubació en que volem valorar la concentració de glucosa i es posen dins d'un tub eppendorf.

2. Als 50 μ l de mostra s'afegeixen 250 μ l d'àcid perclòric fred i es barreja.

3. Es centrifuga a màxima velocitat (13.000 rpm) al llarg de dos minuts.

4. Es recull el sobrenedant a un nou tub i s'afegeixen 10 μ l d'indicador universal.

5. S'afegeix solució de trietanolamina-KOH fins que el pH sigui neutre. Apuntem el volum afegit.

6. Es centrifuga a 4°C tres minuts a màxima velocitat.

7. Es recull el sobrenedant que ja és preparat per a valorar la concentració de glucosa.

5.5.2. Valoració de la concentració de glucosa

1. S'afegeixen a 50 μ l de la mostra 1 ml del "kit" de Boehringer.
2. Es deixa 30 minuts a temperatura ambient.
3. En paral·lel es prepara una patró de diferents concentracions de glucosa (0, 0,25, 0,5, 1, 2 i 3 mM) a les que també s'afegeix 1 ml del "kit".
4. Es llegeix la patró i les mostres a 510 nm.

6. IMMUNOLocalització SOBRE "CUBRES".

La tècnica d'immunolocalització ens permet, en primer lloc, detectar si una determinada proteïna s'expressa en una cèl.lula. En segon lloc, i potser més important, ens permet localitzar fàcilment a quin compartiment cel.lular és expressada. Tot això s'aconsegueix mitjançant la utilització d'anticossos específics sobre cèl.lules prèviament fixades. Amb aquest objectiu, es fan créixer les cèl.lules en plaques de cultiu on abans s'han col·locat cubres de vidre de 10 mm de diàmetre (prèviament esterilitzats). La majoria de cèl.lules poden créixer bé sobre aquests "cubres" sense perdre les seves característiques morfològiques. Els "cubres" són fàcilment manipulables i permeten gastar volums mínims dels anticossos i dels altres reactius.

6.1. FIXACIÓ

6.1.1 MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS

1. Metanol 100% conservat a -20°C .
2. Azida sòdica 2%.

6.1.2. PROTOCOL

1. S'aspira el medi de cultiu i es renten les cèl.lules dues vegades amb PBS per tal d'eliminar totes les restes (algún component del medi podria reaccionar amb el nostre anticòs i provocar un increment en la unió

inespecífica).

2. S'afegeix un volum de metanol suficient per a submergir totalment els "cubres", i es deixa al llarg de 2 minuts.

3. S'el·limina el metanol, es torna a rentar amb PBS dues vegades i ja es pot procedir a realitzar la immunolocalització. Si no és així, es pot guardar la placa a 4°C amb un volum de PBS suficient per a cobrir tota la placa i que contingui un 0,02% d'azida sòdica (per tal d'evitar el creixement de bacteris), fins el dia en que es fagi la immunolocalització.

6.2. IMMUNOLOCALITZACIO

6.2.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS

1. Albúmina sèrica bovina 10%.

2. Anticòs primari contra la proteïna desitjada diluït en PBS que contingui un 0,5% d'albúmina sèrica bovina. Els anticòsos primaris utilitzats en aquest treball han estat:

- anti-Glut-1: anticòs policlonal dirigit contra l'extrem C terminal de Glut-1 de rata, comercialitzat per la casa Biogenesis. Diluïció 1/200.

- anti- β 1-integrina: anticòs policlonal dirigit contra la β 1-integrina de rata (Pujades i col., 1992), cedit pel Dr. C. Enrich Bastús, de la Universitat de Barcelona. La diluïció utilitzada ha estat 1/50.

3. Anticòs secundari marcat amb fluoresceïna o rodamina (DAKO) diluït 1/50 en PBS amb 0,5% d'albúmina.

4. Muntador-----

5. Microscopi Reichert Jung Polyvar II.

6. Pel·lícula Kodak Ektachrome 160 o Kodak Tmax 400.

7. Tenyidor nuclear Hoetch 33342.

6.2.2. PROTOCOL.

1. Es treu el "cubre" de la placa amb l'ajut d'unes pinces fines intentant evitar el rascar la superfície on es troben les cèl.lules. S'escorre sobre paper de cel.lulosa i s'afegeix l'anticòs primari sobre la cara on hi han les cèl.lules. El volum per a cada "cubre" és d'uns 30 μ l. S'incuba a una estufa al llarg d'una hora a 37°C. Com a control negatiu de l'anticòs secundari (el fons provocat per aquest), s'incuba un "cubre" amb el mateix volum però només amb PBS amb 0,5% de BSA, i es processarà exactament igual que els altres.

2. Es realitzen dos rentats submergint els "cubres" dues vegades dins d'un vas amb PBS. A continuació es col.loquen dins d'un recipient amb PBS nou amb agitació al llarg de 10 minuts.

3. S'escorre el PBS amb l'ajut de paper de cel.lulosa i s'afegeix l'anticòs secundari diluït 1/50 en PBS amb un 0,5% de BSA. Com que tots els anticòssos utilitzats eren policlonals, sempre es va utilitzar un "goat anti-rabbit" lligat bé a rodamina o bé a fluoresceïna. Es deixa aquest anticòs incubant-se al llarg de 30 minuts a 37°C.

4. Es fan dos rentats en PBS en un vas i es deixa en PBS agitant-se al llarg de 10 minuts. Normalment s'afegia també el reactiu de Hoetch, que marca només els nuclis.

5. Per últim es munta utilitzant el medi de muntatge ----. Es posa una gota del medi de muntatge al damunt d'un porta i es col.loca el "cubre" amb la cara on hi han les cèl.lules contra la gota i el porta. Amb l'ajut d'un paper de cel.lulosa s'apreta el "cubre" contra el porta de manera que quedi fixat i ja es pot passar a visualitzar.

7. AILLAMENT DE MEMBRANES CEL.LULARS TOTALS

Aquest procés ens permet obtenir mostres riques en membranes cel.lulars en forma de petites vesícules, procedents tant de la membrana plasmàtica com d'orgànuls intracel.lulars.

Es parteix d'una placa de 10 cm de diàmetre en confluència, i tot el protocol s'ha de realitzar a 4°C.

7.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS

1. Tampó d'homogenització, pH 7,4:

- Hepes 25 mM.
- EDTA 4 mM.
- PMSF 0,2 mM.
- Benzamidina 25 mM.
- Leupeptina 1 μ M.
- Pepstatina 1 μ M.
- Aprotinina 0,25 Unitats/ml.
- Sacarosa 250 mM.

2. Hepes 30 mM, pH 7,6.

7.2. PROTOCOL PER A LES CEL.LULES ENDOTELIALS

1. S'arranquen les cèl.lules en 2 ml de tampó d'homogenització. A continuació s'homogenitzen passant tot el volum unes vint vegades per una punta de pipeta d'1 ml, vint vegades més per una punta groga i vint vegades més per una xeringa d'1 ml amb agulla.

2. Es col.loca tot el volum a un tub d'ultracentrífuga que s'omple fins a dalt amb tampó d'homogenització. Es centrifuga a 200.000 g al llarg d'una hora i mitja a 4°C.

3. El precipitat es resuspèn en un volum adequat de tampó Hepes 30 mM, pH 7,6 i es guarda congelat a -20°C.

7.3. PROTOCOL PER A LES CEL.LULES MUSCULARS

Exactament igual que el procediment descrit a l'apartat anterior però després de l'homogenització i prèviament a la ultracentrifugació, es fa una centrifugació a baixa velocitat per tal d'eliminar les restes de cèl.lules no homogenitzades i els orgànuls més grans. Aquesta centrifugació és al llarg de 10 minuts a 4°C i a 500 g. El sobrenedant és el que es posa en el tub d'ultracentrífuga i es continua amb el pas 2 de l'apartat anterior.

8. SUBFRACCIONAMENT CEL.LULAR

El protocol que s'ha seguit per a realitzar el subfraccionament de les cèl.lules endotelials és una modificació del descrit per Horner i col. (1987) per a fibroblastes.

S'utilitzen 15 plaques de 10 cm de diàmetre de cèl.lules ECV 304 en confluència per a cada un dels tractaments. 24 hores abans de començar l'experiment es renten les cèl.lules amb PBS i s'afegeix medi 199 suplementat sense sèrum. Tot el procés s'ha de realitzar a 4°C.

8.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS

1. Tampó d'homogenització, pH 7,4.

- Hepes 20 mM.
- EDTA 1 mM.
- Sacarosa 270 mM.
- Aprotinina 0,25 Unitats/ml.
- PMSF 0,2 mM.
- Leupeptina 1 μ M.
- Pepstatina 1 μ M.

2. Hepes 30 mM, pH 7,6.

3. Solucions de sacarosa (Sigma S-9378) 0,086%, 27%, 38% i 48% pes/volum en Hepes 30 mM, pH 7.6.

8.2. PROTOCOL.

1. Es renta cada placa amb PBS dues vegades i a continuació s'arranquen les cèl.lules en 2 ml de tampó d'homogenització (primer fer-ho en 1 ml i acabar de netejar la placa amb un segon ml).

2. Es col.loquen els aproximadament 30 ml totals de tampó amb les cèl.lules arrancades dins d'un tub i s'homogenitzen 10 vegades a velocitat 5 amb un aparell del tipus Heidolph.

3. Es centrifuga l'homogenat a 16.000 g al llarg de 15 minuts.

4. El sobrenedant d'aquesta centrifugació es centrifuga a una ultracentrífuga a 150.000 g al llarg de 90 minuts, i el precipitats resultant es resuspèn en Hepes 30 mM amb sacarosa 0,086%, pH 7,6. Aquesta fracció reb el nom de S1.

5. El precipitats de la centrifugació a 16.000 g (P1), es resuspèn en Hepes 30 mM, pH 7,6, i es mesura la quantitat de proteïnes que conté. Aproximadament entre 8 i 11 mg de proteïnes totals es dilueixen en un volum adequat de la solució de sacarosa 48% i d'Hepes 30 mM per tal que la concentració final de sacarosa sigui d'un 10% en un volum final de 2 ml. Aquests es carreguen a la part de dalt d'un gradient discontinu de sacarosa format per 2 ml de sacarosa 48%, 3 ml de sacarosa 38% i 3 ml de sacarosa 27%.

6. Es centrifuga el gradient discontinu de sacarosa en un rotor basculant de tipus TH-641 al llarg de dues hores a 76.000 g i a 4°C.

7. Es recullen les diferents interfases amb l'ajut d'una pipeta de plàstic i es col.loquen a tubs d'ultracentrífuga. Es porten fins dalt del tub amb Hepes 30 mM pH 7,6 i es centrifuguen a 70.000 g al llarg de 25 minuts.

8. Per últim, es resuspenen els diferents precipitats en Hepes 30 mM, 0,086% sacarosa i ja es poden mesurar les proteïnes recollides en les diferents fraccions. Aquestes fraccions són: 1) interfase entre la fracció de 10% i la de 27% (o mostres de vesícules amb una densitat inferior a un 27% de sacarosa) o F1, 2) interfase entre 27% i 38% (o vesícules de densitat entre un 27% i un 38% de sacarosa) o F2, 3) interfase entre 38% i 48% o F3, i 4) el precipitat o vesícules de densitat superior al 48% o F4. Totes aquestes mostres es congelen ràpidament i es guarden a -20°C.

9. IMMUNOPRECIPITACIO

9.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS

1. Agarosa unida a una IgG contra ratolí (Sigma).

2. Immunomix (Sigma):

- Tritó-X-100 0,2%.
- SDS 0,2%.
- Desoxicolat sòdic 0,1%.
- Albúmina sèrica bovina 0,1%.
- Azida sòdica 0,2%.

Es guarda a -20°C . El dia de la seva utilització se li afegeix PMSF (0,2 mM final).

3. Mostres (en el nostre cas membranes obtingudes pels processos descrits anteriorment).

4. Anticòs contra la proteïna a immunoprecipitar. En el nostre cas es va utilitzar un anticòs monoclonal dirigit contra l'extrem C terminal de la proteïna Glut-1, anomenat B315:32 (Andersson i Lundahl, 1988), cedit pel Dr. L. Andersson de la Universitat d'Uppsala

5. LSB x3 (veure apartat de SDS-PAGE).

9.2. PROTOCOL.

El protocol emprat ha estat el posat a punt per la Puri Muñoz en el nostre laboratori basant-se en el descrit per Zorzano i col. (1989). Consta dels següents passos: l'acoblament de l'agarosa a l'anticòs contra la proteïna a immunoprecipitar, la solubilització de les mostres i la immunoprecipitació en sí.

9.2.1. Acoblament de l'agarosa a l'anticòs.

El primer pas a realitzar és la unió de l'anticòs dirigit contra la proteïna que volem precipitar amb l'agarosa. Com que en el nostre cas l'anticòs utilitzat era monoclonal, l'agarosa que es va utilitzar estava unida a una IgG contra ratolí. S'utilitzen 50 μl de l'agarosa acoplada a l'anticòs i 60 μl de la solució de l'anticòs (uns 8 μg d'IgGs) per cada mostra.

1. En primer lloc es renta dues vegades l'agarosa amb PBS (senzillament afegint el PBS, barrejant per inversió i treient el sobrenedant amb compte). A continuació, es col.loquen els 50 μl d'agarosa i els 60 μl de l'anticòs a un

eppendorf i s'agita suaument.

2. S'incuba la barreja al llarg d'una hora a 37°C amb agitació continuada.

9.2.2. Solubilització de les mostres.

Per a poder immunoprecipitar la proteïna problema hem d'haver solubilitzat les mostres de manera que les diferents proteïnes es trobin de manera aïllada.

1. Barrejar els μg de mostra que volguem solubilitzar amb 60 μl d'immunomix i portar fins a 200 μl de volum final amb PBS.

2. Agitar per inversió al llarg de 30 minuts a temperatura ambient.

9.2.3. Immunoprecipitació.

1. Fer un "speen" de la barreja de l'agarosa amb l'anticòs i el.liminar el sobrenedant.

2. Afegir 1 ml de PBS per a rentar el precipitat, agitar i centrifugar. S'elimina el sobrenedant i es calcula el volum que ocupa la resina.

3. S'afegeix a la resina la mostra ja solubilitzada (200 μl de volum) i es calcula el volum que ocupa. Si és menor a 240 μl , s'afegeix el que falta de PBS.

4. Incubar al llarg de tres hores a temperatura ambient i amb agitació continuada per inversió.

5. Centrifugar 6 segons a màxima velocitat a la microfuga, per a separar el que anomenarem precipitat i sobrenandant. Es treu el sobrenedant amb compte de no arrossegar voletes de l'agarosa, se li afegeix LSB x3 per tal que quedi x1, es bull i ja es pot carregar directament a un gel d'electroforesi per tal de visualitzar el resultat, o bé es guarda congelat fins el moment en que es fagi.

6. El precipitat es renta dues vegades amb 1 ml de PBS. A continuació,

s'afegeixen 100 μl de LSB x1, s'agita suaument i es posa a 90°C al llarg de 5 minuts amb l'objectiu de separar la proteïna de l'agarosa. Es centrifuga al llarg de 5 segons i es separa el sobrenedant del precipitat. Es torna a repetir el procés afegint 100 μl més de LSB x1 al precipitat, centrifugant i barrejant aquest nou sobrenedant amb l'altre que havíem obtingut. També ja es pot carregar al gel d'electroforesi.

10. DIGESTIO DE LES PROTEINES AMB N-GLICOSIDASA F

La digestió amb l'N-glicosidasa F permet eliminar els oligosacàrids N-lligats a les glicoproteïnes. Actua sobre l'enllaç entre l'asparagina i el primer residu de l'oligosacàrid, una N-acetilglucosamina, de la cadena de carbohidrats. La diferència entre l'N-glicosidasa F i l'endoglicosidasa F és que la segona talla l'enllaç entre el primer i segon residu de la cadena de carbohidrats.

S'ha utilitzat N-glicosidasa F subministrada per la casa Boehringer. Seguint les indicacions del fabricant, s'han desnaturalitzat les glicoproteïnes abans de procedir a la digestió. S'ha fet la desnaturalització afegint SDS fins una concentració final de l'1% i bullint. Després de desnaturalitzar, s'ha hagut d'afegir Tritó-X-100 (la concentració final de Tritó ha de ser 10 vegades superior a la del SDS) per tal que l' SDS no inactivi la glicosidasa. El tampó d'incubació de l'assaig té els components i les concentracions recomanades per Boehringer. La digestió s'ha realitzat durant 16 hores a 37°C.

10.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. SDS 10%.
2. Tampó fosfats 0,2 M, pH 7,3.
3. EDTA 200 mM, pH 8,3.
4. Barreja d'inhibidors de proteases:
 - Pepstatina A 10 μM .
 - Leupeptina 10 μM .
 - Aprotinina 10 U/ml.

5. Tritó-X-100 10%.

10.2. PROTOCOL.

1. En un tub eppendorf es col.loquen 10 μg de proteïnes de la preparació de membranes a digerir (en un volum màxim de 4,75 μl), afegim 0,25 μl de l'SDS 10% i es porta a un volum final de 5 μl amb aigua bidestil·lada.

2. Es bullen les mostres durant 1 minut.

3. S'afegeixen 25 μl de tampó fosfats 0,2 M, 12,5 μl d'EDTA 0,2 M, 2,5 μl de Tritó-X-100 10% i 5 μl de la barreja d'inhibidors de proteases. Per últim, s'afegeixen 0,2 U d'N-glicosidasa F (1 μl) i s'incuba 16 hores a 37°C.

4. S'atura la reacció afegint 25 μl d'LSB x3, es bullen les mostres durant 10 minuts i es carreguen immediatament a un gel del 10% o es congelen fins el moment de l'electroforesi.

11. ELECTROFORESI EN SDS-PAGE.

L'electroforesi en gels de poliacrilamida-bisacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE) és el sistema més utilitzat per tal de separar proteïnes en funció de la seva mida. Es basa en que les proteïnes al posar-les en presència del detergent SDS perden l'estructura terciària i es linealitzen (ja que l'SDS s'uneix als grups carregats positivament de la proteïna i la carreguen negativament però mantenint la relació càrrega/massa constant). Quan a continuació es fa córrer aquesta proteïna a través d'una malla formada per la poliacrilamida, en presència d'un camp elèctric, correrà a través del gel en funció només del seu pes molecular.

En aquest tipus d'electroforesi s'utilitzen dos tipus de gels de diferent concentració d'acrilamida: el gel concentrador i el gel separador. El primer, de concentració d'acrilamida més petita (3,3% en el nostre cas) i per tant de mida de porus més gran, té com a finalitat alinear totes les proteïnes de la mostra davant de l'inici del gel separador. El segon, de malla més espessa (7,5%, 10%, etc, en funció de la mida de les proteïnes que volguem separar), té com a funció separar les proteïnes en funció de la seva mida.

11.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Tampó d'electroforesi x10:

- Tris-Base 250 mM.
- Glicina 1,91 M.
- SDS 1%.

2. Solució d'acrilamida-bisacrilamida (30%-0,8%). Una vegada preparada, es filtrava i es guardava a 4°C protegida de la llum.

3. Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.

4. Tris-Base 1,5 M, pH 8,8.

5. Tampó de mostra x3 (LSB x3):

- Tris-HCl de pH 6,8, 0,3 M.
- Glicerol 60%.
- SDS 6%.
- Blau de bromofenol (un pessic).

Es conserva aliquidat a -20°C.

6. Gel concentrador:

- Acrilamida 3,3%.
- Bisacrilamida 0,088%.
- Tris-HCl de pH 6,8, 0,125 M.
- SDS 0,1%.
- Persulfat d'amoni 0,1%.
- TEMED 6,6 mM.

Es prepara just abans de començar l'electroforesi.

7. Gel de correguda:

- Acrilamida/bisacrilamida (de relació 30/0,8) de percentatge variable segons el pes molecular de la proteïna a estudiar.
- Tris-Base de pH 8,8, 0,375 M.

- Persulfat d'amoni 0,043 %.
- TEMED 2,2 mM.

Es pot preparar immediatament abans de començar l'electroforesi o bé deixar-lo ja polimeritzat des del dia abans a la càmera freda i en presència d'aigua a la part superior per evitar que s'assequi. Per a tots els tipus de gels s'han d'afegir o bé el TEMED o bé el persulfat d'amoni en el darrer moment ja que tots dos són catalitzadors del procés de polimerització.

8. Estàndard de pes molecular de la casa BioRad (nº de cat. 161-0317) diluït seguint les instruccions del fabricant en LSB x1.

9. Fumarasa pretenyida (Sigma) diluïda al 0,02% en LSB x1. S'utilitza només en el cas que el gel sigui utilitzat a continuació per a realitzar un immunoblot.

11.2. PROTOCOL.

1. Es netegen els vidres del sistema d'electroforesi amb etanol i es deixen assecar.

2. Es prepara el gel de correguda amb el percentatge d'acrilamida desitjat. S'aboca amb compte entre els vidres fins a l'alçada convenient i s'afegeix una mica d'aigua destil·lada fins que cobreixi la superfície del gel, i es deixa a temperatura ambient. L'aigua per un costat afavoreix la polimerització impedit l'acció inhibidora sobre aquesta de l'oxigen, i per un altre, ens permet visualitzar quan ha polimeritzat el gel.

3. Un cop polimeritzat, es treu l'aigua i s'afegeix el gel concentrador fins que es cobreixi bé la pinta que formarà els pous. Es deixa polimeritzar a temperatura ambient.

4. Un cop polimeritzat el gel concentrador, es treu la pinta amb compte de no trencar els pous, i s'afegeix tampó d'electroforesi x1 tant a la part inferior de la cubeta com a la part superior, fins aconseguir que els pous estiguin completament plens del tampó. Llavors és el moment de carregar les mostres.

5. Les mostres a carregar (preparacions de membranes, proteïnes immunoprecipitades, etc) es preparen col·locant els μg de proteïna dins d'un

ependorf i completant-lo fins al volum desitjat amb aigua destil.lada i LSB x3 (per tal que quedi en el volum final com a LSB x1), amb l'objectiu de carregar el mateix volum a tots els pous. El volum de la mostra dependrà del volum del pou. A continuació s'escalfen les mostres a 95°C al llarg de 5 minuts i ja es poden carregar. Aquest darrer pas mai es realitza amb els pesos moleculars ni amb la fumarasa pretenyida, ja que es va veure que provocava l'aparició de més bandes de les esperades. La càrrega de les mostres es realitza mitjançant la utilització d'una pipeta Hamilton.

6. Es tanca el circuit elèctric i ja es pot començar la correguda de l'electroforesi. En el cas dels sistemes de tipus HSI s'acostumen a aplicar uns 10 mA al llarg d'unes 8-12 hores, mentre que en el cas dels sistemes Miniprotean de BioRad s'apliquen 100 mA al llarg d'aproximadament 1 hora. Quan el front de la correguda (visible pel "bromofenol blue") arriba al final del vidre és el moment d'aturar-la.

7. Una vegada finalitzada la correguda, es separa el gel amb molt de compte dels vidres i ja es pot passar a realitzar la transferència en el cas del western blot (veure punt 12), o bé assecar-lo directament.

12. WESTERN BLOT.

El "western blot" consisteix en la detecció de proteïnes lligades a un suport membranós sòlid mitjançant la utilització d'anticossos específics. Les proteïnes han sofert en primer lloc una electroforesi de tipus SDS-PAGE, que les ha separat en bandes diferenciades segons la seva mida, i a continuació, s'han transferit des del gel a una membrana (de nitrocel.lulosa o de "immobilon") mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric. L'avantatge d'utilitzar una membrana respecte a fer la detecció sobre el mateix gel és la seva major accessibilitat als anticossos i la seva més fàcil manipulació. La senzillesa d'aquesta tècnica ha fet que sigui la més utilitzada actualment pels investigadors a l'hora de voler detectar la presència d'una proteïna en una mostra determinada.

L'assaig de "western blot" consta de dos passos ben diferenciats:

1) la transferència electroforètica de les proteïnes des del gel de SDS-PAGE a la membrana.

2) l'assaig d'"immunoblot" o detecció de la proteïna problema mitjançant la utilització d'anticossos.

12.1. TRANSFERENCIA.

En el nostre cas la transferència electroforètica de les proteïnes s'ha realitzat a una membrana de tipus immobilon (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) i utilitzant un sistema de transferència del tipus "TransBlot Cell" de BioRad.

12.1.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Tampó de transferència, pH 8,3:

- Tris-base 25 mM.
- Glicina 192 mM.
- Metanol 20%.

2. Tenyidor d'"immobilon":

- Metanol 50%.
- Acid acètic 10%.
- Brilliant blue 0,06%.

3. Destenyidor d'"immobilon":

- Metanol 50%.
- Acid acètic 10%.

4. Tenyidor de gels:

- Acid acètic 7,5%.
- Isopropanol 25%.
- Brilliant blue 0,05%.

5. Destenyidor de gels (Coomassie Blue):

- Acid acètic 7,5%.
- Isopropanol 7,5%.

12.1.2. PROTOCOL

1. Acabada l'electroforesi es separa el gel de correguda del gel concentrador (que es llença), es talla el front (eliminant així tot el colorant) i es submergeix en tampó de transferència. Normalment es fa una marca per saber quina és la part superior i quina la inferior tallant un trocet petit d'una punta del gel.

2. Es talla un troç de membrana d'"immobilon" de la mateixa mida que el gel i es submergeix primer en metanol, a continuació en aigua destil.lada, i per últim, en tampó de transferència. Es molt important que la membrana, una vegada mollada, no torni mai a assecar-se. En paralel, es tallen dos troços de paper Whatman 3MM de mida lleugerament superior a la del gel.

3. El muntatge de la "cassette" de transferència es fa dins d'una safata plena de tampó de transferència. S'obre la cassette i dins es col.loquen, en aquest ordre: un fregall (tipus Scotch-Brite), un rectangle de paper Whatmann 3MM, el gel de correguda, la membrana d'"immobilon" (que havíem passat prèviament pel metanol, etc, i que s'ha marcat igual que el gel amb un tallet a un extrem), un segon paper Whatmann 3MM i un segon fregall. Durant el muntatge és molt important evitar que quedin bombolles entre el gel i la membrana.

4. Una vegada acabat el "sandwich" es tanca la "cassette" i es col.loca dins de la cubeta de transferència plena de tampó de transferència. Es molt important que l'ordre sigui el correcte per tal que les proteïnes, viatjant cap al pol positiu, vagin en direcció a la membrana.

5. S'aplica un amparatge fix de 250 mA durant 3 hores i mitja en el cas de la cubeta gran i d'1 hora en el cas de la cubeta petita.

6. Passat aquest temps, es treu la "cassette" i es col.loca dins de la mateixa safata plena de tampó. Ara es desmunta el "sandwich" tenint cura que mai quedi seca la membrana i comprovant, gràcies a la fumarasa pretenyida que s'ha corregut a un dels carrils, que la transferència a la membrana ha anat bé (és així si la major part de la taca de la fumarasa es troba a la membrana i no en el gel). La part de la membrana que conté els pesos moleculars es retalla, es submergeix en tampó tenyidor d'"immobilon" al llarg d'unes hores, es destenyeix en tampó destenyidor d'"immobilon" (fins que quedin ben visibles els pesos moleculars) i s'asseca posant-la sobre paper. La part de la membrana

que conté les mostres es continua processant (apartat 12.2).

7. El gel es tenyeix submergint-lo en Coomassie Blue al llarg d'unes hores, es destenyeix amb la solució destenyidora de gels i s'asseca mitjançant un assecador de gels de la casa BioRad. La visualització de les proteïnes que romanen en el gel després de la transferència serveix per a veure l'eficiència d'aquesta i com a control de la càrrega dels diferents pous (si realment s'ha carregat la mateixa quantitat de proteïna a cada un).

12.2. IMMUNOBLOT.

Consta bàsicament de tres fases: a) blocatge de la membrana, b) incubació amb l'anticòs primari i c) incubació amb un anticòs secundari lligat a ^{125}I -proteïna A (al ser tots els anticossos utilitzats policlonals).

El blocatge de la membrana consisteix en incubar-la amb una solució de proteïna inespecífica (normalment llet descremada, però també es pot utilitzar una solució d'albumina) per tal d'evitar al màxim la unió inespecífica de l'anticòs primari o de la proteïna A a la membrana. La segona fase permet la unió de l'anticòs primari, específic per a la proteïna que volem estudiar, a la membrana. Per últim, la proteïna A lligada a ^{125}I reconeixerà l'anticòs primari (la proteïna A reconeix la part Fc dels anticossos) i s'hi lligarà. Gràcies a l'emissió radioactiva podrem visualitzar la proteïna problema.

12.2.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Solució de blocatge:

- Llet descremada Sveltesse (Molico, Nestlé) 5%.
- Azida sòdica 0,02%.

Tot dissolt en PBS. Una vegada afegida la llet, es remena bé i es centrifuga a 14.500 g durant 30 minuts a 4°C. Es descarta el precipitat i ens quedem amb el sobrenedant.

2. Solució de l'anticòs primari. L'anticòs contra la proteïna a detectar es dilueix en la proporció desitjada en la solució de blocatge diluïda a la seva vegada 1/5 amb PBS. S'han utilitzat els següents anticossos:

- **GLUT-1.** S'han utilitzat dos anticossos policlonals dirigits contra la proteïna GLUT-1: a) antisèrum Bb de conill generat contra GLUT-1 d'eritròcit humà purificat (cedit per la Dra. C. Carter-Su, de la Universitat de Michigan) diluït 1/500 i b) anticòs policlonal dirigit contra l'extrem C-terminal de GLUT-1 de cervell de rata, comercialitzat per la casa Biogenesis (Cat. n° 4670-1604) i utilitzat en una dilució 1/2500.

- **GLUT-4:** anticòs policlonal OSCRX dirigit contra l'extrem C-terminal de la proteïna de rata, diluït 1/400. Obtingut en el nostre laboratori per C. Mora (Gumà i col., 1993).

- **GLUT-3:** anticòs policlonal dirigit contra els darrers 29 aminoàcids de l'extrem C-terminal de la proteïna humana. La dilució utilitzada va ser de 1/100 (1-3 μg de proteïna per ml). Ens va ser proporcionat pel Dr. L.J. Sliker, de Lilly Res. Lab. (USA).

- **TGN-38:** anticòs policlonal 18B11 obtingut pel Dr. I. Sandoval (Yuan i col., 1987) contra la proteïna de fetge de rata. Diluït 1/250. Ens va ser proporcionat pel mateix Dr. Sandoval, de la Universidad Autónoma de Madrid.

- **β -1-integrina:** anticòs policlonal obtingut contra la proteïna de rata (Pujades i col., 1992). La dilució utilitzada ha estat de 1/100. Ens va ser proporcionat pel Dr. C. Enrich Bastús, de la Universitat de Barcelona.

- Receptor de la insulina

Els anticossos ja diluïts es guarden a -20°C i es poden reutilitzar fins que es detecti que disminueix el senyal.

3. Solució de rentat, diluït en PBS:

- Tritó-X-100 0,01 %.
- Azida sòdica 0,02 %.

4. Solució de ^{125}I -proteïna A (1 mCi/ml, 30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, d'ICN, n° cat. 6803880) en solució de bloqueig (diluïda 1/5 en PBS) de manera que quedin 10^5 cpm/ml.

12.2.2. PROTOCOL.

1. Es preincuba la membrana amb solució de blocatge al llarg d'una hora en un bany a 37°C amb agitació.

2. Es col·loca la membrana dins d'una bossa de plàstic, s'afegeix la solució de l'anticòs primari (10 ml per a una membrana d'uns 100 cm²) i es segella. S'incuba a temperatura ambient al llarg de tota la nit amb agitació.

3. Es treu la membrana i es col·loca dins d'una safata amb uns 150 ml de solució de rentat. S'incuba al llarg de 10 minuts a 37°C i amb agitació. Passat aquest temps es llença el líquid del rentat i s'afegeixen 150 ml més. Aquest procés es repeteix dues vegades (tres rentats en total).

4. Es segella la membrana dins d'una nova bossa amb uns 10 ml de la solució de ¹²⁵I-proteïna A. S'incuba durant 3-4 hores amb agitació a temperatura ambient.

5. Es treu la membrana de la solució radioactiva i es renta quatre vegades amb uns 150 ml de la solució de rentat durant 10 minuts (per rentat) a 37°C i amb agitació.

6. Es deixa assecar l'"immobilon" sobre un paper de filtre. Es recubreix amb una pel·lícula plàstica i ja es pot exposar.

13. NORMES GENERALS DE PREPARACIO I MANIPULACIO DE BACTERIS, DNA I RNA.

Totes les normes i protocols que s'especificaran al llarg de tot l'apartat de tècniques de Biologia Molecular es poden trobar més ampliades tant en el Maniatis com en el Current Protocols in Molecular Biology, llibres àmpliament utilitzats tant pel que escriu com pels que l'envoltaven en el moment de treballar en el laboratori. Es recomana la seva consulta abans de seguir qualsevol dels protocols aquí especificats.

En els processos en que es treballa amb DNA, RNA o bacteris és necessari mantenir un ambient d'esterilitat, lliure d'altres bacteris, DNAses o RNAses. Així, sempre que s'han manipulat bacteris s'ha fet al costat de la flama d'un Bunsen i totes les superfícies utilitzades s'han netejat prèviament amb etanol. En el cas del material, la utilització de l'autoclau durant 20 minuts

a 1 atmòsfera de sobre pressió ha estat el mitjà més emprat tant per a garantir esterilitat com per inactivar DNAses; tanmateix, pot no ser suficient per inactivar les RNAses. Les precaucions addicionals adoptades en treballar amb RNA s'especifiquen més endavant.

Per un altre costat, sempre s'han utilitzat reactius de qualitat per a Biologia Molecular de les diferents cases comercials, i l'aigua emprada en la preparació de les diferents solucions ha estat ultrapura (obtinguda a través del sistema MilliQ, de Millipore). En general, els reactius que s'han de mantenir en dissolució han estat dissolts, s'ha ajustat el pH i s'han esterilitzat a l'autoclau, o bé en casos especials, per filtració (fent-los passar a través de filtres de 0,22 μm de diàmetre del porus). El material de plàstic era sempre que es podia, estèril d'origen; eppendorfs, puntes de pipeta, etc, així com el material de vidre, s'esterilitzaven a l'autoclau abans de la seva utilització.

En el cas de l'obtenció i manipulació d'RNA hem tingut precaucions addicionals. Totes les manipulacions s'han realitzat utilitzant guants de cirurgia, ja que les mans de les persones són la major font potencial de contaminació per ribonucleases. El material de vidre usat s'ha escalfat a 200°C un mínim de 4 hores. Les solucions a utilitzar han estat preparades amb aigua tractada amb DEPC (veure apèndix, apartat 31), amb reactius reservats com a lliures d'RNAses (sempre manipulats amb guants i sense introduir-hi mai espàtules) i en recipients considerats lliures d'RNAses (plàstic estèril o vidre escalfat a 200°C). Per a l'electroforesi d'RNA s'ha utilitzat material reservat només per aquest.

14. PREPARACIO DE CEL.LULES COMPETENTS I TRANSFORMACIO.

Per tal d'obtenir cèl.lules bacterianes competents, és a dir, susceptibles de ser transformades per un plasmidi del nostre interès, es van utilitzar dos mètodes. El més utilitzat en aquest treball va ser el mètode A. El mètode B es va utilitzar posteriorment quan es va veure que en el cas del mètode A les cèl.lules competents mantingudes congelades perdien més ràpidament aquesta capacitat.

La soca d'E. coli utilitzada per a la preparació de cèl.lules competents ha estat XL1-Blue, desenvolupada per Stratagene.

La selecció dels bacteris transformats amb el plasmidi recombinant s'ha fet per resistència a l'ampicil.lina. Tots els plasmidis utilitzats per a transformar confereixen resistència a l'ampicil.lina gràcies a que contenen en la seva seqüència un gen de resistència a aquest antibiòtic.

14.1. METODE A.

Protocol de transformació descrit per Chung i col. (1989), en el que s'utilitza PEG, Mg^{+2} i DMSO.

14.1.1. SOLUCIONS.

1. LB: veure l'Apèndix.

2. TSS:

- PEG (pm 3350 o 8000) 10%.
- DMSO 5%.
- $MgSO_4$ o $MgCl_2$ 20-50 mM.

Tot dissolt en LB i de pH ajustat a 6,5.

3. Glucosa 2 M filtrada per 0,22.

14.1.2. PROTOCOL

1. S'inoculen 125 ml de medi LB amb les cèl.lules a transformar. S'incuba el cultiu a 37°C amb agitació al llarg de tota la nit.

2. Es dilueix el precultiu anterior 1:100 amb LB i s'incuba a 37°C amb agitació fins assolir una DO a 600 nm d'entre 0,3 i 0,4, que representa unes 5×10^7 cèl.lules/ml (per a una bona transformació és necessari que el nombre de cèl.lules no excedeixi de 10^8 cèl.lules/ml). Normalment això triga unes 2-4 hores.

3. Mantenir el cultiu en gel durant 10 minuts.

4. Centrifugar la suspensió de cèl.lules a 1000 g i a 4°C al llarg de 10

minuts.

5. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el precipitat en 1/10 del volum original de solució de TSS freda. En aquest punt, les cèl.lules són competents i es poden conservar en aquest estat congelant-les ràpidament en nitrogen líquid i guardant-les a -80°C . Si es vol continuar amb la transformació amb el plasmidi continuem amb el protocol.

6. S'afegeixen a $100\ \mu\text{l}$ de bacteris competents al voltant de $100\ \text{pg}$ del plasmidi i es barreja suaument.

7. S'incuba la barreja de bacteris i DNA a llarg de 5-60 minuts a 4°C (en gel).

8. S'afegeixen $0,9\ \text{ml}$ de TSS (al que prèviament s'ha afegit glucosa en una concentració final de $20\ \text{mM}$) i s'incuba al llarg d'una hora a 37°C amb agitació.

9. Es sembren uns $200\ \mu\text{l}$ de la barreja en una placa de LB-Amp, es deixa que el líquid s'absorbeixi, s'inverteix i s'incuba a 37°C durant 14-18 hores.

10. S'escullen diferents colònies independents, es fan cultius líquids en LB + Amp, es prepara plasmidi i es fa l'anàlisi de restricció per comprobar que efectivament han incorporat el plasmidi problema.

14.2. METODE B.

Variació del mètode de Cohen i col. (1972) que consisteix en tractar les cèl.lules amb CaCl_2 de manera que s'altera la paret cel.lular bacteriana i permet l'entrada de material genètic exogen.

14.2.1. SOLUCIONS.

1. Solució de CaCl_2 , pH 8:

- CaCl_2 $50\ \text{mM}$.
- Tris-HCl $10\ \text{mM}$.

14.2.2. PROTOCOL.

1. S'obtenen cèl.lules bacterianes en fase inicial del creixement exponencial (pasos 1 i 2 del mètode A).

2. Es manté el cultiu en gel 10 minuts.

3. Es centrifuga la suspensió cel.lular a 4000 g, a 4°C durant 5 minuts.

4. S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl.lules en la meitat del volum original de solució de CaCl₂.

5. Es manté la suspensió en gel durant 15 minuts.

6. Es centrifuga a 4000 g i 4°C al llarg de 5 minuts.

7. S'elimina el sobrenedant i es resuspenen els bacteris en 1/15 del volum original de solució freda de CaCl₂. En aquest punt les cèl.lules són competents. La màxima eficiència de transformació la tenen al llarg de les primeres 12-24 hores després del procés, però també es poden guardar congelades (en presència d'un 15% de glicerol) a -80°C. Si ja es volen transformar amb un plasmidi es continua el protocol.

8. S'afegeixen a 200 µl de bacteris competents uns 50 pg del plasmidi problema. Es barreja i es manté en gel 30 minuts.

9. S'incuben els tubs a 42°C durant 2 minuts.

10. S'afegeix 1 ml de LB i s'incuba una hora a 37°C amb agitació (per tal que es recuperin els bacteris i perquè s'expressi la resistència a l'antibiòtic codificada pel plasmidi).

11. Sembrem 200 µl a una placa de LB-Amp i s'analitzen les colònies resultants.

15. PURIFICACIO DE DNA PLASMIDIC.

Per a purificar DNA plasmídic s'han utilitzat sempre "kits" comercials, bé per a obtenir petites quantitats (al voltant d'uns 10 μg) o minipreparació, o bé per a obtenir grans quantitats (200-1000 μg de DNA) o maxipreparació.

15.1. MINIPREPARACIO.

S'ha utilitzat el "kit" "Magic MiniprepsTM DNA Purification System" de Promega. Aquest "kit" es basa en el mètode de la lisi alcalina descrit per Birnboim i Doly (1979), que comprèn en primer lloc, la lisi de les cèl.lules, seguit per la precipitació del DNA cromossòmic, les proteïnes i altres restes cèl.lulars, i per últim, per la purificació del DNA plasmídic, procés aquest per al qual s'utilitza una resina especial proporcionada per la casa comercial.

15.1.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS (TOTES CONTINGUDES EN EL "KIT").

1. Solució de resuspensió:

- Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.
- EDTA 10 mM.
- RNAsa A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2. Solució de lisi:

- NaOH 0,2 M.
- SDS 1%.

3. Solució de neutralització:

- KOH 2,55 M, pH 4,8.

4. "Magic MiniprepsTM DNA Purification Resin".

5. Solució de rentat de la columna:

- NaCl 200 mM.
- Tris-HCl 20 mM, pH 7,5.
- EDTA 5 mM.

Diluída 1:1 amb etanol.

6. TE (veure Apèndix).

15.1.2. PROTOCOL.

1. Es centrifuguen 1-3 ml de cultiu líquid (normalment crescudes en LB amb o sense antibiòtic) de la soca bacteriana portadora del plasmidi que volem purificar a 1000 g i a 4°C durant 20 minuts.

2. Es resuspenen en 200 µl de la solució de resuspensió i es transfereixen a un tub eppendorf.

3. S'afegeixen 200 µl de la solució de lisi i es barreja per inversió fins que la suspensió es torna clara.

4. S'afegeixen 200 µl de la solució de neutralització i es barreja per inversió.

5. Es centrifuga a una microfuga a 12.000 g durant 5 minuts.

6. Es transfereix el sobrenedant a un nou tub eppendorf.

7. S'afegeix 1 ml de la solució que conté la resina i es barreja per inversió.

8. Es connecta una minicolumna (proporcionada per la pròpia casa comercial) a una xeringa de 2 ml. Es decanta la barreja dins de la xeringa, s'inserta l'èmbol i es presiona suaument. El líquid es descarta.

9. Es renta la minicolumna afegint 2 ml de la solució de rentat a la xeringa i apretant l'èmbol.

10. Transferim la minicolumna a un tub eppendorf. Es centrifuga al llarg de 20 segons per tal d'eliminar les restes de solució de rentat.

11. Es transfereix la minicolumna a un nou tub eppendorf. S'apliquen 50 µl de TE prèviament escalfat a 65°C. S'espera 1 minut.

12. Es centrifuga l'eppendorf a màxima velocitat a la microfuga al llarg

de 20 segons. El líquid eluït conté el DNA, que es guarda a -20°C .

15.2. MAXIPREPARACIO

En aquest cas sempre s'ha utilitzat el "Plasmid Maxi Kit" de Qiagen, basat també en el mètode de la lisi alcalina conjuntament amb la utilització d'una resina comercial. El protocol utilitzat ha estat el recomanat per la casa comercial amb algunes variacions. S'acostumen a obtenir entre 200 i 1000 μg de DNA plasmídic.

15.2.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS (PROPORCIONADES PEL KIT)

1. Tampó de resuspensió (P1):

- Tris-HCl 50 mM.
- EDTA 10 mM, pH 8.
- RNAasa A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Es guarda a 4°C .

2. Solució de lisi (P2):

- NaOH 200 mM.
- SDS 1%.

3. Tampó de neutralització (P3):

- Acetat potàssic 3 M, pH 5,5.

Es guarda a 4°C .

4. Tampó d'equilibració de la columna (QBT), pH 7:

- NaCl 750 mM.
- MOPS 50 mM.
- Etanol 15%.

- Tritó-X-100 0,15%.

5. Tampó de neteja de la columna (QC), pH 7:

- NaCl 1 M.
- MOPS 50 mM.
- Etanol 15%.

6. Tampó d'elució, pH 8,5:

- NaCl 1,25 M.
- Tris-HCl 50 mM.
- Etanol 15%.

15.2.2. PROTOCOL

1. Es parteix d'uns 500 ml de cultiu líquid dels bacteris (normalment LB). Es centrifuguen 10 minuts a 4000 g i a 4°C per tal de precipitar els bacteris.

2. Es resuspenen bé en 10 ml de P1.

3. S'afegeixen 10 ml de P2, es barreja per inversió i es deixa a temperatura ambient al llarg de cinc minuts.

4. S'afegeixen 10 ml de P3, s'agita per inversió i es deixa al llarg de 20 minuts en gel. Cada cinc minuts és convenient tornar a agitar.

5. Es centrifuga a 21.000 g al llarg de 30 minuts a 4°C.

6. S'equilibra una columna (proporcionada pel "kit") amb 10 ml de QBT. Una vegada equilibrada, se li afegeix tot el sobrenedant de la centrifugació prèvia.

7. Rentar amb 60 ml de QC.

8. Eluïr el DNA plasmídic aplicant 15 ml del tampó QF.

9. Precipitar el DNA amb 15 ml d'isopropanol. Deixar-lo 30 minuts a -20°C.

10. Centrifugar-lo a 21.000 g al llarg de 30 minuts i a 4°C.
11. Deixar assecar el precipitat i resuspendre'l en el volum desitjat de TE.

16. DIGESTIONS DE DNA AMB ENZIMS DE RESTRICCIO.

La digestió de DNA amb enzims de restricció s'ha realitzat seguint més o menys estrictament les instruccions i utilitzant els tampons proporcionats per les cases comercials.

La quantitat d'enzim depèn de la quantitat de DNA a digerir. El recomanat és una unitat d'enzim per cada μg de DNA a digerir en una hora en condicions òptimes, però normalment s'han utilitzat concentracions més altes d'enzim, entre 5 i 10 unitats/ μg . Malgrat això, el volum de l'enzim mai ha superat el 10% del volum final de reacció, ja que els enzims acostumen a venir dissolts en un 50% de glicerol (que actua com a crioprotector), i no es recomana més d'un 5% de glicerol en el medi si volem que no s'inhibeixi l'activitat enzimàtica. Per un altre costat, el tampó i la temperatura utilitzats en la reacció sempre han estat els recomanats per la casa comercial.

17. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA.

L'electroforesi en gels d'agarosa és el mètode més utilitzat per a separar fragments de DNA. La velocitat de migració de les molècules de DNA lineal de doble cadena és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular.

Un dels factors més importants que afecta a la mobilitat dels àcids nuclèics dins d'un gel és la porositat d'aquest. Existeix una relació lineal entre el logaritme de la mobilitat electroforètica del DNA i la concentració d'agarosa del gel. S'ha escollit una concentració d'agarosa de l'1,2% ja que permet una bona resolució de fragments d'entre 0,4 i 6 kb. En el cas de voler resoldre fragments de DNA més petits s'han utilitzat concentracions d'entre el 2 i el 3% d'agarosa.

17.1. SOLUCIONS.

1. TAE (Tampó Tris-Acetat) x50:

- Tris-Base 2 M.
- Acid acètic 1 M.
- EDTA 50 mM.

Es guarda a temperatura ambient.

2. Tampó de mostra x5:

- EDTA 40 mM.
- SDS 0,1 %.
- Ficoll-400 30%.
- Blau de bromofenol 0,2%.

Es guarda aliquidat a -20°C .

3. Gel d'agarosa:

- Agarosa 1,2%.
- Bromur d'etidi $0,5 \mu\text{g/ml}$.

4. Marcador de pes molecular (DNA ladder, Gibco BRL).

17.2. PREPARACIO DEL GEL I DE LES MOSTRES.

El gel que s'ha preparat habitualment és de 50 ml, volum òptim per al sistema d'electroforesi minigels que hem utilitzat. Habitualment es tenyeix amb bromur d'etidi en el moment de preparar-lo, encara que també es pot tenyir una vegada ja ha corregut el DNA, submergint-lo en TAE x1 o en aigua amb $0,5 \mu\text{g/ml}$ de bromur d'etidi. El protocol a seguir és següent:

1. Es dipositen 0,6 g d'agarosa, 1 ml de TAE x50 i aigua estèril fins a un volum final de 50 ml dins d'un erlenmeyer. Es marca el límit del líquid amb un rotulador.

2. Fem l'agarosa dins d'un microones i es deixa temperar dins d'un bany a 60°C . Si s'ha perdut volum s'afegeix més aigua.

3. Una vegada temperat, s'afegeixen $0,5 \mu\text{g/ml}$ de bromur d'etidi a la solució d'agarosa. Es barreja bé i s'aboca dins del motlle del sistema de minigels amb la pinta ja preparada.

4. Una vegada solidificat, es retira la pinta, es col.loca dins de la cubeta d'electroforesi i es cobreix amb tampó TAE x1.

5. Les mostres es preparen afegint al DNA que volguem carregar tampó de mostra x5, i es dilueix amb aigua fins que quedi x1. Normalment el volum a carregar era de $10 \mu\text{l}$. En paral.lel es prepara i carrega exactament igual que les mostres un marcador de pes molecular.

6. Una vegada carregades les mostres i el marcador de pes molecular, es tanca el sistema i es corre el gel a un voltatge constant (d'entre 20 i 70 V).

7. Per a visualitzar el resultat de la correjada, es col.loca el gel sota l'emissió d'ultraviolats. Es recomenable reduir al mínim l'exposició del DNA a la llum ultraviolada, sobre tot si després el volem utilitzar per a treballar ja que les emissions d'alta energia provoquen que els àcids nucleics es fagin malbé.

18. PURIFICACIO DE FRAGMENTS DE DNA DELS GELS D'AGAROSA.

S'han utilitzat dos mètodes basats en dues metodologies molt diferents:

18.1. METODE A.

Basat en la utilització del "kit" de la casa Promega "Magic™PCR Preps DNA Purification of DNA Fragments", que permet la purificació de DNA de doble cadena des de gels d'agarosa de baix punt de fusió (Boehringer Cat n° 100.488). El mètode comprèn: a) pas del fragment de DNA des de l'agarosa normal fins a un troç de gel d'agarosa de baix punt de fusió; b) unió específica del DNA a la resina del "kit"; c) retenció del complexe DNA-resina dins d'una minicolumna i d) elució del DNA de la resina. El protocol consisteix en:

1. Si el gel on s'ha corregut el DNA és d'agarosa normal, retallem un troç d'agarosa immediatament davant del DNA a purificar, afegim agarosa de baix punt de fusió, esperem a que solidifiqui i conectem de nou el corrent fins que el troç de DNA entra dins de l'agarosa de baix punt de fusió. Es ara quan es retalla el fragment de DNA. Si el gel era tot d'agarosa de baix punt de fusió, només hem de retallar el trocet amb el DNA.

2. Es posa l'agarosa amb el DNA dins d'un tub eppendorf i s'incuba a un bany a 70°C fins que l'agarosa s'hagi fos completament.

3. S'afegeix 1 ml de la resina del "kit" i s'agita amb vórtex.

4. Es connecta una minicolumna, subministrada amb el "kit", a una xeringa de 2 ml i es decanta dins la barreja. S'inserta l'èmbol i es pressiona suaument.

5. Es renta la columna amb 2 ml d'isopropanol 80%.

6. Es transfereix la columna a un tub eppendorf i es centrifuga a màxima velocitat durant 20 segons per eliminar les restes de líquid.

7. Es transfereix la columna a un nou eppendorf. S'afegeixen 50 μ l de TE prèviament escalfat a 65°C i s'espera un minut.

8. Es centrifuga l'eppendorf a màxima velocitat al llarg de 20 segons. El líquid eluït conté el DNA, que es guarda a -20°C.

17.8. METODE B: ELECTROELUCIO.

1. Es retalla el troç d'agarosa (en aquest cas no cal que sigui de baix punt de fusió) que conté el DNA a purificar i es posa dins d'una bossa de diàlisi (Sigma cat. n° D9277).

2. S'afegeix TAE x0,5 de manera que hi hagi el mínim volum perquè el troç de DNA quedi ben submergit. Es tanca la bossa mitjançant pinces de diàlisi o bé amb fil.

3. Es posa la bossa ben submergida en el sistema d'electroforesi amb TAE x1 i s'apliquen 100 volts al llarg d'una hora.

- Tris-HCl 660 mM, pH 7,6.
- EDTA 10 mM.
- MgCl₂ 100 mM.
- DTT 50 mM.
- Polietilenglicol 8000 30%.
- Albúmina sèrica bovina 0,5 mg/ml.
- ATP 5 mM.

Es filtra per 0,22 i es guarda aliquotat a -20°C.

19.2. PROTOCOL

1. Barrejar els fragments de DNA, intentant que l'insert (el troç més petit) sempre estigui en una relació molar de 3 a 1 respecte el vector. La quantitat de DNA utilitzada era al voltant dels 100 ng. S'afegeix el tampó x1 corresponent en un volum final de 10 µl.

2. Incubar a 17°C entre 12 i 16 hores.

3. Transformar bacteris per veure si realment s'han lligat.

20. AILLAMENT D'RNA TOTAL DE CEL·LULES.

El protocol utilitzat és una adaptació del descrit per Chomczynski i Sacchi (1987). Aquest mètode comprèn: a) la lisi cel·lular, b) l'eliminació de les proteïnes i del DNA amb fenol àcid i agents desnaturalitzants de proteïnes com el tiocianat de guanidina (que a la vegada és un potent inhibidor de ribonucleases) i el sarcosil, i c) la precipitació de l'RNA amb isopropanol.

20.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Solució D:

- Tiocianat de guanidina 4 M.
- Citrat sòdic 25 mM, pH 7,0.
- 2-mercaptoetanol 100 mM.

4. Es canvia la polaritat i apliquem 100 volts en el sentit invers al llarg d'un minut.

5. Es treu amb compte el líquid de dins de la bossa i la rentem amb més volum de TAE x0,5, líquid que afegim al que ja hem tret.

6. S'extrau el DNA de possibles impureses amb fenol/cloroform (veure Apèndix), i es precipita amb acetat sòdic 3 M i amb etanol. Una vegada precipitat, resuspenem en el volum que volguem de TE i ja el podem quantificar.

19. LLIGACIONS.

S'han utilitzat dos protocols diferents per a lligar fragments de DNA en funció de si aquests tenien extrems cohesius o roms. L'única diferència entre els protocols era la utilització d'un tampó especial en el cas de la lligació amb fragments d'extrems roms, com a continuació s'indica En el cas dels fragments cohesius el tampó utilitzat era el proporcionat per la casa comercial amb la mateixa lligasa.

Cal indicar que al llarg del present treball es van tenir molts problemes per a obtenir bones eficiències de lligació, problemes que es van solucionar quan es va tenir cura d'exposar el mínim temps indispensable els troços de DNA a la llum ultraviolada.

19.1.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS

1. T4 DNA lligasa (Boehringer Mannheim).
2. Tampó de la lligasa (subministrat per la casa comercial) x10, pH 7,5:
 - Tris-HCl 660 mM.
 - $MgCl_2$ 50 mM.
 - DTT 10 mM.
 - ATP 10 mM.
3. Tampó per a la lligació de fragments amb extrems roms, x10:

Es prepara escalfant aigua DEPC fins que bulli. En aquest moment, s'afegeix el tiocianat i es posa a agitar fins que quedi ben dissolt. A continuació s'afegeix el citrat i es porta a pH 7,0. Aquesta solució es pot guardar a temperatura ambient fins 3 mesos. El dia de d'aïllament de l'RNA s'afegeix el 2-mercaptoetanol.

2. N-Laurylsarcosine (Sigma) 20%.
3. Acetat sòdic 2 M, pH 4.
4. Fenol àcid.
5. Cloroform.
6. Isopropanol.
7. Etanol 70%.

20.2. PROTOCOL.

1. S'arranquen les cèl.lules d'una placa de 10 cm de diàmetre en 0,585 ml de solució D utilitzant un "scraper" estèril.
2. El volum obtingut es col.loca dins d'un tub eppendorf i s'homogenitza passant la barreja vàries vegades per una punta de pipeta.
3. S'afegeixen 15 μ l d'N-laurylsarcosine (concentració final 0,5%) i s'agita amb vòrtex.
4. S'afegeixen primer 0,6 ml de fenol, s'agita amb vòrtex, i a continuació 0,12 ml de cloroform, es torna a agitar i es deixa 15 minuts en gel.
5. Es centrifuga 20 minuts a 4°C a màxima velocitat a la microfuga.
6. Es recupera la fase aquosa (superior) i se li afegeixen 0,6 ml d'isopropanol fred. S'agita amb vòrtex i es deixa mínim una hora a -20°C.
7. Es centrifuga 20 minuts a 4°C a la microfuga a màxima velocitat.
8. S'elimina el sobrenedant i es renta amb 0,5 ml d'etanol 70%

(s'afegeixen, es fa un "speen" i es treu).

9. Es resuspèn el precipitat en 0,5 ml de solució D amb l'ajut del vòrtex.

10. S'afegeixen 0,5 ml d'isopropanol fred, es barreja amb vòrtex i es posa a -20°C al llarg de mínim una hora.

11. Es centrifuga a màxima velocitat al llarg de 20 minuts a 4°C .

12. S'elimina el sobrenedant, es renta com abans amb etanol 70% i ja es pot resuspendre en un volum adequat d'aigua DEPC.

21. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA/FORMALDEHID.

El gel d'agarosa/formaldehid és un sistema d'electroforesi desnaturalitzant que permet una bona resolució de l'RNA de cadena senzilla (Lehrach i col., 1977). Les condicions aplicades en aquest treball han estat les descrites per Davis i col. (1986), que incorporen menys formaldehid que el protocol original amb bons resultats. La desnaturalització de l'RNA garanteix que la mobilitat electroforètica sigui funció del pes molecular, així com una eficient transferència en el cas de realitzar un assaig tipus Northern. Per a visualitzar l'RNA en el gel, s'ha incorporat bromur d'etidi directament a la mostra (Rosen i Villa-Komaroff, 1990).

21.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Tampó d'electroforesi x10:

- MOPS 400 mM, pH 7,0.
- Acetat sòdic 100 mM.
- EDTA 10 mM.

Es guarda a temperatura ambient i protegit de la llum.

2. Formamida desionitzada (veure Apèndix).

3. Tampó de mostra desnaturalitzant. Es prepara en tampó d'electroforesi x1:

- Formamida desionitzada 48%.
- Formaldehid 6,4% (2,1 M)
- Blau de bromofenol 0,53%.
- Glicerol 5,3%.

Es guarda congelat a -20°C .

4. Gel d'agarosa/formaldehid. Es prepara en tampó d'electroforesi x1:

- Agarosa 1,2%.
- Formaldehid 0,66 M.

Es prepara el mateix dia de la utilització.

5. Bromur d'etidi 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

21.2. PROTOCOL.

21.2.1. Preparació de les mostres.

1. En un tub eppendorf afegim la quantitat d'RNA que volem carregar (normalment, en el cas d'un Northern, es carreguen uns 30 μg). A continuació es concentra la mostra, procés que es pot fer per dos mètodes diferents: a) utilització de l'"speed-vac" fins que tot el volum s'hagi evaporat o b) la precipitació amb etanol. Per tal de precipitar el RNA s'afegeix 1/10 del volum de mostra d'acetat sòdic 3 M, pH 5,3 i 2 vegades el volum de RNA més l'acetat sòdic d'etanol absolut. Es posa a -80°C durant 30 minuts i es centrifuga al llarg de 30 minuts més. Es renta el precipitat amb etanol 70% un parell de vegades i ja tenim l'RNA concentrat.

2. S'afegeixen 19 μl del tampó de mostra desnaturalitzant i 1 μl de bromur d'etidi.

3. S'escalfen els tubs a 65°C durant 5-10 minuts per tal de desnaturalitzar l'RNA i immediàtament es deixen refredar en gel fins el moment de carregar-les.

21.2.2. Preparació del gel i electroforesi.

La concentració d'agarosa del gel que hem utilitzat s'ha escollit en funció de la mida dels RNAs que ens interessa resoldre. Els gels del 1,2% (p/v) són indicats per a tenir una bona resolució de fragments compresos entre 0,4 i 6 kb (Sambrook i col., 1989). Els gels que es descriuen a continuació tenen un volum de 150 ml, òptim per a les cubetes que s'han utilitzat.

1. Es pesen 1,8 g d'agarosa als que s'afegeixen 15 ml de tampó d'electroforesi x10 i 126,94 ml d'aigua DEPC dins d'un erlenmeyer. Marquem amb rotulador el límit del líquid.

2. Es fon l'agarosa al microones i es deixa temperar a 60°C. Si s'ha evaporat volum, s'afegeix d'aigua DEPC.

3. Sota una campana extractora de gasos s'afegeixen a l'erlenmeyer 8,07 ml de formaldehid (al 37%) a la solució d'agarosa. Es barreja i s'aboca al motlle per a fer gels on prèviament s'ha posat la pinta. Es deixa solidificar.

4. Es retira la pinta. Es col.loca el gel a la cubeta d'electroforesi i es tapa amb tampó d'electroforesi x1.

5. Es carreguen les mostres als pous. En paral·lel es fan córrer pesos moleculars (RNA ladder, BRL). Es tanca l'aparell d'electroforesi i es deixa córrer tota la nit a 20 V o al llarg de 4-5 hores a 60 V.

22. NORTHERN BLOT.

L'anàlisi de tipus "northern blot" s'utilitza per a determinar la mida i abundància relativa d'un RNA específic. La tècnica va ser descrita per Alwine i col. (1977), i consisteix bàsicament en transferir l'RNA des d'un gel d'agarosa desnaturalitzant fins a una membrana situada directament sobre el gel, on s'immobilitza. Després d'una prehibridació per tal de reduir la unió inespecífica, la membrana s'hibrida amb una sonda marcada (en el nostre cas radioactivament), es renta per tal d'eliminar la sonda lliure o dèbilment unida, i es realitza l'exposició autoradiogràfica. La sonda utilitzada sempre ha consistit en un troç de cDNA complementari al mRNA que volem detectar.

22.1. TRANSFERENCIA.

La transferència de l'RNA s'ha fet per capilaritat, i la membrana utilitzada ha estat de niló (Hybond N, Amersham). El procés consisteix en:

1. Es corren les mostres a transferir en un gel d'agarosa/formaldehid.
2. Es visualitzen col·locant el gel sobre el transil·luminador de llum ultraviolada i es fotografia (per tal de conservar les distàncies de correguda dels pesos moleculars i per assegurar la càrrega correcta i la integritat del RNA).
3. Sobre una safata que contingui uns 500 ml de SSC x10 (veure Apèndix) posem transversalment un vidre, i sobre aquest, un pont de paper Whatman 3MM prèviament amarat amb la solució de transferència, de manera que els seus extrems quedin submergits en el líquid de la safata. S'eliminen les possibles bombolles entre el pont i el vidre fent rodar per sobre una vareta de vidre.
4. Es retalla i s'elimina la zona del gel corresponent als pous. Es col·loca sobre el pont de Whatman 3MM de manera que la cara superior del gel quedi tocant el pont. Utilitzant una pipeta Pasteur, mullem el gel amb el líquid de transferència i es treuen les bombolles de la manera indicada.
5. Posem sobre el gel la membrana de Hybond N que hem retallat de la mateixa mida que el gel. La mullem i eliminem les bombolles. Abans de col·locar la membrana sobre el gel és recomanable marcar un dels extrems amb un rotulador de tipus "perma-marker" d'Staedtler, per tal d'identificar-la i conèixer l'orientació respecte al gel.
6. Es posa un paper Whatman 3MM de la mateixa mida que el gel sobre la membrana, es mulla i es treuen les bombolles. Repetim el mateix procés fins col·locar tres papers Whatman 3MM. Sobre els papers Whatman s'afegeix una pila d'uns 10 cm de papers de filtre d'una mida similar a la del gel.
7. Es posa un vidre recubrint la pila i al damunt un pes d'uns 500 g.
8. Es deixa transferir per capilaritat al llarg d'unes 24 hores.
9. Es desmunta la transferència. Es renta breument la membrana amb

SCC x2 (per tal d'eliminar les restes d'agarosa que hagin pogut quedar adherides), es deixa assecar a temperatura ambient al menys durant una hora.

10. Es col.loca la cara del filtre de niló que conté l'RNA sobre el transil.luminador i l'irradiem durant 6 minuts. Aquest procés serveix per a fixar l'RNA covalentment a la membrana (Sambrook i col., 1989).

11. Es fotografia la membrana i el gel per tal de mostrar l'eficiència de la transferència.

12. Es guarda dins d'una bossa de plàstic segellada a 4°C fins el dia de la hibridació.

22.2. HIBRIDACIO I RENTATS.

Les temperatures d'hibridació i rentat s'han fixat en funció de la T_m (temperatura de fusió) de l'híbrid i de l'astringència que s'ha volgut aplicar. Hem hibridat en condicions relaxades ($T_m - (20-25)^\circ\text{C}$) per tal d'afavorir la formació d'híbrids, i hem aplicat condicions més riguroses en el rentat. L'estimació de la T_m l'hem feta segons la fórmula citada per Wahl i col. (1987) per a híbrids DNA:RNA, tenint en compte que un 1% de bases desaparellades comporta el descens d'aproximadament 1°C en la T_m .

$$T_m = 79,8 + 18,5 \log M + 58,4 (\text{GC}) + 11,8 (\text{GC})^2 - 820/L - 0,5 (\% \text{ de formamida}).$$

on:

M= concentració molar de cations monovalents (Na^+).

GC= fracció molar de residus G i C com a expressió de la composició de bases de la sonda. Si no es coneix, s'assumeix un 0,5.

L= longitud en nucleòtids de la cadena més curta del dúplex.

Hem assumit un valor de 100 en funció de la longitud mitjana de les sondes marcades pel mètode utilitzat de "random priming".

22.2.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Solució de prehibridació:

- SSPE x5 (veure Apèndix).
- Formamida desionitzada 50%.
- Solució de Denhardt x5 (veure Apèndix).
- SDS 0,1%.
- DNA d'esperma de salmó 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (veure Apèndix).

Prèviament a afegir-lo a la barreja es desnaturalitza escalfant-lo a 100°C durant 5 minuts. Es refreda en gel i s'afegeix a la barreja de prehibridació.

2. Solució d'hibridació:

- SSPE x5 50%.
- Formamida desionitzada x5.
- Solució de Denhardt x5.
- SDS 0,1%.
- Sulfat de dextrà 10%.
- DNA d'esperma de salmó 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Sonda marcada: 2×10^6 cpm/ml (veure Apartat 23).

Tant la sonda marcada com el DNA d'esperma de salmó abans de ser afegits a la barreja s'han desnaturalitzat posant-los conjuntament a 100°C al llarg de 5 minuts. Immediatament es submergeixen en gel (per evitar la rehibridació) i s'afegeixen.

El sulfat de dextrà s'afegeix perquè s'ha descrit que incrementa la unió específica de la sonda radioactiva (Sambrook i col. 1989).

22.2.2. PROTOCOL.

1. Es posa la membrana dins d'una bossa de plàstic. S'afegeix la solució de prehibridació (uns 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de membrana) i es segella. S'incuba a 42°C durant 3-6 hores amb agitació.

2. Es treu el líquid de prehibridació i es posa el d'hibridació. Es segella vigilant que no quedin bombolles i s'incuba a 42°C durant 12-16 hores amb agitació.

3. Es treu el líquid d'hibridació i es posa la membrana en SCC x2. Es renta al llarg de 10 minuts a temperatura ambient amb agitació.

4. Es fa un segon rentat de 15 minuts amb SCC x0,4, SDS 0,1% i a 55°C. En finalitzar es fa un darrer rentat de 30 minuts també amb SCC x0,4,

SDS 0,1% i a 55°C.

5. S'elimina l'excés de líquid de la membrana (però amb compte de no deixar-la assecar, ja que si això succeix no podrem tornar-la a hibridar), es cobreix amb una pel·lícula plàstica i es procedeix a l'exposició autoradiogràfica.

21.3. DESHIBRIDACIO.

Un dels avantatges de treballar amb membranes de niló és que poden ser deshibridades i posteriorment rehibridades amb una sonda diferent, si bé en repetir aquest procés es va perdent RNA i incrementant el marcatge inespecífic. El protocol seguit és el següent:

1. S'escalfa fins a l'ebullició una solució de SSC x0,1, SDS 0,1%.
2. S'aboca dins d'una safata que ja conté la membrana, i s'incuba a 90°C amb agitació forta al llarg de 20-30 minuts.
3. Es treu l'excés de líquid de la membrana i es guarda segellada dins d'una bossa de plàstic a 4°C fins el dia de la nova hibridació.

23. MARCATGE RADIOACTIU DE DNA PER "RANDOM PRIMING".

El mètode de marcatge de DNA per "random priming" va ser descrit per Feinberg i Vogelstein (1983; 1984). Consisteix en posar el DNA a marcar, un cop desnaturalitzat, en presència d'una barreja amb totes les combinacions possibles d'hexanucleòtids. Aquests s'hibriden amb el DNA motlle, i en presència de l'enzim Klenow i de dNTPs (al menys un d'ells radioactiu), serveixen com a "primer" per a sintetitzar, a partir dels seus extrems 3'-OH, cadenes complementàries al DNA motlle. D'aquesta manera s'obtenen sondes marcades uniformement i d'alta activitat específica.

En el nostre cas hem utilitzat el "Random primed DNA labelling kit" de Boehringer (nº cat. 1004760) i hem seguit el protocol recomanat pels subministradors. El desoxiribonucleòsid trifosfat marcat que hem usat ha estat el (α - ^{32}P)-dCTP d'ICN (nº cat. 33004X). El DNA ja marcat que s'ha obtingut

s'ha lliurat dels nucleòtids no incorporats per cromatografia en columna de Sephadex G50 (NICKTM column, Pharmacia).

23.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. "Reaction mixture" (subministrada pel kit). Aquesta barreja de reacció conté els hexanuclòtids i TE.

2. dATP, dGTP i dTTP 5 mM (solucions subministrades pel kit). Es prepara una barreja equimolar que anomenem dNTP (-C).

4. Enzim "Klenow", subministrat pel kit.

5. STE (veure Apèndix).

6. DNA motlle.

23.2. PROTOCOL.

1. En un tub eppendorf es barregen:

- Uns 25 ng de DNA motlle desnaturalitzat (part o tot el cDNA per al missatger problema). Per això s'escalfa a 100°C durant 5 minuts i a continuació es manté en gel fins el moment d'iniciar la reacció.

- 2 µl de RM x10.

- 3 µl de dNTP(-C).

- 50 µCi de (α -³²P)-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml).

- 1 µl de l'enzim Klenow (2 U/µl).

S'ajusta el volum fins 20 µl amb aigua.

2. S'incuba la barreja a 37°C durant una hora.

3. S'equilibra una columna de Sephadex G50 (Nick⁵⁰ Column, Pharmacia) amb STE. En primer lloc es deixa buidar del líquid que conté i tot seguit s'afegeixen 5 ml de STE. Quan cauen les darreres gotes d'aquest, es tapa la columna fins el moment en que s'afegeixi la mostra.

4. S'afegeixen 180 µl de STE a l'eppendorf amb la reacció i es barreja.

Treiem 2 μl que es posen sobre un trocet petit de paper Whatman 3MM i la resta (uns 198 μl) es posa a la columna. Seguidament rentem el tub eppendorf amb 200 μl més de STE que també s'introdueixen a la columna. Recullim el primer eluït (uns 400 μl) dis d'un eppendorf (fracció 1).

5. Es van afegint a la columna alíquotes de 200 μl de STE que es van recollint en tubs eppendorf separats, fins un total de 6 fraccions. La sonda marcada elueix en les fraccions 2-4.

6. Es dipositen 2 μl de cada una de les fraccions a trocets de paper Whatman 3MM, es deixen assecar i, juntament amb els 2 μl de la barreja inicial, es contenen dins de vials de cintil.lació que contenen uns 5 ml de líquid de cintil.lació a un comptador de radiació β (Packard). Aquest comptatge ens permetrà conèixer el percentatge d'incorporació de l'(α - ^{32}P)-dCTP. A més, ens permetrà controlar les cpm que introduïrem en la barreja d'hibridació.

7. Es guarden les fraccions d'interés a -20°C . El dia de la seva utilització caldrà tenir en compte el decaïment de la radioactivitat.

24. SONDAS DE cDNA.

L'obtenció de sondes marcades radioactivament, necessàries per a les anàlisis de tipus northern blot realitzades en aquest treball, ha estat possible gràcies a que diferents laboratoris ens han cedit plasmidis recombinants que contenen els cDNAs d'interés.

Per tal de disposar d'una quantitat suficient dels diferents plasmidis recombinants per als succesius marcatges radioactius dels cDNAs, s'han transformat bacteris competents amb aquests plasmidis i hem fet preparacions de DNA plasmídic de la manera ja detallada. Per digestió amb enzims de restricció adequats s'han extret els inserts de cDNA, s'han purificat i, posteriorment, marcat pel mètode del "random priming".

Els plasmidis que contenen els cDNAs utilitzats han estat els següents:

- **GLUT-1 humà:** pGEM-4Z.GLUT1. Es tracta d'un plasmidi recombinant construït a partir del vector pGEM-4Z (Promega) al qual s'ha inserit en la diana de restricció Sall del polilinker un fragment del cDNA de

GLUT-1 humà (Shows i col., 1987) de 1752 pb de longitud amb linkers Sall. Nosaltres hem utilitzat com a proba motllo del marcatge un fragment de 1346 pb resultant de la digestió amb EcoRI.

- **GLUT-1 de rata:** prGT3. Plasmidi resultat d'inserir en la diana EcoRI del polinker de pBluescript un fragment de 2,6 kb de longitud del cDNA de GLUT-1 de rata (Birnbaum i col., 1986). La sonda a marcar s'obtenia tallant amb EcoRI.

- **GLUT-3 de ratolí:** pmGLUT3-1. Plasmidi producte d'inserir un fragment de 600 pb del cDNA de GLUT-3 obtingut per PCR en el lloc de clonació HincII del vector pGEM4Z. Ens va ser lliurat amablement pel Dr. G. Bell (Univ. Chicago).

- **Glut-4 de rata:** pSM 1-1-1. Plasmidi obtingut de la inserció d'un fragment de 2470 pb del cDNA de GLUT-4 de rata (Birnbaum, 1989) en la diana EcoRI de pBluescript KS+. S'utilitza com a sonda el producte de digerir amb EcoRI.

- **Glut-5 humà:** pUC13.GLUT5. Constructe obtingut d'inserir en la diana EcoRI de pUC13 un fragment EcoRI de 1886 pb del cDNA de GLUT-5 humà (Kayano i col., 1990). La sonda era el fragment lliurat amb EcoRI.

- **β -actina de rata:** pAC18.1. Plasmidi obtingut d'inserir en el polilinker de pBR322 un fragment HindIII-EcoRI de 4500 pb del DNA genòmic de la β -actina de rata (Nudel i col., 1983). Per digestió amb HindIII i EcoRI es lliura l'insert. Es recomenava digerir amb un tercer enzim que només talli el plasmidi, ja que les mides d'aquest i del nostre fragment són molt semblants. L'enzim utilitzat ha estat PstI.

- **Id de rata:** pE:Id(S). Plasmidi obtingut de subclonar un fragment de 922 pb del cDNA d'Id (Benezra i col., 1990) dins de la diana EcoRI del plasmidi pEMSV-scribe α 2 (Davis i col., 1987). Digerint amb SmaI s'allibera el fragment d'Id.

- **MyoD de ratolí:** pEMCIIs, també anomenat LTR-MyoD (Weintraub i col., 1989). Plasmidi obtingut d'inserir un fragment de 1785 pb del cDNA de MyoD (Davis i col., 1987) dins de la diana EcoRI del vector pEMSV-scribe α 2. Digerint amb EcoRI es va obtenir el fragment de 1785 pb que es va utilitzar com a sonda.

- **Miogenina de ratolí:** EMSV-Myo8. Plasmidi obtingut d'inserir dins de la diana EcoRI del vector pEMSV-scribe α 2 un fragment de 1400 pb que contenia tot el cDNA corresponent a la miogenina (Edmondson & Olson, 1989). Digerint amb EcoRI s'obtenien tres fragments, un de 3900 pb (el vector), un d'uns 1000 pb i un més petit de 500 pb. El de 1000 pb és el que es va utilitzar com a sonda per a les probes de northern blot.

- **Myf 5 humà:** obtingut de la "American Type Culture Collection". Digerint amb EcoRI s'allibera un insert de 1,2 kb del cDNA de Myf5, que és l'utilitzat per als "northern".

25. TRANSFECCIONS CEL·LULARS.

Per a la transfecció de cèl.lules L6E9 s'ha utilitzat el mètode del fosfat càlcic descrit per Wigler i col. (1979). Es basa en la introducció en les cèl.lules de DNA plasmídic dins d'un precipitat de fosfat càlcic que s'adhereix a la superfície cel.lular. Aquest precipitat es forma per la barreja lenta entre una solució de salí amb fosfat i tamponat amb Hepes (o HBS per "Hepes buffered saline") a un pH determinat (normalment 7,05), i una solució que conté clorur càlcic i el DNA. Aquest precipitat, que acostuma a ser visible com un fi núvol al voltant de les cèl.lules, és el que s'adhereix a la superfície cel.lular i és introduït dins de la cèl.lula per un mecanisme desconegut. La quantitat de DNA absorbit s'intenta incrementar mitjançant l'aplicació d'un shock de glicerol.

Es molt important el pH de l'HBS per tal d'obtenir una bona transfecció ja que d'aquest depèn la mida del precipitat que es forma. Si el precipitat és massa gran, l'eficiència de la transfecció baixa dramàticament. Es recomana sempre provar un conjunt de diferents HBSs amb pHs diferents (entre 6,9 i 7,2) transfectant les cèl.lules amb un plasmidi que contingui una activitat enzimàtica que poguem mesurar (per exemple, β -galactosidasa o β -GAL, o l'activitat cloranfenicol acetil transferasa o CAT) i fer la corba d'eficiència per als diferents HBSs. També és recomenable haver preparat un volum gran de cada un d'aquests HBSs i guardar el més eficient aliquotat i congelat a -20°C . No és bò congelar i descongelar moltes vegades una mateixa mostra d'HBS, ja que pot canviar l'eficiència.

L'eficiència de la transfecció entre una mostra i una altra pot ser diferent per problemes de caràcter metodològic, de manera que la quantitat de DNA

problema que s'haurà introduït dins de les cèl·lules serà diferent. Així, diferències en l'activitat "reporter" CAT (veure més endavant, apartat 25.1) producte dels diferents plasmidis assajats o de les diferents condicions assajades no podem saber si són degudes a diferències reals en l'activitat del nostre promotor o a diferents quantitats del plasmidi. Per tal de poder normalitzar els resultats obtinguts per l'eficiència real de la transfecció, a més del plasmidi amb l'activitat CAT s'introdueix un plasmidi que codifica per a una altra activitat enzimàtica, l'activitat β -galactosidasa. Per a totes les mostres sempre es valoren les dues activitats en paral·lel, i es corregirà l'activitat CAT per l'activitat β -GAL.

Per últim, la quantitat de DNA problema que es transfecta és entre 5 i 10 μ g. Però s'ha comprovat que l'eficiència de la transfecció puja molt si la quantitat de DNA total a transfectar és gran (al voltant dels 40 μ g) que no si és petita. Així, s'afegeix un DNA que no interfereixi amb les activitats enzimàtiques o DNA "carrier" fins arribar als 40 μ g totals. Aquest DNA pot ser DNA d'esperma de salmó o en el nostre cas, el plasmidi SK- (d'Stratagene). Tots els plasmidis que s'han utilitzat per a les transfeccions es van obtenir mitjançant el mètode de MAXIPREP de QIAGEN (veure apartat 15.2).

25.1. DESCRIPCIO DELS PLASMIDIS UTILITZATS EN LES TRANSFECCIONS.

En aquest estudi s'ha volgut estudiar l'activitat d'un fragment de 2,1 kb del promotor de GLUT-1 de rata que ens va ser proporcionat pel Dr. M. Birnbaum (Harvard Univ.). Amb aquest objectiu es va lligar aquest fragment de promotor al davant (a 5') del cDNA corresponent a una activitat enzimàtica "reporter", és a dir, que estigui absent de la cèl·lula on s'introdueix i que la seva presència sigui funció directa de l'activitat transcripcional del nostre promotor. Aquest nou plasmidi es va anomenar G1CAT. A continuació es van generar deleccions de la zona més a 5' del fragment de promotor gràcies a la utilització de diferents enzims de restricció de diana única dins d'aquesta zona. Aquest són els diferents constructes que es van provar en les transfeccions.

1. **CAT:** CAT bàsic de Promega.

2. **G1CAT:** es va generar tallant el plasmidi CAT amb XbaI (perquè quedés el polilinker a 5' del promotor), omplint amb "klenow" i tractant-lo amb fosfatasa alcalina per evitar que en la lligació es pugués relligar. El fragment

de 2106 pb del promotor de GLUT-1 més 134 pb de la zona ja transcrita però no traduïda, es va alliberar del plasmidi que el contenia mitjançant la utilització de EcoRI i XhoI i es va tractar amb "klenow". A continuació es van lligar els dos fragments utilitzant el protocol de lligació per extrems roms ja descrit. Es va comprovar que es trobessin en l'orientació correcta mitjançant la utilització de diferents combinacions d'enzims de restricció.

3. **G1CAT-HindIII**: generat tallant G1CAT amb l'enzim HindIII, que té una diana al polilinker de CAT i una altra a la posició -1672 (considerant com a 0 l'inici de transcripció, és a dir, el final del fragment de promotor estudiat seria la posició -2106) del promotor de GLUT-1 i relligant amb lligasa. La diana HindIII es regenerava.

4. **G1CAT-BstEII**: obtingut tallant el constructe G1CAT-HindIII amb els enzims HindIII i BstEII (amb diana a la posició -1203 del promotor), tractant amb "klenow" i relligant.

5. **G1CAT-BanII**: generat tallant G1CAT-HindIII amb HindIII i BanII (diana a la posició -812 del promotor), omplint i relligant.

6. **G1CAT-SmaI**: obtingut tallant G1CAT-HindIII amb HindIII i SmaI (amb diana a -201 del promotor), omplint i relligant.

7. **G1CAT-SauI**: generat d'igual manera però tallant amb SauI (posició -99).

8. **G1CAT-BssHII**: obtingut d'igual manera però amb BssHII (diana a la posició -15).

25.2. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. HBS x20:

- NaCl 2,8 M.
- Hepes 0,5 M.
- Na₂HPO₄ 15 mM.

Es dissolt en aigua destil·lada, es filtra i es guarda a -20°C.

2. HBS x2: es dissolt 1/10 l'HBS x20 en aigua destil.lada, es porta al pH desitjat (normalment 7,05) amb sosa, es filtra i es guarda a -20°C.

3. Solució de clorur de calci:

- CaCl₂ 2 M.
- Tris-HCl 100 mM.

Es porta a pH 7,2, es filtra i es guarda a -20°C.

4. Solució de glicerol:

- HBS x20 diluït 20 vegades.
- 15% glicerol

5. DNA carrier: plasmidi SK- (Stratagene).

6. DNA del plasmidi β-GAL (Promega).

7. DNA problema.

8. Tubs de 15 ml estèrils (Corning 25311-15).

9. Medi DMEM.

25.3. PROTOCOL.

1. Sembrar 750.000 cèl.lules en una placa de 10 cm de diàmetre. Als dos dies assoleixen una confluència d'entre un 40 i un 50%. Llavors es comença la transfecció.

2. Descongelar les diferents solucions que s'utilitzaran i mantenir-les a temperatura ambient. Barrejar per a cada placa a transfectar, 62 μl de la solució de CaCl₂ amb 5 μg del plasmidi βGAL, 5 μg del plasmidi problema i 30 μg del plasmidi carrier, i arribar fins a 0,5 ml amb aigua estèril.

3. Afegir gota a gota la barreja anterior a un tub de 15 ml que ja contingui 0,5 ml de l'HBS x2 agitant amb el vòrtex a baixa velocitat. Deixar-ho

reposar al llarg de 30 minuts. S'ha de veure que poc a poc la solució es va tornant d'un color més blanquinós per la formació del precipitat.

4. Treure el medi de la placa de cultiu i afegir el mililitre del precipitat ben repartit sobre les cèl.lules. Deixar-lo al llarg de 15 minuts.

5. Afegir 8 ml del medi normal a les cèl.lules. En el cas de voler obtenir miotubs en aquest mateix moment ja s'afegeix el medi de diferenciació.

6. A les 18 hores de la transfecció es treu el medi i es renta dues vegades amb medi DMEM.

7. S'afegeix 1 ml de la solució de glicerol i es deixa al llarg de tres minuts sobre les cèl.lules.

8. S'afegeixen uns 5 ml de medi DMEM, s'aspiren ràpidament i es fa un rentat addicional també amb medi.

9. S'afegeixen 8 ml del medi normal i a les 72 hores s'arranquen les cèl.lules per obtenir extractes citoplasmàtics amb el que valorar l'activitat CAT i β GAL.

26. PREPARACIO D'EXTRACTES CITOPLASMÀTICS.

Els enzims produïts pels plasmidis introduïts dins de les cèl.lules, CAT i β -GAL, tenen una localització citoplasmàtica. Així, per a poder valorar les seves activitats hem d'obtenir preparacions dels citoplasmes de les cèl.lules, el que anomenem extractes citoplasmàtics.

26.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. STE (veure Apèndix).
2. Tris-HCl 0,25 M, pH 7,5.

26.2. PROTOCOL.

1. Treure el medi de la placa i rentar les cèl.lules dues vegades amb PBS. Afegir 0,5 ml de STE, arrancar-les i col.locar-les a un tub eppendorf. Acabar de netejar la superfície amb 0,5 ml més de STE.

2. Centrifugar a màxima velocitat amb la centrífuga d'eppendorfs a 4°C al llarg de 10 minuts.

3. Treure el sobrenedant i afegir 200 µl de la solució de Tris-HCl 0,25 M. Vortexejar per a resuspendre bé el precipitat de les cèl.lules.

4. Realitzar un cicle de congelació-descongelació col.locant l'eppendorf dins de nitrogen líquid 5 minuts, a un bany a 37°C 5 minuts més i vortexejar. Repetir el cicle dues vegades més.

5. Centrifugar al llarg de 5 minuts a màxima velocitat a la microfuga a 4°C. El sobrenedant d'aquesta centrifugació és l'extracte citoplasmàtic que es congela ràpidament i es guarda a -80°C.

27. ASSAIG DE L'ACTIVITAT β-GALACTOSIDASA.

27.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Solució de magnesi:

- MgCl₂ 0,1 M.
- β-mercaptoetanol 4,5 M.

2. Tampó fosfats 0,1 M (per a preparar 100 ml):

- 41 ml de Na₂HPO₄ 0,2 M.
- 9 ml de NaH₂PO₄ 0,2 M.
- 50 ml d'aigua.

3. Solució d'ONPG (orto-nitrofenil β-D-galactopiranosid): diluir 4 mg en 1 ml del tampó fosfats.

4. Na₂CO₃ 1 M.

5. Mostres d'extractes citoplasmàtics.

27.2. PROTOCOL.

1. Per a cada punt preparar 250 μ l de barreja de reacció: 3 μ l de la solució de magnesi, 66 μ l de la solució d'ONPG i 181 μ l de tampó fosfats 0,1 M.

2. Afegir als 250 μ l de la barreja de reacció, 50 μ l de l'extracte citoplasmàtic. Incubar-lo al llarg de 3 hores a 37°C. Ha d'adoptar un color groguenc.

3. Aturar la reacció amb 0,5 ml de la solució de Na₂CO₃ 1 M.

4. Llegir a l'espectrofotòmetre a 420 nm.

Com a control negatiu s'utilitzen 250 μ l de la barreja de reacció amb 50 μ l de Tris-HCl 0,25 M. Com a control positiu de la barreja de reacció s'afegeix a 50 μ l de Tris-HCl 0,25 M 1 μ l de β -galactosidasa purificada (Boehringer Mannheim 105 031).

28. ASSAIG DE L'ACTIVITAT CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA (CAT).

El mètode utilitzat per a valorar l'activitat CAT es basa en la capacitat d'aquest enzim de transferir grups acetil des de l'acetil CoA al cloranfenicol. Per a poder visualitzar el resultat de l'assaig, el cloranfenicol que s'utilitza està marcat amb ¹⁴C. Per tal de separar el producte acetilat del que no ho està es practica una cromatografia en capa prima sobre sílica gel utilitzant com a fase mòvil una barreja de cloroform/metanol 19:1. El cloranfenicol acetilat (del que poden arribar a visualitzar-se dues espècies, l'acetilat una vegada i l'acetilat dues vegades) té una mobilitat més elevada que el cloranfenicol sense acetilar, de manera que és fàcil de visualitzar sobre una placa fotogràfica. Calculant el percentatge de cloranfenicol acetilat sobre el total de cloranfenicol acetilat o no tenim una estima de l'activitat CAT de la nostra mostra.

28.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Tris-HCl 1 M, pH 7,5.
2. Acetil CoA 10 mM.
3. Cloranfenicol marcat amb ^{14}C (ICN Biomedicals, 92 mCi/mmol, 100 $\mu\text{Ci/ml}$).
4. Acetat etílic.
5. Placa de cromatografia de sílica-gel sobre Polyester (Sigma).
6. Barreja de cloroform/metanol 19:1.

28.2. PROTOCOL.

1. Barrejar: 75 μl d'extractes citoplasmàtics, 32,5 μl de la solució de Tris-HCl 1 M, 20 μl de la solució d'acetil CoA 10 mM, 1 μl de cloranfenicol (0,1 μCi) i 21,5 μl d'aigua en un eppendorf.
2. S'incuba a 37°C al llarg de 4 hores.
3. S'afegeix 1 ml d'acetat etílic i s'agita. Aquest pas serveix per extreure el cloranfenicol, que anirà a la fase superior lipòfila (l'acetat etílic), de la resta de components de la reacció que quedaran a la fase inferior.
4. Es centrifuga un minut a la centrífuga d'eppendorfs a la màxima velocitat.
5. Es treu la fase superior i es col.loca a un nou eppendorf.
6. S'evapora tot l'acetat etílic mitjançant la utilització de l'"speedVac" al llarg d'uns 30 minuts.
7. S'afegeixen 30 μl d'acetat etílic i s'agita.
8. S'apliquen els 30 μl de mostra (de cinc en cinc) a una placa de cromatografia en capa prima de sílica gel sobre polyester. Com a fase mòvil s'utilitza la barreja de cloroform/metanol 19:1. Aquesta barreja es prepara el

mateix dia de l'experiment per evitar que s'evapori el metanol i varii la proporció, i es deixa dins del tanc unes hores abans de fer la cromatografia per tal que els vapors de la solució saturin el tanc i així el temps de correguda sigui més breu. Es submergeix la placa dins del tanc i quan el front arriba a l'extrem superior es treu i es deixa assecar.

9. Per últim, es visualitza el resultat de l'experiment o bé mitjançant la utilització d'un aparell de tipus AMBIS _____, i, o bé exposant la placa amb un film de tipus Kodak X-OMAT AR.

29. OBTENCIO D'EXTRACTES NUCLEARS.

El següent protocol consisteix en l'obtenció inicialment de nuclis a partir de cèl.lules en cultiu (extret del Current Protocols in Molecular Biology). Una vegada obtinguts aquests, es poden utilitzar directament (en el cas d'experiments de tipus "run-on") o bé es pot continuar el protocol fins a obtenir extractes de proteïnes nuclears, que és el que s'utilitza com a mostra en el cas d'experiments de tipus "band shift" o de "footprinting". El protocol d'extracció consisteix en incrementar paulatinament la pressió osmòtica del medi, de manera que s'aconsegueix extreure lentament el contingut protèic del nucli sense arrossegar la matriu de cromatina. Això és possible si l'increment de l'osmolaritat és molt lent. Si és massa ràpid els nuclis es colapsen i precipiten.

Es parteix de quatre plaques de 15 cm de diàmetre amb cèl.lules en confluència.

29.1. MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS.

1. Tampó hipotònic, pH 7,9:

- Hepes 10 mM.
- $MgCl_2$ 1,5 mM.
- KCl 10 mM.
- PMSF 0,2 mM*.
- DTT 0,5 mM*.

2. Tampó de diàlisi, pH 7,9:

- Hepes 20 mM.
- Glicerol 20%.
- KCl 100 mM.
- EDTA 0,2 mM.
- PMSF 0,2 mM*.
- DTT 0,5 mM*.

3. Tampó d'alta concentració de sals, pH 7,9:

- Hepes 20 mM.
- Glicerol 25%.
- MgCl₂ 1,5 mM.
- KCl 1,2 M.
- EDTA 0,2 mM.
- PMSF 0,2 mM*.
- DTT 0,5 mM*.

4. Tampó de baixa concentració de sals: exactament igual que el d'alta concentració però amb KCl 0,02 M en lloc de 1,2 M.

5. Trypan blue-----.

6. Homogenitzador de tipus "potter" (Afora S-314).

* Aquests dos reactius sempre s'han d'afegir immediàtament abans de començar l'experiment.

29.2. PROTOCOL.

Tot el procés s'ha de realitzar a 4°C:

1. Es treu el medi de la placa i es neteja dues vegades amb PBS.

2. S'afegeixen 2 ml de PBS fred i s'arranquen les cèl.lules amb l'ajut d'un "scraper". A continuació s'afegeixen 2 ml més i s'acaba de netejar la placa. Els quatre ml es col.loquen a un tub de 15 ml.

3. Es centrifuga 10 minuts a 2000 g.
4. Es treu el sobrenedant i es calcula (més o menys) el volum que ocupa el precipitat. S'afegeixen cinc vegades el volum de precipitat de medi hipotònic i es resuspèn ràpidament amb l'ajut d'una pipeta.
5. Es centrifuga al llarg de cinc minuts a 2000 g.
6. Es treu el sobrenedant i es calcula el volum del precipitat. S'afegeix també hipotònic fins a arribar a 3 vegades el volum del precipitat del pas 4 (p.e.: si el volum del precipitat del pas 4 era de 400 μ l i després del pas 5 ha pujat per efecte de la hipotonicitat del medi fins a 600 μ l, haurem de completar fins a 400x3, 1200 μ l amb també hipotònic). Es resuspèn i es col.loca en gel al llarg de 10 minuts.
7. S'homogenitza a un "potter" 10 vegades lentament. En acabar s'ha de comprovar tenyint amb "trypan blue" i mirant al microscopi que l'homogenització de les cèl.lules ha estat total. Si és així, es continua amb el protocol, si encara no és complerta es continua homogenitzant.
8. Es centrifuga 15 minuts a 3500 g. El precipitat són els nuclis.
9. Es mesura el volum del precipitat de nuclis i es resuspèn en aproximadament la meitat del volum d'empaquetament de també de baixa concentració de sals. Per comprobar que efectivament hi han nuclis, que no estan contaminats d'altres orgànuls cel.lulars i poder contar-los, un petit volum de la mostra es tenyeix amb "trypan blue" i es mira al microscopi. Si el que volíem obtenir eren nuclis congelem immediàtament la mostra. Si pel contrari volem obtenir extractes nuclears, continuarem amb el protocol.
10. Per obtenir els extractes nuclears es procedeix a afegir també d'alta concentració de sals per tal que la concentració final de KCl sigui de 0,3 M. Aquest volum de també d'alta concentració de sals s'ha d'afegir lentament, de 10 μ l en 10 μ l i agitant després de cada afegit per immersió.
11. Posar a agitar per immersió al llarg de 30 minuts.
12. Es centrifuga 30 minuts a la microfuga a la màxima velocitat.
13. Es col.loca el sobrenedant a una bosseta de diàlisi i es posa a dialitzar al llarg de 30 minuts dins d'un volum de també de diàlisi d'aproximadament 75

vegades el volum de mostra.

14. Es treu la mostra de la bosseta, es posa dins d'un eppendorf i es centrifuga 20 minuts a la microfuga a màxima velocitat. El sobrenedant és la mostra d'extractes nuclears que s'ha d'aliquotar ràpidament i guardar a -80°C . Una part s'utilitza per a mesurar la quantitat de proteïnes.

30. ASSAIG DE RETARDACIO EN GEL (BAND SHIFT).

30.1. INTERACCIO PROTEINA-DNA.

30.1.1. SOLUCIONS I REACTIUS.

1. Tampó de diàlisi: el mateix que s'utilitza a l'obtenció d'extractes nuclears.

2. Poly dI:dC (Sigma P-4929, 10 unitats): Es resuspèn tot el contingut del pot en $600\ \mu\text{l}$ d'aigua, es fan fraccions de $30\ \mu\text{l}$ i es guarden a -20°C .

3. Extractes nuclears.

4. DNA al que s'ha d'unir la proteïna marcat amb ^{32}P .

30.1.2. OBTENCIO I MARCATGE DEL DNA.

El troç que s'ha utilitzat s'ha obtingut tallant el plasmidi G1CAT-SmaI amb l'enzim de restricció AvaII, el que dóna un gran fragment diferents framents, entre ells un de petit de 66 pb que correspon a la zona d'interés. Aquest últim s'ha purificat mitjançant electroelució i s'ha quantificat per comparació en el gel amb quantitats conegudes del marcador de pesos moleculars. Es van obtenir al voltant de 100 ng de DNA que es van resuspendre en $25\ \mu\text{l}$ de TE.

El marcatge del troç de DNA es va realitzar utilitzant el "Random primed DNA labelling kit" de Boehringer ja descrit anteriorment (veure apartat 23). El protocol del marcatge del troç de DNA consisteix en:

1. Barrejar a un tub eppendorf 15 μ l del DNA (uns 60 ng), 5 μ l de [α - 32 P]-dCTP (ICN n $^{\circ}$ cat. 33004X, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 2,5 μ l de la barreja de reacció del "kit", 3,75 μ l de la barreja 1,7 mM dels nucleòtids dATP, dGTP i dTTP, i 1 μ l de l'enzim "klenow".

2. Incubar a 37°C al llarg de 30 minuts.

3. Precipitar el DNA afegint 250 μ l d'acetat amònic 5 M (no s'utilitza acetat sòdic per tal d'evitar que també precipitin els nucleòtids) i 750 μ l d'etanol absolut. Barrejar bé, deixar-ho al llarg de 30 minuts a -80°C i centrifugar 30 minuts a la màxima velocitat a la centrífuga d'eppendorfs.

4. Es treu el sobrenedant, s'afegeixen 500 μ l d'etanol 80%, es resuspèn el precipitat utilitzant el vòrtex, es posa a -80°C al llarg de 15 minuts i es centrifuga de nou 30 minuts a màxima velocitat. Per últim, es treu el sobrenedant i es resuspèn el precipitat en 100 μ l de TE. Es compten 2 μ l en el comptador d'escintil·lació líquida per a conèixer l'activitat específica.

30.1.3. PROTOCOL DE LA INTERACCIO PROTEINA-DNA.

1. S'afegeixen a tubs eppendorfs siliconitzats els extractes nuclears (normalment entre 5 i 10 μ g), el poly dI:dC (2 μ l), el DNA competidor fred (si n'hi ha), tampó de diàlisi per compensar els diferents volums d'extractes nuclears que volguem provar (intentant que mai el percentatge de glicerol final sigui més del 12%), i aigua per tal que el volum final a tots els tubs sigui el mateix, habitualment 12 μ l. L'ordre en que s'han d'afegir els diferents components és:

- a) tampó de diàlisi i aigua.
- b) DNA competidor fred (si n'hi ha).
- c) extracte nuclear.
- d) poly dI:dC.

2. Es fa un "speen" i es preincuba aquesta barreja al llarg de 15 minuts a temperatura ambient.

3. S'afegeix el DNA marcat, unes 20.000 cpm per tub i es posa 10 minuts en gel..

4. Es fa un "speen" i ja es pot passar a carregar el gel.

30.2. GEL I ELECTROFORESI.

30.2.1. SOLUCIONS I REACTIUS.

1. TBE x5:

- Tris-base 0,45 M.
- Acid bòric 0,45 M.
- EDTA 10 mM, pH 8 (p.e., s'afegeixen 20 ml d'una solució d'EDTA 0,5 M de pH 8 per a preparar 1 litre de TBE x5).

2. Acrilamida 30%.

3. Bisacrilamida 2%.

4. Persulfat d'amoni 10%.

5. TEMED.

6. "Stop buffer" de seqüenciació:

- Formamida 95%.
- EDTA 20 mM.
- Bromofenol blue 0,05%.
- Xylene cyanol 0,05%.

30.2.2. PROTOCOL.

1. En primer lloc i el mateix dia de l'experiment es prepara el gel. En el nostre cas era del 5% d'acrilamida-bisacrilamida (relació 30:0,8), 0,5% de TBE i 0,045% de persulfat d'amoni. Es barreja i es desgassifica al llarg d'uns 10 minuts. Per últim, s'afegeix el TEMED (uns 25 μ l per uns 80 ml de la barreja que donarà el gel) i es col.loca dins del sistema d'electroforesi per tal que polimeritzi. Una vegada ha solidificat, es precorre a 100 volts al llarg de 90 minuts a 4°C utilitzant com a tampó TBE x0,5.

2. Es carreguen les mostres en els diferents carrils i en el darrer es carreguen un parell de μ l de l'"stop buffer" de seqüenciació, que és el que ens

indicarà quan aturar la correguda. El gel s'acostuma a córrer a 4°C a uns 225 volts al llarg d'unes tres hores.

3. Una vegada ha corregut, s'extrau el gel, s'asseca i es posa a exposar utilitzant films del tipus AGFA Curix RP2.

31. APENDIX: SOLUCIONS D'US GENERAL.

- AIGUA TRACTADA AMB DEPC (AIGUA DEPC).

S'incuba aigua ultrapura (MilliQ, Millipore), a la qual hem afegit DEPC (0,01%) durant 12 hores a 37°C i, posteriorment, s'autoclava per tal d'eliminar qualsevol resta de DEPC (ja que podria alterar químicament els residus de purines de l'RNA).

- DNA D'ESPERMA DE SALMO.

1. Dissolem el DNA d'esperma de salmó en aigua estèril (10 mg/ml) durant 2-4 hores a temperatura ambient.

2. S'ajusta la concentració de NaCl a 0,1 M.

3. Es fa una extracció amb fenol neutre (veure més endavant): s'afegeix un volum igual de fenol, s'agita, es centrifuga a baixa velocitat i es recull la fase aquosa superior.

4. Es fa una extracció amb fenol/cloroform: es procedeix exactament igual que en l'apartat anterior però utilitzant en lloc de fenol sol una barreja de fenol/cloroform (1:1).

5. Recollim la fase aquosa i la passem per una xeringa de 17G varies vegades o, alternativament, la soniquem.

6. Precipitem la solució amb 2 volums d'etanol a -20°C durant un mínim de 2 hores.

7. Redissolem el precipitat en aigua estèril, de manera que la concentració de DNA s'aproximi a 10 mg/ml.

8. Es determina la concentració exacta fent una lectura d'absorvència a 260 nm.

9. Es guarda aliquotat a -20°C . El dia que s'utilitzi és convenient tornar a sonicar-lo.

- FENOL ACID.

Es liqua el fenol (Merck, ref. 206) posant-lo a un bany a 65°C i deixant la tapa una mica oberta (per eliminar els gasos que es puguin formar; tot el procés s'ha de realitzar sota una campana extractora de gasos). A continuació s'afegeix a la mateixa ampolla aigua tractada amb DEPC, i es barreja fins que es formi una emulsió. Es deixa reposar a 4°C perquè es separin bé les dues fases. Aspirem l'excés d'aigua deixant només uns pocs mil·límetres que recobreixin el fenol i es guarda a 4°C protegit de la llum.

- FENOL NEUTRE.

1. S'afegeix a fenol saturat amb aigua el mateix volum de Tris-HCl 1 M, pH 8. Es barreja per inversió.

2. Separem les dues fases per centrifugació a 4000 rpm durant 5 minuts. S'elimina la fase aquosa i es mira el pH d'aquesta. Si es inferior a 7, repetim el pas anterior; en cas contrari, prosseguim.

3. Afegim un volum igual de Tris-HCl 0,1 M pH 8. Es barreja per inversió.

4. Es separen les fases per centrifugació (4.000 rpm). Es mira el pH de la fase superior, i si és inferior a 7 es repeteix aquest pas; en cas contrari ja es pot guardar a 4°C protegit de la llum.

- FORMAMIDA DESIONITZADA.

S'afegeix a la formamida 0,1 g/ml de reïna Amberlite MB3 (Sigma).

S'agita en un agitador magnètic a temperatura ambient durant 30 minuts. Es filtra a través de paper Whatman 1MM, es fan alíquotes i es guarda a -20°C .

- LB.

- Triptona 1%.
- Extracte de llevat 0,5%.
- NaCl 0,5%.

S'ajusta el pH a 7,5 amb NaOH i s'autoclava.

Per a preparar plaques amb medi sòlid, afegim a l'LB abans d'autoclavar-lo agar a l'1,5%. S'autoclava i es deixa temperar a 50°C . S'aboca el medi sobre les plaques i es deixa solidificar a temperatura ambient. Es conserven a 4°C en posició invertida.

Opcionalment es pot afegir, després de temper-lo a 50°C , ampicilina $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ si el que volem és seleccionar un els bacteris transformats per un plasmidi recombinant.

- PBS.

- NaCl 137 mM.
- KCl 2,7 mM.
- KH_2PO_4 1,47 mM.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8 mM.

- SOLUCIO DE DENHARDT x50.

- Ficoll 1%.
- Polivinilpirrolidona 1%.
- BSA 1%.

Es guarda alíquotada a -20°C .

- SSC x20.

- Citrat trisòdic 0,3 M, pH 7.

- NaCl 3 M.

- **SSPE x20.**

- NaH₂PO₄ 0,2 M, pH 7,4.

- NaCl 3 M.

- EDTA 0,02 M.

- **STE.**

- NaCl 0,1 M.

- Tris-HCl 10 mM.

- EDTA 1 mM.

- **TE.**

- Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

- EDTA 1 mM.

RESULTATS

RESULTATS

CAPITOL 1

EXPRESSIO DE TRANSPORTADORS DE GLUCOSA DE TIPUS GLUT EN CEL·LULES ENDOTELIALS ECV304 EN CULTIU. EFECTE DE LA HIPERGLUCEMIA.

Les principals complicacions que comporta la diabetis, com la retinopatia (que acabarà donant lloc a ceguesa), la nefropatia (que provocarà la fallada renal) o les complicacions vasculars (augment dels riscos de patir aterosclerosi), són totes elles manifestacions locals d'una àmplia microangiopatia. Aquesta s'ha demostrat que és el resultat directe o indirecte de la resposta de les cèl·lules endotelials dels vasos front els canvis bioquímics provocats per la hiperglucèmia (Lorenzi i Cagliero, 1991; Larkins i Dunlop, 1992; Ruderman i col., 1992; Mandarino, 1992). Així, la principal característica de la microangiopatia és l'acúmul d'una extraordinària membrana basal, llàmina que provocarà la pèrdua de la cèl·lula endotelial i l'oclusió final del microvàs. S'ha demostrat, en estudis amb cèl·lules endotelials en cultiu, que aquestes responen a la hiperglucèmia incrementant l'expressió de diferents proteïnes integrants de la membrana basal, com ara el col·lagen IV, la fibronectina o la laminina (Cagliero i col., 1991). A més, la hiperglucèmia provoca una disminució en la capacitat proliferativa de les cèl·lules endotelials, el que també influeix en la disminució de l'angiogènesi i la pèrdua de la cèl·lula de l'endoteli (Lorenzi i col., 1985).

Per explicar els efectes de les altes concentracions de glucosa sobre el metabolisme de les cèl·lules endotelials s'han postulat diferents mecanismes. Un dels principals és el metabolisme del sorbitol, que estaria incrementat a partir de les altes concentracions de glucosa presents dins de la cèl·lula (Ruderman i col., 1992; Mandarino, 1992). Això comportaria diferents efectes, entre ells, problemes osmòtics, disminució en el contingut de mioinositol i en conseqüència, del metabolisme dels fosfatidilinositols, augment de la fructosa, etc. Altres vies que s'han implicat en els efectes provocats per la hiperglucèmia són la glicosilació no enzimàtica i la producció de radicals lliures (Ruderman i col., 1992), i la via de les pentoses fosfat (Larkins i Dunlop, 1992).

Com ja hem comentat a la Introducció, un dels principals efectes provocats per les altes concentracions de glucosa és la disminució en l'activitat del propi transport de glucosa. Aquest fenomen de regulació de l'expressió de gens involucrats en el transport de nutrients pels propis nutrients és molt conegut en el cas dels bacteris i els llevats, però poc en el cas de les cèl·lules

de mamífers. Així, encara que són ben conegudes les modificacions que provoca sobre GLUT1 (que poden estar tant a nivell de la transcripció, de la traducció, de la localització subcel·lular o de l'activitat intrínseca dels transportadors), els mecanismes pels que tenen lloc són encara molt desconeguts.

Amb aquests antecedents, i desconeixent-se els efectes que podia tenir la concentració de glucosa sobre l'expressió o l'activitat dels transportadors de glucosa en les cèl·lules endotelials, i la importància que podia tenir aquesta regulació en les complicacions que hem descrit anteriorment, el primer objectiu que ens vam plantejar en iniciar aquest treball va ser l'estudiar l'efecte de la hiperglucèmia en un model de cèl·lula endotelial en cultiu.

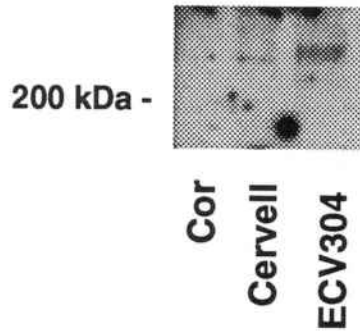
1.1. CARACTERITZACIO DE LA LINIA ENDOTELIAL ECV304.

La línia escollida va ser la ECV304, línia obtinguda per Takahashi i col. a l'any 1990 a partir de cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humà (Takahashi i col., 1990), per transformació i immortalització espontània. Els autors havien demostrat que aquesta línia presentava activitat ACE ("angiotensin-converting enzyme) i era positiva mitjançant immunocitoquímica per a la lectina UEA-I i per l'anticòs PHM5, característiques totes elles de cèl·lules endotelials. A més, presentava l'aventatge de no requerir factors de creixement especials en el medi de cultiu (presència de sèrum humà en el medi de cultiu), tal i com requereixen els cultius primaris de cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical (HUVEC). A més, els requeriments de sèrum eren baixos (creixen en presència d'un 10% de sèrum boví fetal).

Com una primera aproximació, vàrem comprovar si aquestes cèl·lules expressaven el factor de von Willebrand, proteïna produïda i secretada per les cèl·lules endotelials (Sadler, 1991). Amb aquest objectiu es va realitzar un assaig de "western blot" carregant mostres d'homogenat total de cervell, de cor i de cèl·lules ECV304. Com es pot observar en la Figura 1a, l'anticòs ens reconeix una proteïna de més de 200 kDa, el que coincideix amb el pes esperat per al factor de von Willebrand (per al que s'han descrit dues isoformes, la precursora d'uns 360 kDa, i la madura d'uns 260 kDa) (Fischer i col., 1994). La banda reconeguda només apareix a cervell i a les cèl·lules ECV304, encara que en aquestes darreres és molt més abundant.

Un segon marcador que vàrem provar, també mitjançant assaig de "western blot", va ser la integrina $\alpha V\beta 3$. Aquesta integrina s'ha descrit que

a) Factor de Von Willebrand



b) Integrina α VB3

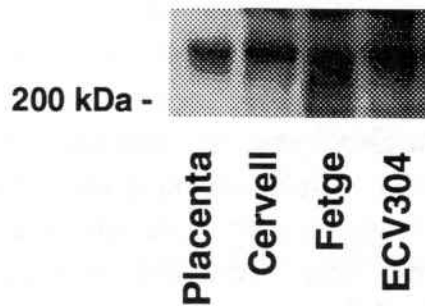


Figura 1: a) Es van córrer 20 μ g de membranes totals procedents de cor i de cervell de rata, i 50 μ g d' homogenat total de cèl.lules ECV304, en un gel de poliacrilamida del 7,5%. A continuació es va realitzar un assaig de "western blot" amb un anticòs contra el factor de von Willebrand. Es mostra un gel representatiu.

b) Es van córrer 15 μ g de membranes totals procedents de placenta humana, cervell i fetge de rata, i de cèl.lules ECV304, en un gel del 7,5% de poliacrilamida. A continuació, es va realitzar un assaig de "western blot" amb un anticòs específic per a l'heterodímer de la integrina α V β 3.

intervé en processos d'angiogènesi, induïts, sobre tot, per factors del tipus FGF o citoquines (Friedlander i col., 1995). Es van carregar membranes totals procedents de placenta humana, de cervell i fetge de rata, i de cèl·lules ECV304 i es van immunodetectar utilitzant un anticòs dirigit contra l'heterodímer (Marshall i col., 1991). Com es pot observar en la Figura 1b, en tots els cassos es va observar una banda d'alt pes molecular, al voltant dels 250 kDa. Aquest és el pes esperat del dímer format per la subunitat αV (160 kDa) i la subunitat $\beta 3$ (95 kDa) (Marshall i col., 1991).

1.2. CARACTERITZACIO DE LA CAPTACIO DE GLUCOSA I DELS TRANSPORTADORS EXPRESSATS EN LES CEL·LULES ECV304.

A continuació vam passar a caracteritzar les cèl·lules ECV304 des del punt de vista del transport de glucosa. El primer que calia veure era si realment (com era d'esperar) transportaven glucosa. Amb aquest objectiu es va realitzar un assaig de captació de glucosa utilitzant l'anàleg 2-deoxiglucosa (DOG) marcat radioactivament. Es van incubar cèl·lules confluents amb l'anàleg marcat i una concentració final de l'anàleg fred de $100 \mu M$ al llarg de diferents temps, es rentaven i es va mesurar la quantitat de radioactivitat que ens quedava dins de les cèl·lules. Com es pot veure en la Fig. 2, la captació de DOG és lineal amb el temps, al menys fins els 20 minuts. Així, es va triar el temps de 10 minuts per a realitzar tots els estudis de captació posteriors. A continuació, per tal de mesurar quina era l'aportació dels transportadors de glucosa de tipus GLUT a aquesta captació de la DOG, es van incubar cèl·lules al llarg de deu minuts amb el substrat radioactiu i en absència o en presència d'un inhibidor específic d'aquesta família de transportadors, la citocalassina B. A més, com a mesura només de la unió inespecífica i de la difusió a través de la membrana, es van incubar cèl·lules al llarg del mateix espai de temps amb l'anàleg DOG marcat però en presència d'un medi fred ($4^{\circ}C$) i amb una quantitat molt elevada ($50 mM$) de glucosa sense marcar. Com es pot observar en la Fig. 3, mentre que la incubació al llarg de 10 minuts en presència només de l'anàleg DOG comportava una acumulació d'uns $9,5 nmols/mg$ de proteïna, quan l'assaig es realitzava en presència tota l'estona de citocalassina B $100 \mu M$ l'acúmulo era d'al voltant de $0,4 nmols/mg$ de proteïna. Aquest acúmulo en presència de citocalassina B era del mateix ordre que el que obteníem incubant les cèl·lules al llarg dels deu minuts en presència del medi fred i amb glucosa (la captació atribuïda només a difusió i unió inespecífica), el que ens indicava que tota la captació observada era deguda a transportadors de la família GLUT.

Per tal de confirmar l'existència de transportadors de tipus GLUT en

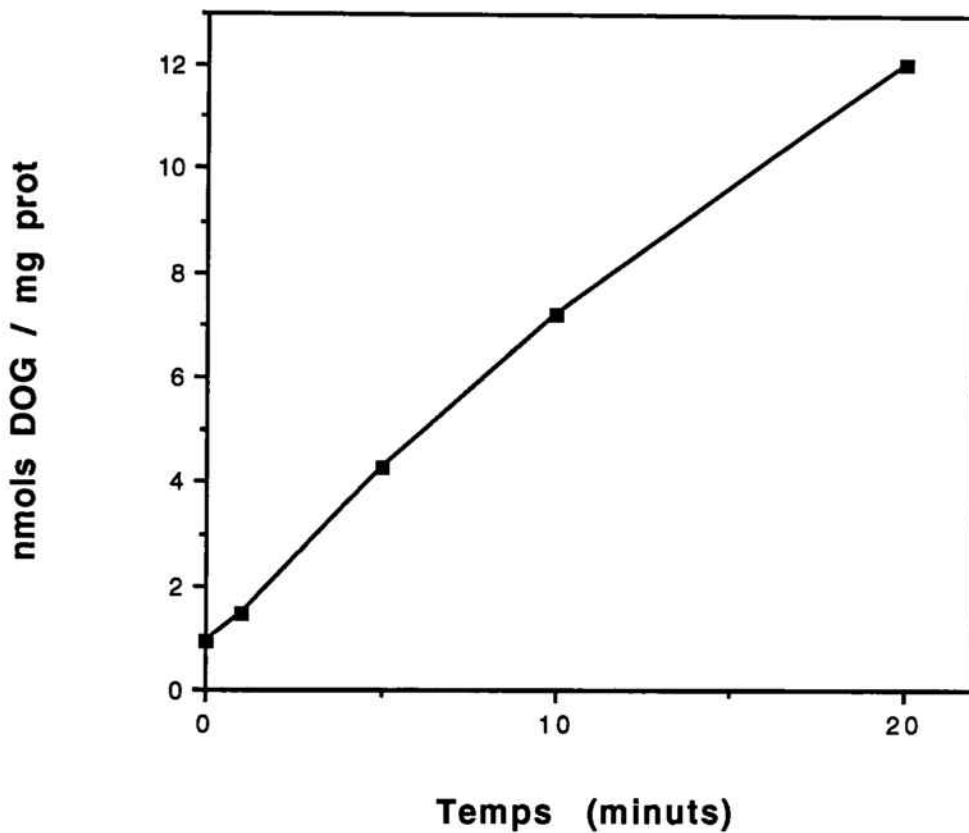


Figura 2: Cèl.lules ECV304 es van sembrar en plaques "multiwell" de sis pous. Quatre dies després, quan estaven confluents, es va treure el medi i es van rentar dues vegades amb el tampó de transport. A continuació es van incubar al llarg de deu minuts amb tampó de transport a 37°C que contenia 100 µM 2-deoxiglucosa i 1 µCi de ³H-2-deoxiglucosa. Passat aquest temps es va aturar el transport afegint PBS a 4°C amb 50 mM glucosa, i es van solubilitzar les cèl.lules en 1 mililitre d'una solució 0,1% SDS i 0,1 N NaOH. Es va comptar la radioactivitat acumulada dins de les cèl.lules i es va corregir per la quantitat de proteïnes. Es mostra un experiment representatiu, en que cada punt es va realitzar per duplicat.

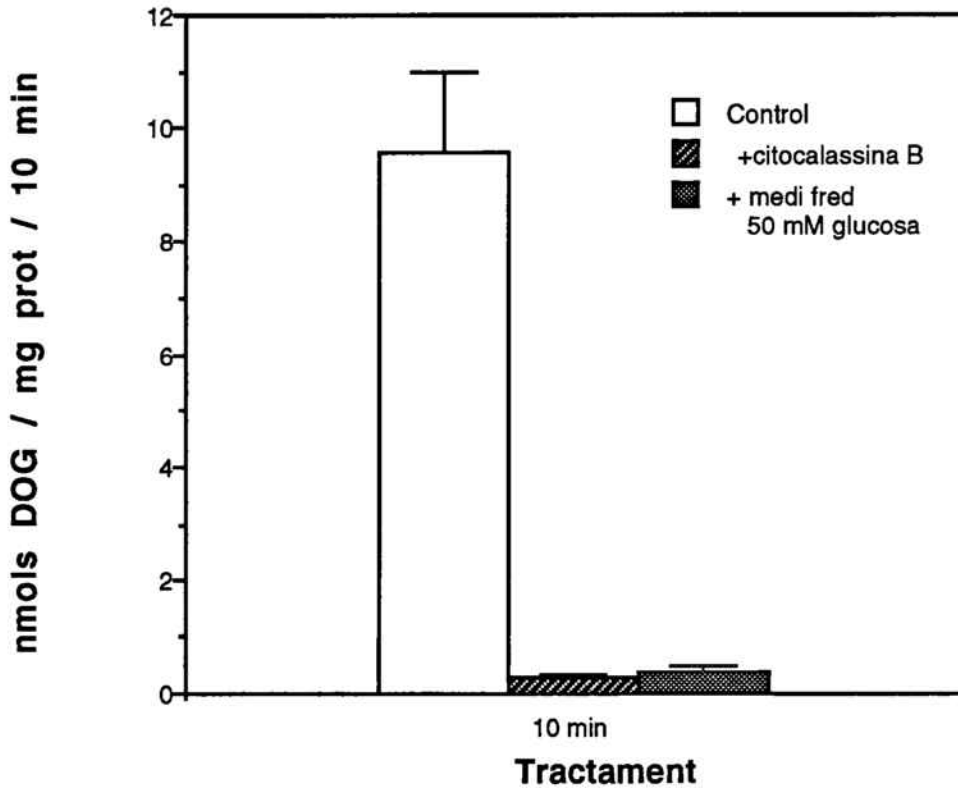


Figura 3: Es va realitzar exactament el mateix protocol descrit en la Figura 2, però incubant les cèl.lules al llarg de deu minuts en tampó de transport sense o en presència de 100 μ M citocalassina B, o en un tampó que contenia 50 mM glucosa i es mantenia a 4°C. Passat aquest temps es va aturar la captació de la manera ja descrita i es va mesurar la radioactivitat acumulada, corregida per μ g de proteïna. Els resultats són la mitjana i error estàndard de 4 experiments.

aquestes cèl·lules, i de quin transportador es tractava, en primer lloc es va realitzar un assaig de tipus "Northern blot" amb una sonda específica per al transportador GLUT1, i es va hibridar una membrana on havíem carregat RNA procedent de cèl·lules ECV304, de cervell de rata i de cèl·lules BAEC (cèl·lules endotelials d'aorta bovina). Aquestes darreres eren cèl·lules endotelials procedents d'un cultiu primari en passe primarenc (entre el passe 3 i el 9). Amb la mateixa membrana es va realitzar una hibridació amb la sonda corresponent a la β -actina, com a control de la càrrega d'RNA. Com es pot observar en la Fig. 4, amb la sonda de GLUT1 es va detectar una única banda del pes esperat per al missatger de GLUT1, d'unes 2,8 kilobases. Cal destacar que la quantitat expressada en les cèl·lules endotelials ECV304 era molt elevada, si la comparem amb l'expressada per un teixit ric en GLUT1 com és el cas de cervell, i molt més alta que la que trobem en cèl·lules endotelials de cultiu primari, com són les cèl·lules BAEC. En un assaig realitzat en paral·lel i que no els mostrem, es va utilitzar una sonda dirigida contra GLUT5 per realitzar també un assaig de "northern blot", però no vam trobar cap senyal específica en les cèl·lules ECV304.

A continuació, es van utilitzar anticossos específics contra les proteïnes de GLUT1, GLUT3 i GLUT4 per tal de visualitzar, mitjançant un assaig de "western blot", la presència o no d'aquestes proteïnes. Com es pot observar en la Fig. 5b i c, no vàrem detectar, en cap dels assajos realitzats utilitzant els anticossos contra GLUT3 i GLUT4, cap mena de banda en les membranes totals procedents de les cèl·lules ECV304. En canvi, quan es va utilitzar l'anticòs policlonal dirigit contra GLUT1 sí que vam obtenir un senyal (Fig.5a). Com es pot observar en el segon carril, la banda obtinguda era molt ampla (d'entre 50 i 60 kDa), i amb un pes molecular clarament superior a la proteïna GLUT1 de cervell (d'uns 45 kDa). La primera prova que ens va indicar que totes aquestes bandes que detectàvem en les membranes totals procedent de les cèl·lules ECV304 eren GLUT1, va ser l'eliminació de tots els oligosacàrids N-ligats mitjançant el tractament previ amb N-glicosidasa F. Com es pot observar a la part dreta de la Fig 5a, el tractament amb aquesta N-glicosidasa provocava l'augment de movilitat electroforètica de la proteïna de cervell fins uns 40 kDa. El mateix tractament amb les membranes procedents de les cèl·lules ECV304 provocava la reducció de totes les bandes a una única del mateix pes molecular aparent que la de cervell. Per tant, els senyals detectats a les cèl·lules ECV304 eren tots ells GLUT1, i la diferència de mida tant entre elles com amb la proteïna de cervell, es devien a una heterogènia glicosilació.

Per tal de confirmar que es tractava de GLUT1 es va realitzar un experiment d'immunoprecipitació. Amb aquest objectiu es va lligar un anticòs

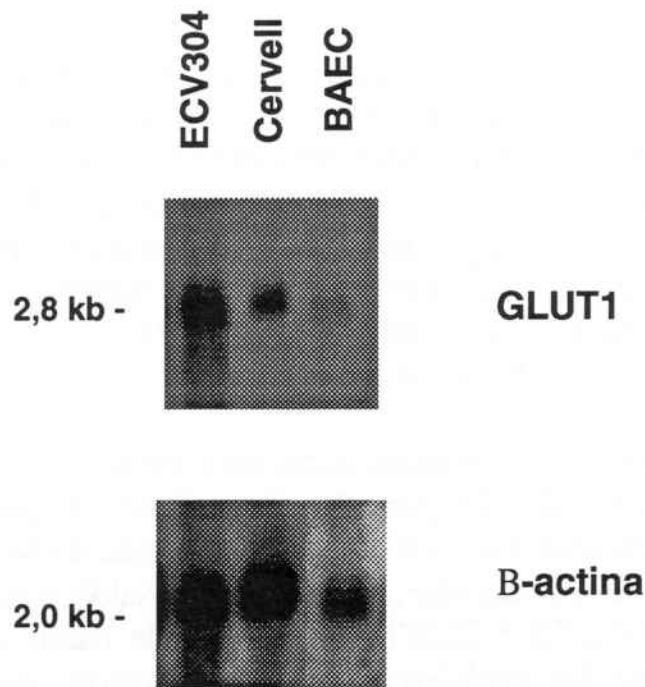
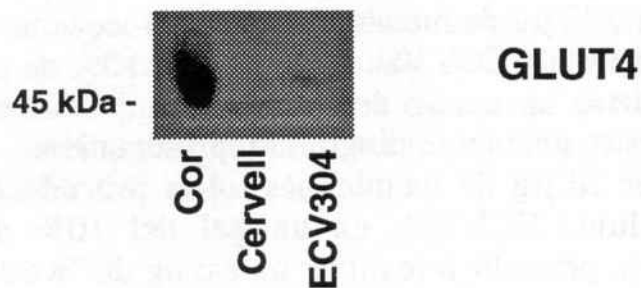
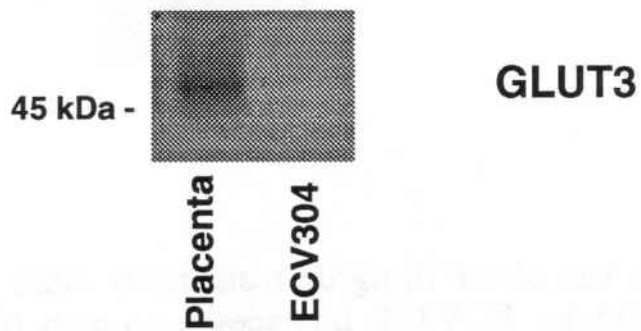
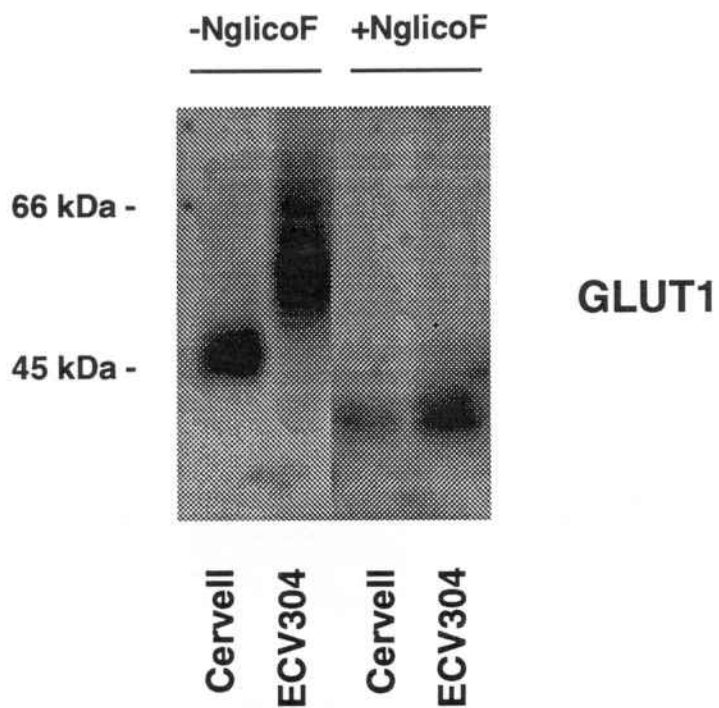


Figura 4: Es van córrer 25 µg d'RNA procedent de cèl.lules ECV304 i de cervell de rata, i 10 µg procedents de cèl.lules endotelials d'aorta bovina (BAEC), en un gel d'agarosa de l'1,2%. A continuació es va transferir a una membrana de Hybond i es va realitzar un assaig de "northern blot" utilitzant una sonda marcada contra GLUT1. La mateixa membrana es va dehibridar i es va hibridar de nou amb una sonda contra la β-actina. Es mostra una autoradiografia representativa.

Figura 5: a) Es van córrer 10 μg de membranes totals procedents de cervell de rata o de cèl.lules ECV304, tractades o no amb N-glicosidasa F (veure Materials i Mètodes), en un gel del 10% de poliacrilamida, i es va realitzar un assaig de "western blot" amb un anticòs contra GLUT1. Es mostra una autoradiografia representativa.

b) Es van córrer 200 μg de membranes totals procedents de placenta humana o de cèl.lules endotelials ECV304 en un gel del 10% de poliacrilamida, i es va procedir a realitzar un assaig de "western blot" utilitzant un anticòs contra GLUT3. Es mostra una autoradiografia representativa.

c) Es van córrer 20 μg de membranes totals procedents de cor i cervell de rata, i de cèl.lules ECV304, en un gel del 10% de poliacrilamida. A continuació es va procedir a realitzar un assaig de "western blot" utilitzant un anticòs contra la proteïna GLUT4 de rata. Es mostra una autoradiografia representativa.



monoclonal contra GLUT1 a boletes d'agarosa, es van incubar amb les mostres de membranes totals tant de cervell de rata com de les cèl·lules ECV304, prèviament solubilitzades, i es va immunoprecipitar tot el GLUT1 present en la preparació. A continuació es va realitzar un "western blot" amb un segon anticòs (el mateix utilitzat en les estudis previs). Com es pot observar en la Fig. 6, en el precipitat obtingut de la immunoprecipitació es troba la major part de la proteïna reconeguda en l'assaig de "western", i en el cas de les cèl·lules endotelials s'havien immunoprecipitat totes les bandes detectades.

1.3. LOCALITZACIO SUBCEL·LULAR DE GLUT1

Com s'ha vist fins el moment, havíem observat que les cèl·lules endotelials ECV304 semblaven expressar un únic transportador de la família GLUT, GLUT1, encara que la proteïna expressada tenia un patró de glicosilació diferent que la proteïna expressada en el cervell de rata. El següent objectiu que ens vàrem plantejar va ser intentar evidenciar a quin compartiment subcel·lular es localitzava dins de les cèl·lules ECV304. Amb aquest propòsit vàrem fer dues aproximacions experimentals. En un primer moment, en experiments que no els mostrem, vàrem immunolocalitzar GLUT1, mitjançant immunocitoquímica sobre cubres on prèviament s'havien fet créixer les cèl·lules, i on s'hi havien fixat. En aquests experiments es va poder evidenciar que GLUT1 tenia una localització doble. Per un costat existia un marcatge clàrament intracel·lular al voltant del nucli, i més dèbil, un marcatge que podíem atribuir a membrana plasmàtica.

Amb aquesta informació vàrem realitzar la segona aproximació experimental que va consistir en un fraccionament subcel·lular. Aquest consistia en l'homogenització i posterior obtenció de diferents fraccions de membranes amb diferents densitats, mitjançant la utilització d'un gradient discontinu de sacarosa. Amb les diferents fraccions obtingudes vam realitzar assajos de "western blot" amb diferents marcadors de membranes de superfície o de membranes intracel·lulars, i amb GLUT1. Com a marcadors de membranes de superfície es van utilitzar la β 1-integrina i la subunitat β del receptor de la insulina, i com a marcadors de membranes intracel·lulars, dues proteïnes aïllades pel grup del Dr. Ignacio Sandoval, que es localitzaven en la zona cis (proteïna GIMP_c) o trans (proteïna TGN38) de l'aparell de Golgi (Yuan i col., 1987).

Com es pot observar en la Fig. 7, els marcadors de membrana plasmàtica es localitzaven en fraccions del gradient de densitat més lleugera (F1 i F2 la

Immunoprecipitació de GLUT1

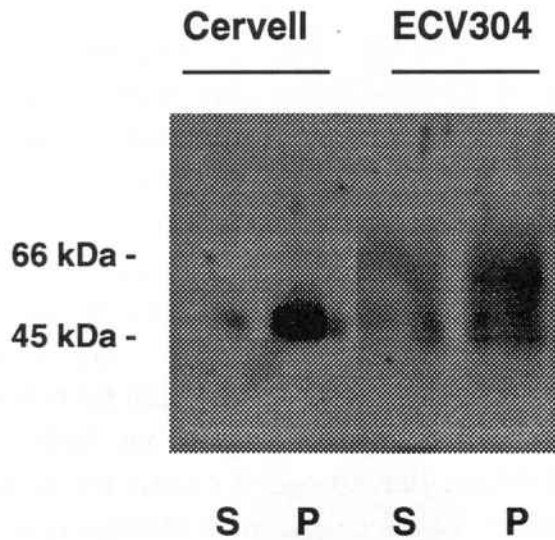


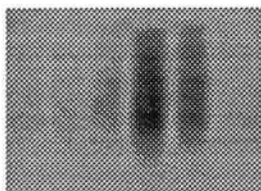
Figura 6: 10 μg de membranes totals procedents de cervell de rata, i 25 μg procedents de cèl.lules ECV304 es van immunoprecipitar utilitzant el mètode descrit a la secció de Materials i Mètodes. Tant el sobrenedant (S), com el precipitat (P), es van carregar en un gel del 10% de poliacrilamida, i es va realitzar un assaig de "western blot" utilitzant un anticòs contra GLUT1. Es mostra una autoradiografia representativa.

Figura 7: Es va realitzar un fraccionament subcel·lular de cèl·lules ECV304 seguint el mètode descrit a la secció de Materials i Mètodes. Breument., es van homogenitzar cèl·lules ECV304 utilitzant un homogenitzador del tipus Heidolph. L'homogenat (HT) es va centrifugar a 16.000 g al llarg de 15 minuts. Es va recollir el sobrenedant, que es va precipitar centrifugant-lo a 150.000 g 90 minuts (S1). El precipitat de la centrifugació de 16.000 g es va resuspendre en una solució al 10% de sacarosa, i es va carregar en un gradient discontinu de sacarosa format per tres fases de 27, 38 i 48% sacarosa. Es va centrifugar 2 hores a 76.000 g utilitzant un rotor basculant, i es van recollir les interfases corresponents a entre 10 i 27% sacarosa (F1), la interfase 27-38% sacarosa (F2), la interfase 38-48% sacarosa (F3), i per últim, el precipitat (F4), precipitant-les a continuació per centrifugació de 25 minuts a 70.000 g. 5 µg de cada una d'aquestes fraccions es van carregar en gels del 10% (cas de les mostres assajades amb els anticossos contra GLUT1, β 1-integrina i subunitat β del receptor de la insulina), o del 7,5% de poliacrilamida (cas de les mostres assajades amb els anticossos contra TGN38 i GIMPC), i es va procedir a realitzar "western blots" amb els anticossos descrits anteriorment. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

Fraccionament subcel.lular

Fracció: HT S1 F1 F2 F3 F4

66 kDa -
45 kDa -



GLUT1

110 kDa -



β 1-integrina

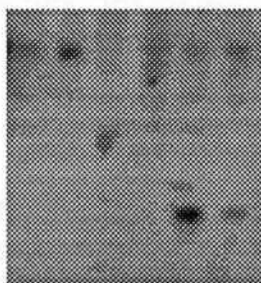
90 kDa -



Receptor de la insulina

200 kDa -

66 kDa -



TGN38

110 kDa -

66 kDa -



GIMPC

Fracció: HT S1 F1 F2 F3 F4

subunitat β del receptor de la insulina, i a F1, F2 i F3 la β 1-integrina), el que coincideix amb els resultats obtinguts per Horner i col., de qui es va adaptar el mètode (Horner i col., 1987). El marcador de trans-Golgi TGN38 el detectàvem com a dues bandes, una d'alt pes molecular (més de 200 kDa) i una altra d'uns 70 kDa. La de movilitat electroforètica baixa (la de més de 200 kDa) es localitzava sobre tot en la fracció S1. Aquesta fracció correspon a la fracció més lleugera, equivalent als "low density microsomes" de l'adipòcit, i que segons Horner i col., correspondria a fraccions de membranes intracel·lulars des d'on i cap a on es poden translocar proteïnes de les fraccions de la membrana plasmàtica. La forma de TGN38 de movilitat més elevada (la de 70 kDa) es trobava localitzada en les fraccions més pesades del gradient, F3 i F4. Pel que fa al marcador de cis-Golgi (GIMP_c), també treballàvem tres bandes diferents, una d'alt pes molecular (al voltant de 120 kDa) i dues bandes de baix pes molecular, d'uns 55 i 40 kDa, respectivament. També en aquest cas la seva localització era en les fraccions més pesades del gradient (F2, F3 i F4 per la banda d'alt pes molecular, i F3 i F4 en el cas de les de baix pes molecular). Cal destacar que en aquest cas no trobàvem marca de GIMP_c en la fracció més lleugera S1.

En aquestes condicions, quan es va immunodetectar GLUT1 en les diferents fraccions del gradient (Fig 7), es va trobar la típica banda ampla que ja havíem descrit en els experiments amb membranes totals en les fraccions F2 i F3. Aquesta localització es corresponia perfectament amb la d'una proteïna típica de membrana plasmàtica com és la β 1-integrina, encara que també tenia una forta presència en una fracció més pesada com és la F3, on es localitzaven preferentment marcadors de membranes intracel·lulars, com són els marcadors de cis-Golgi i TGN38. Per tant, el patró obtingut amb els experiments de fraccionament subcel·lular coincidien amb els resultats de la immunocitoquímica, amb GLUT1 localitzat en les cèl·lules ECV304 a la membrana plasmàtica i amb un alt contingut en localitzacions intracel·lulars (probablement reticle i aparell de Golgi).

EFFECTE DE LA HIPERGLUCEMIA SOBRE LA CAPTACIO DE GLUCOSA EN LES CEL·LULES ECV304.

Com ja hem comentat, el nostre objectiu en treballar amb les cèl·lules ECV304 era intentar evidenciar possibles efectes de la hiperglucèmia sobre el transport de glucosa i sobre els transportadors expressats, en aquest cas només GLUT1, com hem vist en l'apartat anterior. Amb aquest objectiu, es va realitzar un experiment incubant les cèl·lules amb diferents concentracions de

glucosa en el medi, i en absència de sèrum, al llarg de 24 hores abans de realitzar un experiment de captació de 2-deoxiglucosa. La concentració màxima assolida va ser de 30 mM glucosa en el medi. En el cas de la resta de punts assajats es va compensar la concentració fins a 30 mM amb una molècula innocua, com és el manitol, per tal que la pressió osmòtica fos la mateixa en tots els punts, i l'efecte observat fos només degut a la glucosa present en el medi. Com es pot observar en la Fig.8, la presència en el medi de concentracions creixents de glucosa provocava una disminució dosi-depenent de la captació de DOG. Els valors màxims d'inhibició estaven al voltant d'entre un 50 i un 60% de la captació, assolits a concentracions entre 26 i 30 mM glucosa. La dosi a la que l'efecte inhibidor era semimàxim estava al voltant de 17 mM glucosa. Cal destacar que a concentracions de glucosa baixes, la disminució observada en la captació de DOG era molt petita, i en cap cas, significativa.

Com hem vist en l'experiment anterior, les inhibicions més fortes es donaven entre 0-5 mM i 22-30 mM glucosa en el medi. Per raons de comoditat en la preparació dels medis, i per fer les nostres dades comparables als experiments que s'estaven portant en paral·lel en col·laboració amb el grup del Dr. Peter Rosen (del Diabetes Institute de Düsseldorf), vàrem triar les concentracions de 5,5 mM i 22 mM per a realitzar tots els experiments que exposarem a partir d'aquest moment.

A continuació vàrem estudiar el temps necessari perquè es donés l'efecte de la hiperglucèmia. Per això, es van incubar cèl.lules confluent en un medi 5,5 mM glucosa i lliure de sèrum al llarg de 48 hores. 4, 8, 24 o al llarg de totes les 48 hores abans de l'experiment de captació, es va canviar el medi a 22 mM glucosa en els grups tractats, o a medi nou 5,5 mM glucosa. En aquestes condicions, la concentració de glucosa present en el medi es modificava molt poc. Passava de 22 mM a 17,4 mM en 48 hores, i de 5,5 mM a 2,5 mM. Com es pot observar a la Fig 9a, la captació de DOG es modificava molt poc a les 4 hores de preincubació amb un medi 22 mM glucosa (disminució del 10%), s'assolien valors d'inhibició importants a les 8 hores (31%) i que es feien màxims a les 24 hores (38%), mantenint-se la inhibició amb 48 hores d'incubació (43%). La inhibició es pot observar millor a la Fig9b, on hem representat la inhibició assolida en cada temps de preincubació. El valor teòric on l'efecte seria semimàxim es pot situar al voltant de les 6 hores.

Per tal de conèixer si l'efecte de la hiperglucèmia disminuïent la captació de DOG era degut a una disminució en la V_{max} o en la K_m , es van realitzar experiments preincubant les cèl.lules al llarg de 24 hores amb una concentració

Captació de 2-DOG

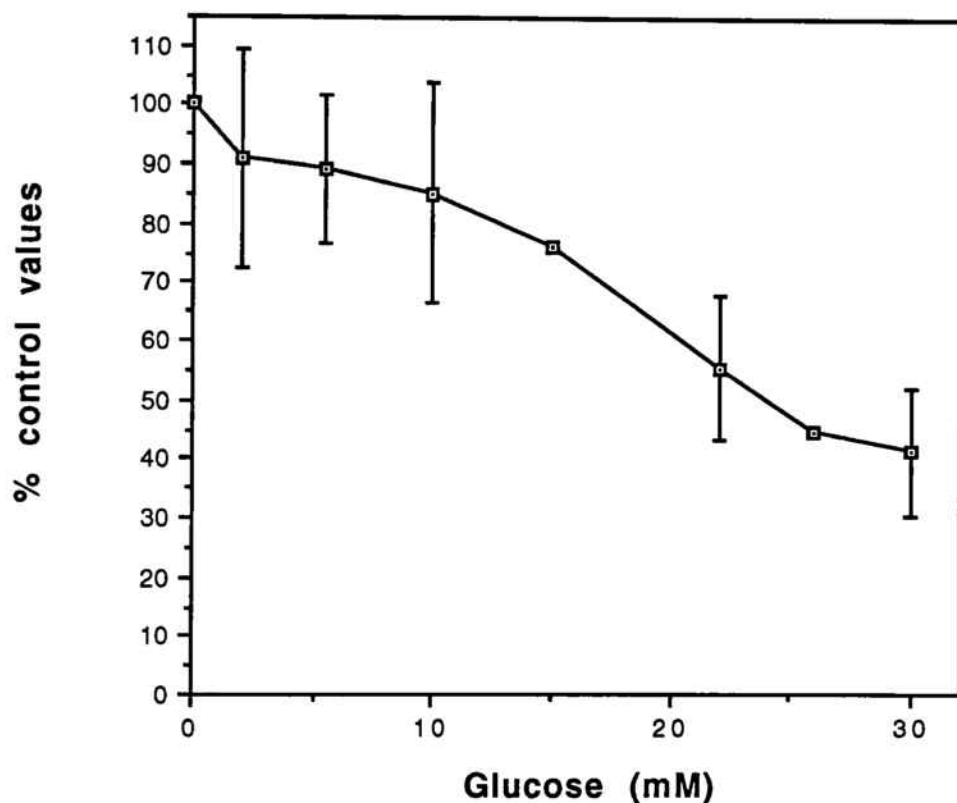
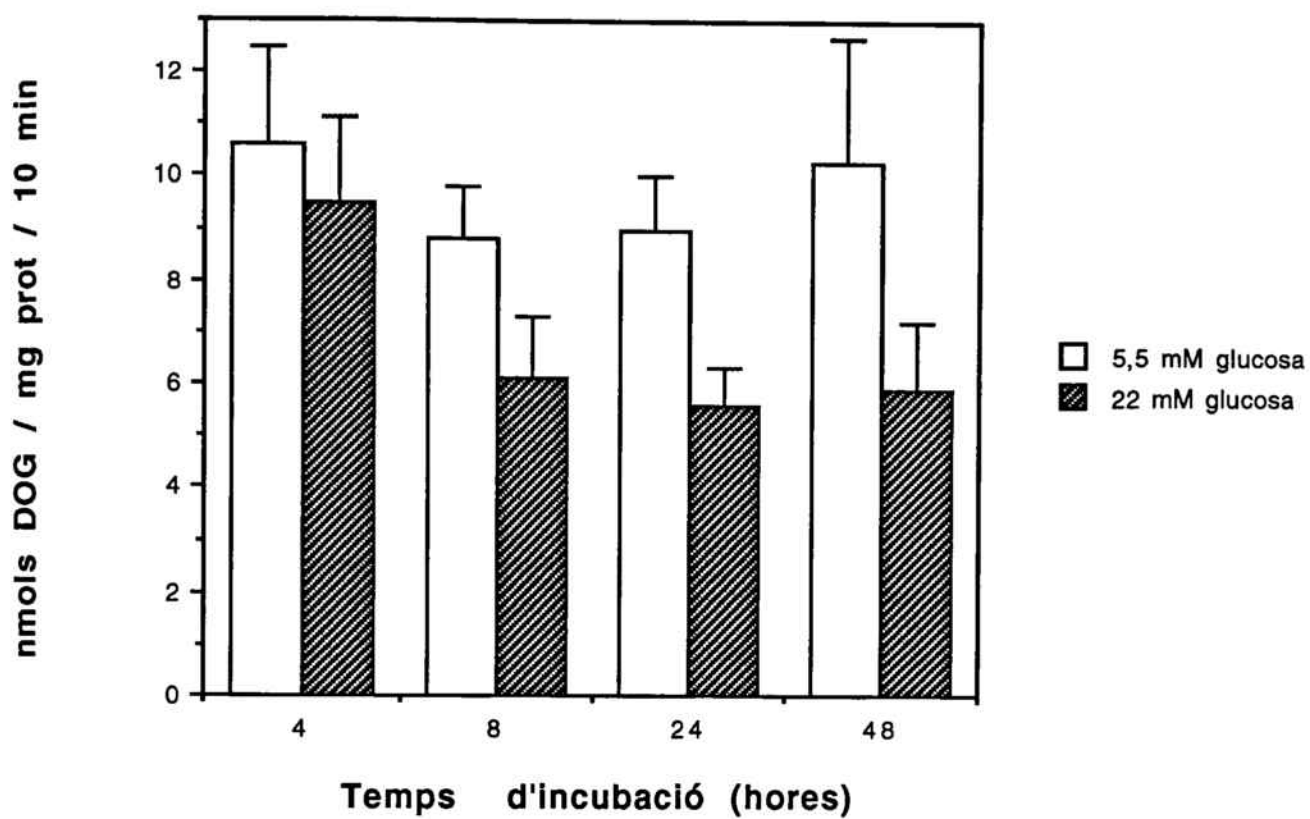


Figura 8: Cèl.lules ECV304 en confluència es van incubar al llarg de 24 hores en un medi MEM sense sèrum, amb les concentracions de glucosa indicades en la figura. Passades les 24 hores, es van rentar dues vegades amb tampó de transport, i es va procedir a realitzar un assaig de captació de 2-deoxiglucosa com ja ha estat descrit a la Figura 2. Es mostra la mitjana de tres experiments, realitzat cada punt per duplicat, i expressats com a % del valor obtingut en un medi sense glucosa.

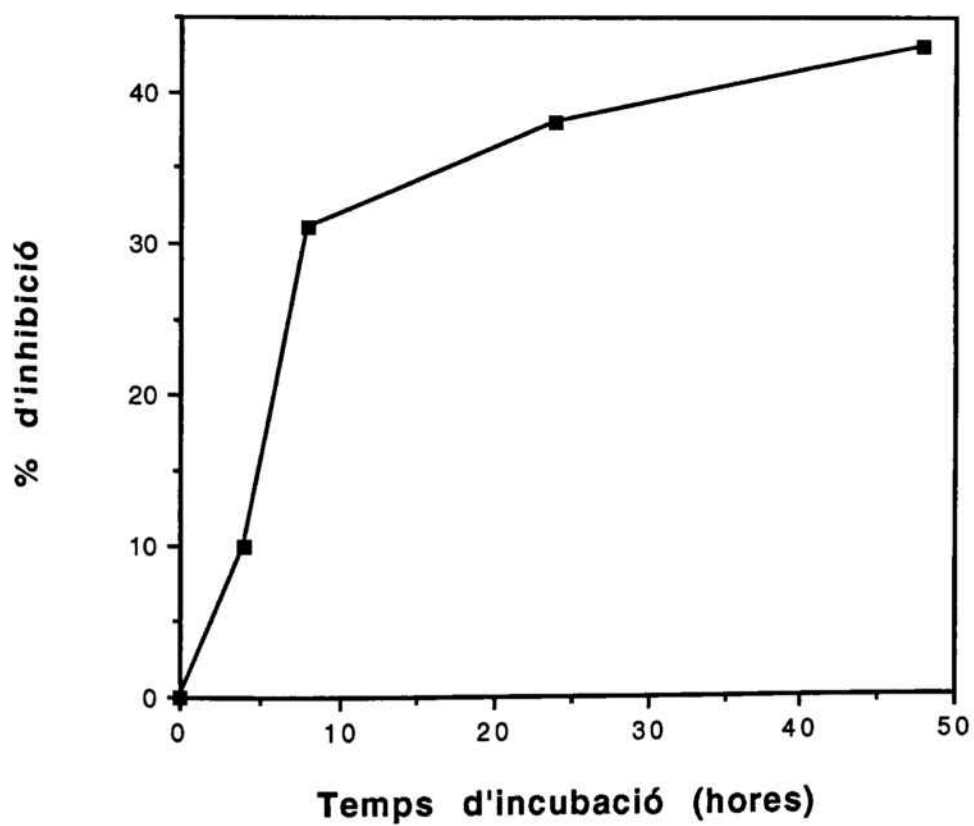
Figura 9: a) Es van preincubar cèl.lules ECV304 confluents al llarg dels temps indicats en un medi DMEM 5,5 mM o 22 mM glucosa. A continuació es va treure el medi, es van rentar les cèl.lules dues vegades amb tampó de transport, i es va procedir a assajar la captació de 2-deoxiglucosa al llarg de deu minuts com ja s'ha descrit. Els resultats que es mostren són la mitjana i error estàndard de quatre experiments.

b) Es representa el % d'inhibició trobat en els experiments descrits en l'apartat a) en els grups preincubats amb 22 mM glucosa en el medi respecte els 5,5 mM glucosa, per a cada un dels temps assajats.

a)



b)



de 5,5 o 22 mM glucosa en el medi (sempre en absència de sèrum), i a continuació es va realitzar l'assaig de captació de DOG al llarg de deu minuts en presència de diferents concentracions de DOG sense marcar en el medi. A continuació es va calcular la captació realitzant una representació de Lineweaver-Burk. En la Fig.10 mostrem un experiment representatiu, on, com es pot observar, s'evidencia que l'efecte de la hiperglucèmia inhibint la captació de DOG es deu, sobre tot, a una disminució en la V_{max} , sense cap modificació en la K_m . Quan es calculen els valors de diferents experiments i es calcula la mitjana, obtenim uns valors de K_m de $1,84 \pm 0,26$ (5,5 mM glucosa) i $2,68 \pm 0,76$ (22 mM), i uns valors de V_{max} de 178 ± 17 (5,5 mM) i de 87 ± 30 (22 mM).

Vàrem voler evidenciar si l'efecte de la hiperglucèmia era dependent de la síntesi de proteïnes. Per això, es van preincubar les cèl.lules al llarg de 24 hores en un medi 5,5 o 22 mM glucosa, i en presència o absència en el medi de l'inhibidor de la síntesi de proteïnes cicloheximida, en una concentració final d'1 $\mu\text{g/ml}$. Com es pot observar en la Fig.11, la preincubació al llarg de les 24 hores amb aquest inhibidor provocava una disminució en la captació de DOG d'un 44%. Però malgrat aquesta disminució provocada per la pròpia cicloheximida, la hiperglucèmia continuava provocant una disminució de la captació en presència de l'inhibidor, i del mateix ordre que en la seva absència (60% i 52%, respectivament). Vàrem provar una preincubació menys llarga, de 8 hores, en presència de concentracions de l'inhibidor més grans (5 i 10 $\mu\text{g/ml}$). Com es pot observar a la part esquerra de la Fig.11, també en aquestes condicions la hiperglucèmia mantenia el seu efecte.

Per tal de comprovar si l'efecte de la hiperglucèmia era reversible, es van incubar cèl.lules ECV304 al llarg de 24 hores en un medi en presència de 5,5 mM o 22 mM glucosa. A continuació, les cèl.lules mantingudes en medi 22 mM es van dividir en dos grups. Un d'ells es va mantenir en medi 22 mM, mentre que l'altre es va canviar a medi 5,5 mM. Pel que fa a les mostres preincubades en un medi 5,5 mM glucosa, es va canviar a medi fresc 5,5 mM al llarg dels temps indicats. Als diferents temps assajats (contats a partir de les 24 hores inicials de preincubació), es va mesurar la capacitat de captar 2-DOG per part dels tres diferents grups. El resultat el mostrem a la Fig.12, on s'han expressat com a % de la inhibició residual en el grup prèviament tractat amb 22 mM després de cada temps passat en medi 5,5 mM. Com es pot observar, l'efecte de la hiperglucèmia és reversible, i els temps en els que té lloc són molt més ràpids que els temps als que es dona l'efecte contrari, la inhibició. Així, mentre que com ja hem dit el temps al que es donava l'efecte semimàxim d'inhibició estava al voltant de les 6 hores, en el cas de la reversibilitat l'efecte

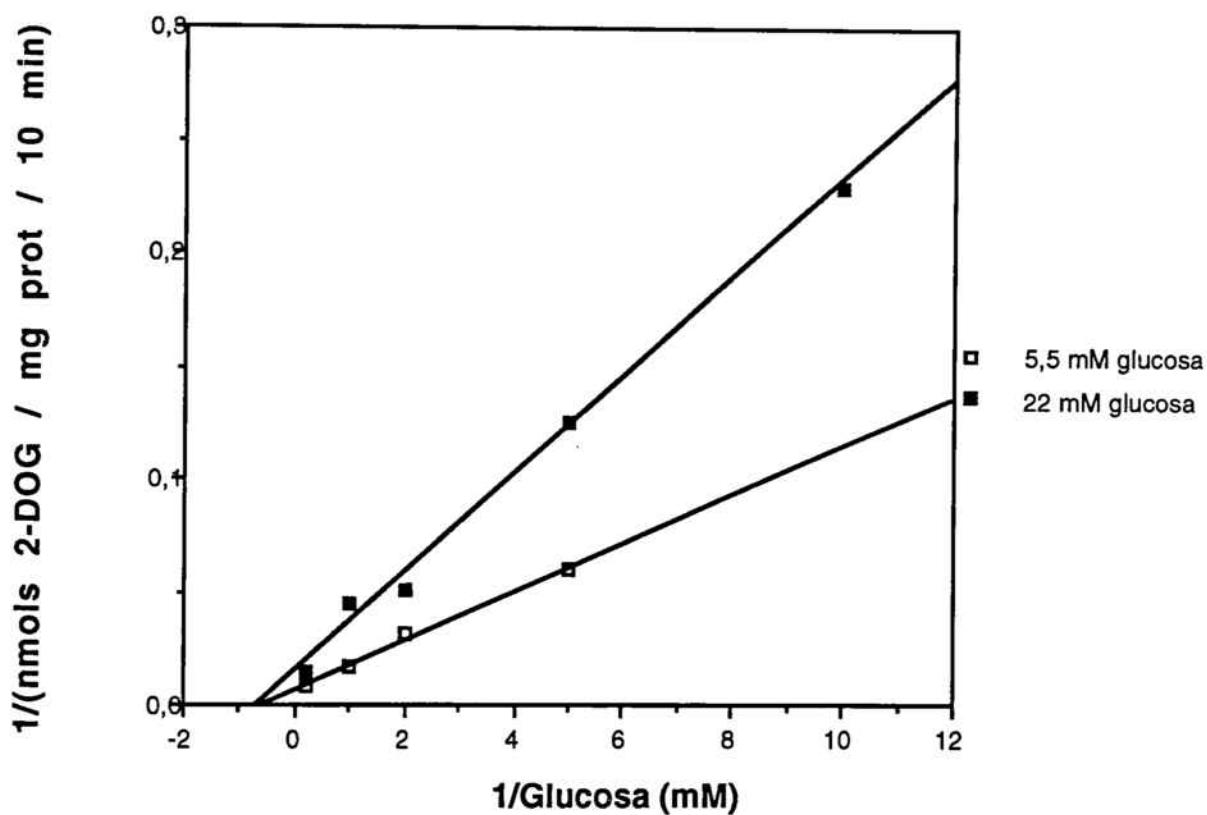


Figura 10: Cèl.lules ECV304 confluents es van preincubar al llarg de 24 hores en medi DMEM 5,5 o 22 mM glucosa. A continuació, es van rentar dues vegades amb tampó de transport i es va passar a assajar al llarg de deu minuts la captació de 2-deoxiglucosa, en un tampó de transport que contenia quantitats diferents del substrat. Així, es van assajar concentracions de 0,1, 0,2, 0,5, 1 i 5 mM 2-deoxiglucosa en el tampó de transport. Els resultats obtinguts es van expressar en forma de nmols de 2-DOG captats en deu minuts i per mg de proteïna, i es van representar utilitzant la representació de Lineweaver-Burk. A la figura es mostra un experiment representatiu.

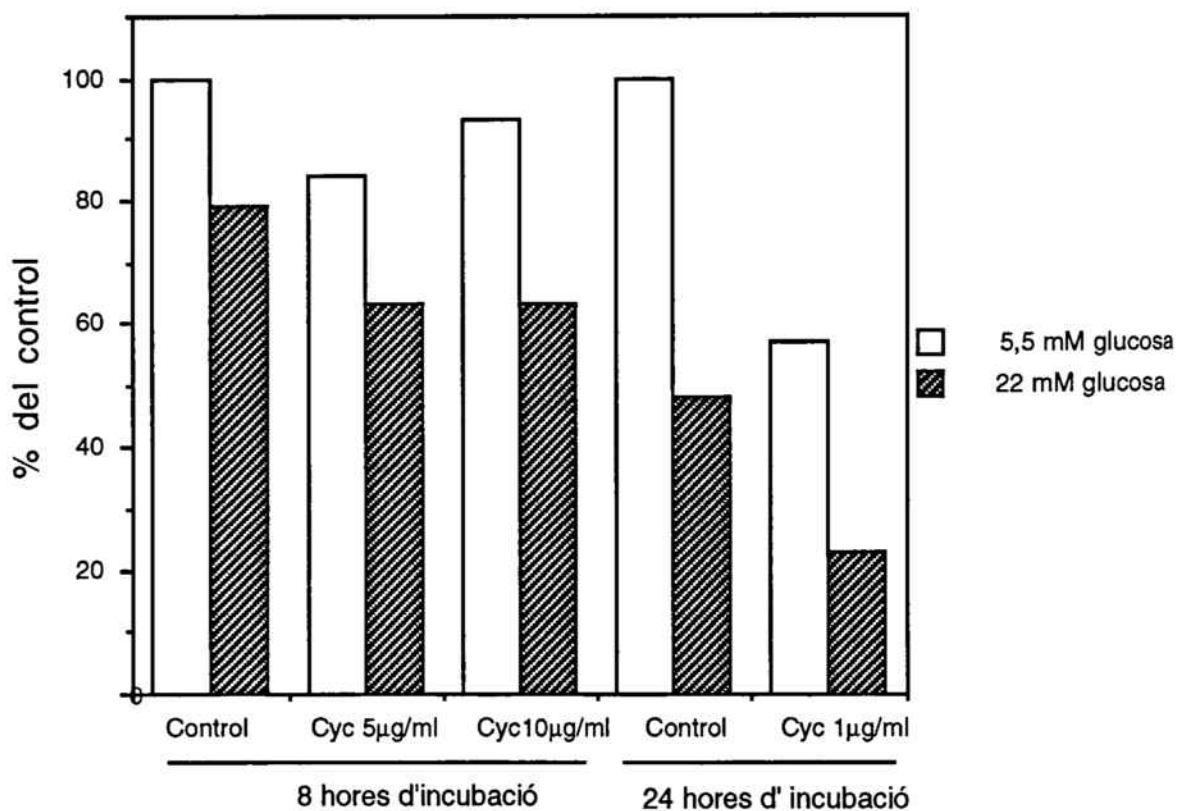


Figura 11: Cèl.lules ECV304 confluents es van preincubar al llarg dels temps indicats (8 o 24 hores) en DMEM 5,5 o 22 mM glucosa, i al que s'havia afegit o no les concentracions indicades de cicloheximida. Passat el temps de preincubació, les cèl.lules es van rentar dos cops amb tampó de transport i es va procedir a assajar la captació de 2-deoxiglucosa al llarg de deu minuts de la forma ja descrita. Els resultats es van expressar com a % del valor obtingut de captació en el grup preincubat amb 5,5 mM glucosa sense cicloheximida, per a cada un dels temps assajats de preincubació. Es mostren els resultats mitjana de dos experiments, realitzats cada un d'ells per duplicat.

Reversibility

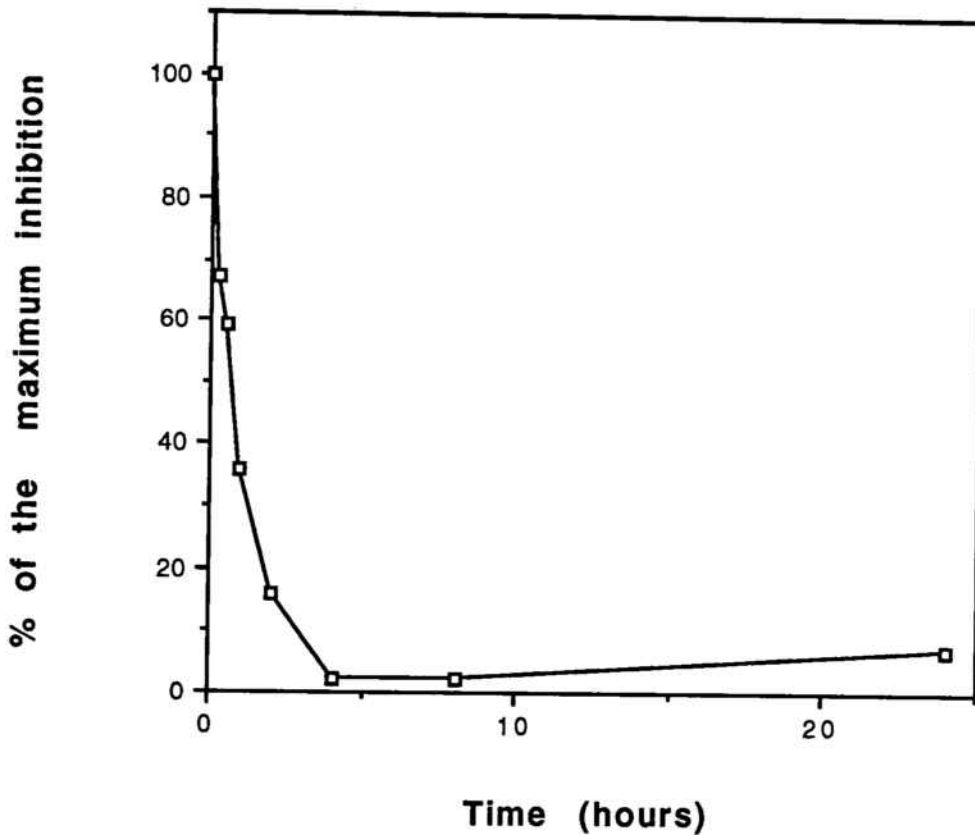


Figura 12: Es van preincubar cèl.lules ECV304 confluents al llarg de 24 hores en un medi DMEM 5,5 mM o 22 mM glucosa sense sèrum. A continuació, a les cèl.lules en medi 5,5 mM s'els va canviar el medi a medi fresc 5,5 mM, mentre que les preincubades en medi 22 mM glucosa es van dividir en dos grups: un es va canviar a medi 22 mM fresc, mentre que l'altre grup es va canviar a medi 5,5 mM glucosa. Passats els temps que s'indiquen a la figura, es van rentar dues vegades amb tampó de transport, i es va procedir a assajar la captació de 2-deoxiglucosa de la manera ja descrita per als diferents grups. El resultat es va expressar com % d'inhibició remanent en el grup passat de 22 a 5,5 mM glucosa respecte la inhibició produïda en el grup mantingut en medi 22 mM.

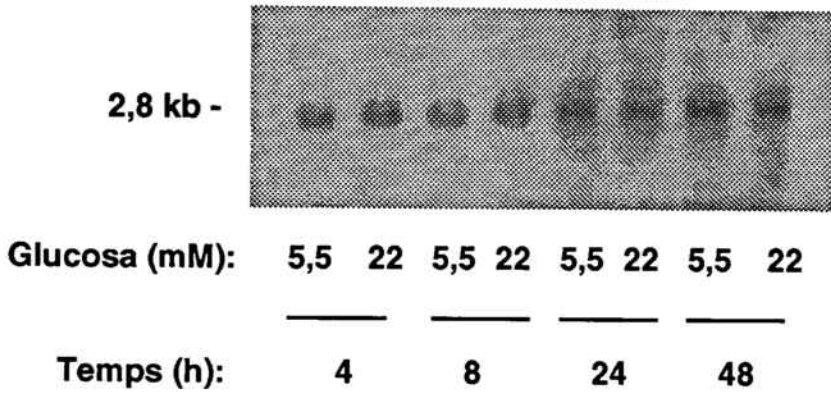
semimàxim es dona aproximadament a l'hora del canvi de nou a medi 5,5 mM.

1.5. MANCA D'EFECTE DE LA HIPERGLUCEMIA SOBRE L'mRNA, LA PROTEINA I LA DISTRIBUCIO SUBCEL·LULAR DE GLUT1.

Com ja hem descrit a la Introducció, la hiperglucèmia pot provocar tant una disminució de la quantitat total de transportadors presents a la cèl·lula (afectant tant a la transcripció com a la traducció de la proteïna GLUT1), com modificant la seva localització subcel·lular. Amb aquests antecedents, el següent pas que ens vam plantejar va ser evaluar l'efecte de la hiperglucèmia tant pel que fa a la quantitat de l'mRNA de GLUT1 i de la seva proteïna, com pel que fa a la seva localització subcel·lular dins de la cèl·lula endotelial.

A la Fig.13 mostrem l'anàlisi de "northern blot" realitzat carregant l'RNA procedent de cèl·lules ECV304 tractades amb un medi 5,5 o 22 mM glucosa al llarg dels temps indicats, 4, 8, 24 i 48 hores. Com es pot observar, no vàrem detectar cap mena de modificació en les quantitats d'mRNA per a GLUT1 en cap dels temps assajats, temps en els que, com ja hem vist, existia una clara disminució en la captació de 2-DOG. A continuació vàrem passar a evaluar el possible efecte de la hiperglucèmia sobre la quantitat de proteïna GLUT1. Com ja hem comentat, les membranes totals procedents de cèl·lules ECV304 contenen una alta quantitat del transportador de glucosa. Per tal d'estar segurs que el sistema de detecció mitjançant "western blot" no s'ens estigués saturant, vàrem utilitzar un sistema d'"slot blot", carregant diferents quantitats de proteïna de cada un dels tractaments. Es van carregar les diferents quantitats assajades de membranes totals purificades de cèl·lules sotmeses a tractament amb 5,5 o 22 mM glucosa al llarg dels mateixos temps que en el cas del "northern blot". El resultat obtingut es pot observar en la Fig.14. Com es pot veure, tampoc en aquest cas es va observar cap modificació en la quantitat de proteïna GLUT1 per efecte dels diferents tractaments. Per últim, es va assajar l'efecte de la hiperglucèmia sobre la distribució subcel·lular de GLUT1, utilitzant el sistema de fraccionament subcel·lular descrit anteriorment. Com es pot veure en la Fig.15, tampoc la hiperglucèmia afectava ni a la distribució subcel·lular de GLUT1 ni a la de la β 1-integrina.

GLUT1 mRNA



B actina mRNA



Figura 13: Cèl.lules ECV304 confluents es van incubar al llarg dels temps indicats en un medi DMEM 5,5 o 22 mM glucosa en absència de sèrum. A continuació es va procedir a obtenir RNA dels diferents grups, i es van carregar 25 µg de un en un gel d'agarosa de l'1,2%. Es van córrer les mostres i es va realitzar un assaig de "northern blot" utilitzant una sonda específica per a GLUT1. La mateixa membrana es va dehibridar i hibridar de nou amb una sonda contra la β-actina. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

Proteïna GLUT1

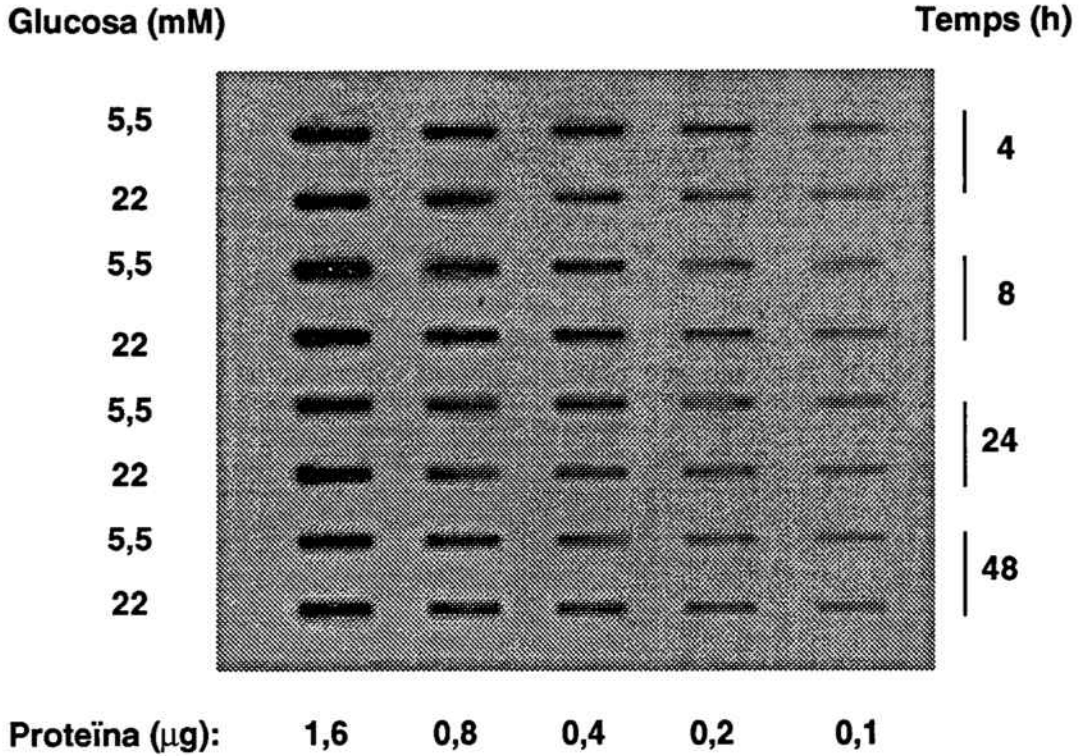


Figura 14: Cèl.lules ECV304 confluents es van incubar al llarg dels temps indicats en un medi DMEM sense sèrum, i amb presència de 5,5 o 22 mM glucosa. A continuació, es van obtenir preparacions de membranes totals dels diferents grups i es van carregar les quantitats de proteïnes indicades en un sistema d'"slot blot" en una membrana de nitrocel.lulosa. Una vegada fixades les proteïnes, la membrana es va tractar per realitzar un assaig de "western blot" amb un anticòs contra la proteïna GLUT1. Es mostra l' autoradiografia d'un experiment representatiu.

Distribució subcel.lular de la proteïna GLUT1

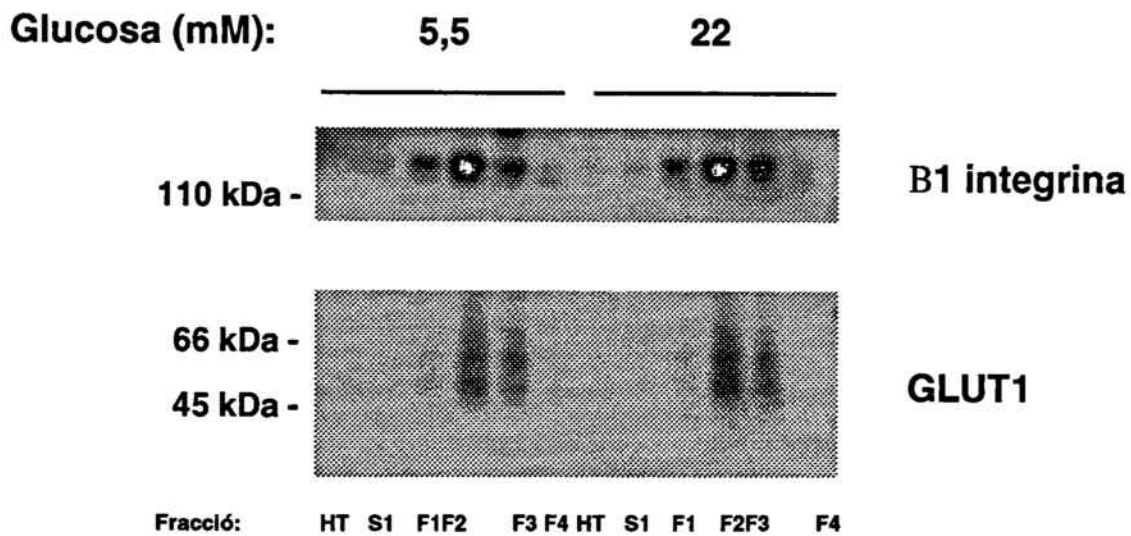


Figura 15: Cèlules ECV304 confluents es van preincubar al llarg de 24 hores en un medi DMEM amb 5,5 o 22 mM glucosa, en absència de sèrum. A continuació, es va procedir a realitzar un fraccionament subcel.lular amb el protocol ja descrit a la Figura 7. Amb les diferents fraccions obtingudes es va realitzar un assaig de "western blot" carregant gels del 10% de poliacrilamida amb 10 µg de cada una de les fraccions i immunodetectant GLUT1 i β1-integrina. Es mostra el resultat obtingut en un experiment representatiu.

1.6. EFECTE DE LA HIPERGLUCEMIA SOBRE EL TRANSPORT DE 3-O-METILGLUCOSA I SOBRE L'ACTIVITAT HEXOQUINASA.

Dels experiments descrits fins el moment es desprenia que la modificació en la captació de 2-DOG observada, per part d'altres concentracions de glucosa en el medi en les cèl·lules endotelials ECV304, havia de ser causada per algun altre factor. La mesura d'internalització de la 2-DOG és reflex del transport a través de la membrana, però també de la fosforilació que pot patir aquest anèleg de la glucosa per part de l'hexoquinasa. Per tal d'assajar si realment la hiperglucèmia tenia un efecte directe sobre el transport de glucosa a la membrana, i no sobre la fosforilació, una primera aproximació experimental que ens vàrem plantejar va ser mesurar el transport d'un altre anèleg, la 3-O-metilglucosa (3-O-MeG). Aquesta té l'avantatge que no es fosforila, de manera que la seva internalització és una mesura directa del transport a través de la membrana. El problema que té és que arriba a l'equilibri molt ràpidament, de manera que és difícil trobar condicions de linealitat a les que mesurar el transport, ja que s'ha de fer a temps molt curts. Així, es van utilitzar cèl·lules ECV304 sotmeses a una preincubació al llarg de 24 hores en un medi amb 5,5 mM o 22 mM glucosa, i a continuació es van incubar al llarg de diferents temps en presència de 3-O-MeG marcada radioactivament. Els resultats obtinguts es mostren a la Fig.16. Com es pot veure, el transport de 3-O-MeG es saturava ràpidament, només era lineal al llarg dels 2 primers minuts, i el número de comptes era molt baix. Malgrat aquestes dificultats per mesurar el transport, es pot observar que no existia cap diferència entre el grup de cèl·lules tractades amb una alta concentració de glucosa (22 mM) respecte el grup control (5,5 mM). Per tant semblava que en aquest model cel·lular concret la hiperglucèmia no modificava el transport de glucosa, però sí la captació de 2-DOG. La resposta només es podia trobar a nivell de l'hexoquinasa.

Per tal de tenir una estima de l'activitat hexoquinasa (pel que fa a la 2-DOG) en les cèl·lules sotmeses a hiperglucèmia en comparació amb les cèl·lules control, es van preincubar al llarg de 4 o 24 hores les cèl·lules en un medi 5,5 o 22 mM glucosa. A continuació, es van incubar al llarg de deu minuts amb la mateixa quantitat de 2-DOG marcada i freda que en els experiments de captació. Passat aquest temps, es van rentar les cèl·lules, es van arrancar, i es va passar a mesurar quin percentatge de la 2-DOG internalitzada es trobava en forma de 2-DOG lliure, i quin percentatge es trobava en forma de 2-DOG fosforilada. Els resultats obtinguts es mostren a la Fig.17. Com es pot observar, la preincubació en un medi 22 mM glucosa al llarg de 4 hores provocava una caiguda en la quantitat total de 2-DOG+2-DOG-P del 19%. En aquestes condicions, la 2-DOG lliure puja un 155%, mentre que la 2-DOG-P

Captació de 3-O-Metilglucosa

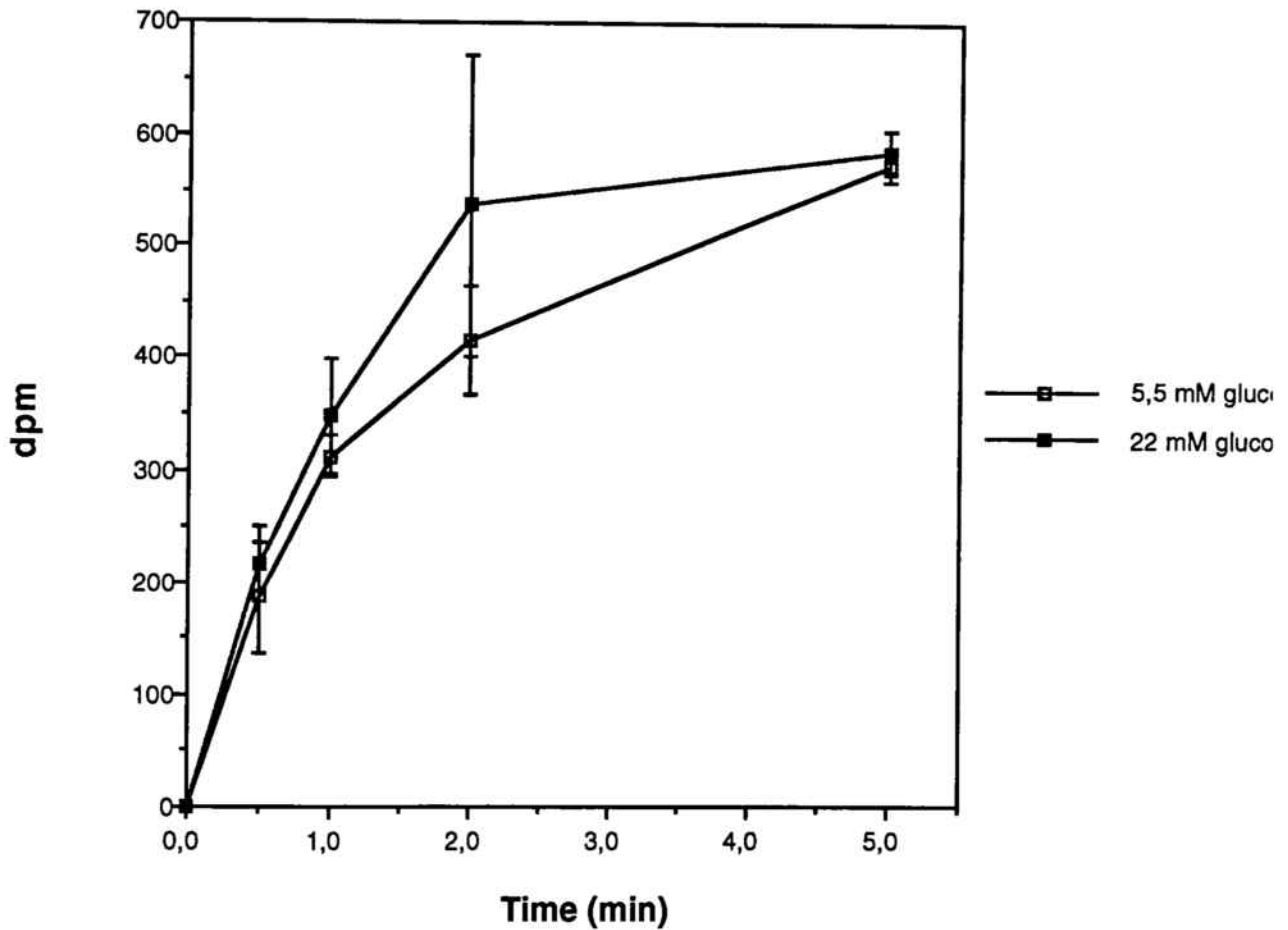


Figura 16: Cèl.lules ECV304 confluents es van preincubar al llarg de 24 hores en un medi DMEM sense sèrum, i amb 5,5 o 22 mM glucosa. Passat aquest temps, es van rentar dos cops amb tampó de transport, i es va procedir a assajar la captació de l'anàleg 3-O-metilglucosa al llarg dels temps indicats. La concentració de 3-O-metilglucosa sense marcar en el tampó va ser de 100 μM , i vàrem afegir 1 μCi de ^{14}C -3-O-metilglucosa. Passat els temps indicats en la figura, es va aturar la captació afegint PBS fred i amb 50 mM glucosa, i es va procedir a quantificar la radioactivitat. Es mostra la mitjana i error estàndard de tres experiments.

Efecte de la hiperglucèmia sobre l'estat de fosforilació de la 2-DG

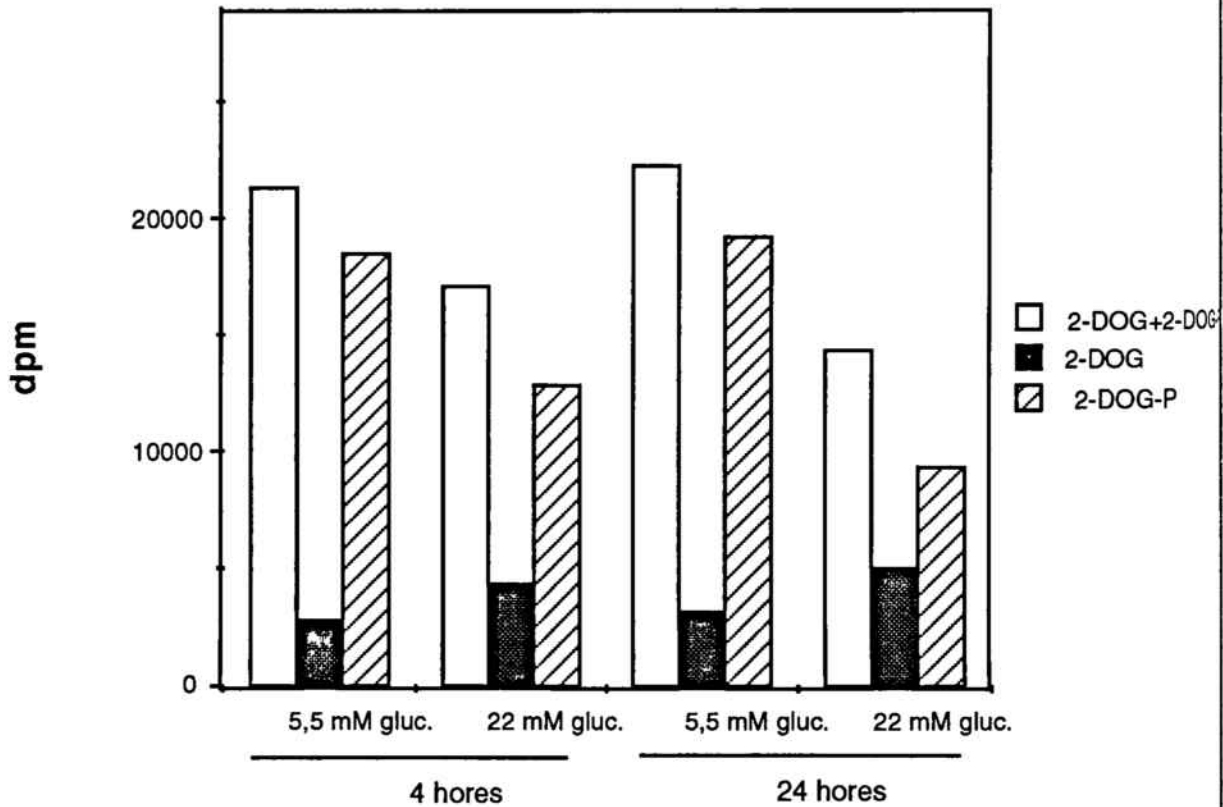


Figura 17: Cèl.lules ECV304 confluents es van preincubar al llarg de 4 o 24 hores en un medi DMEM sense sèrum amb una concentració de glucosa de 5,5 o 22 mM. Es van rentar amb tampó de transport i es van incubar al llarg de deu minuts en tampó que contenia 2 μ Ci de 3 H-2-deoxiglucosa i 100 μ M de 2-deoxiglucosa. Passats els deu minuts, es van rentar amb PBS fred amb 50 mM glucosa, i es van arrancar les cèl.lules de la placa. A continuació, es van homogenitzar, es va pendre una mostra (2-DOG+2-DOG-P) i es va procedir a separar la 2-deoxiglucosa lliure de la 2-deoxiglucosa fosforilada (veure Materials i Mètodes). Una vegada separades es va passar a quantificar la radioactivitat associada a la forma lliure (2-DOG) i l'associada a la forma fosforilada (2-DOG-P). Es mostra la mitjana de dos experiments, realitzat cada punt per duplicat.

disminueix en un 31%. Quan es miren els efectes de la preincubació de 24 hores, s'observa que aquesta provoca una caiguda en la suma 2-DOG+2-DOG-P del 36%, un increment en la quantitat de 2-DOG lliure del 160% i una disminució de la 2-DOG-P del 52%. Per tant, la hiperglucèmia, en les cèl·lules endotelials ECV304, provoca una clara disminució en l'activitat hexoquinasa, d'aquí la disminució en la quantitat de 2-DOG-P. Quan es calcula el cocient entre 2-DOG-P/2-DOG, s'observa que en les cèl·lules preincubades amb 5,5 mM glucosa està al voltant de 6,5 (Fig.18). En canvi, quan es calcula en el cas de les cèl·lules sotmeses a hiperglucèmia es troba un cocient de 3,2 en el cas de les de 4 hores, i de 2 en el cas de les preincubades 24 hores.

Com a quadre resum, en la Fig.19 es mostra l'efecte de la hiperglucèmia al llarg de 24 hores sobre la captació de 2-DOG, el transport de 3-O-MeG i la fosforilació de la 2-DOG. Com es pot observar, la presència d'altres concentracions de glucosa en el medi modifica l'activitat de l'hexoquinasa disminuint-la, provocant això una menor captació de 2-DOG (a l'acumular-se glucosa lliure intracel·lular), però sense cap efecte a nivell del transport ni dels transportadors de glucosa.

Effect of high glucose on the ratio 2-DOG-P/ 2 DOG

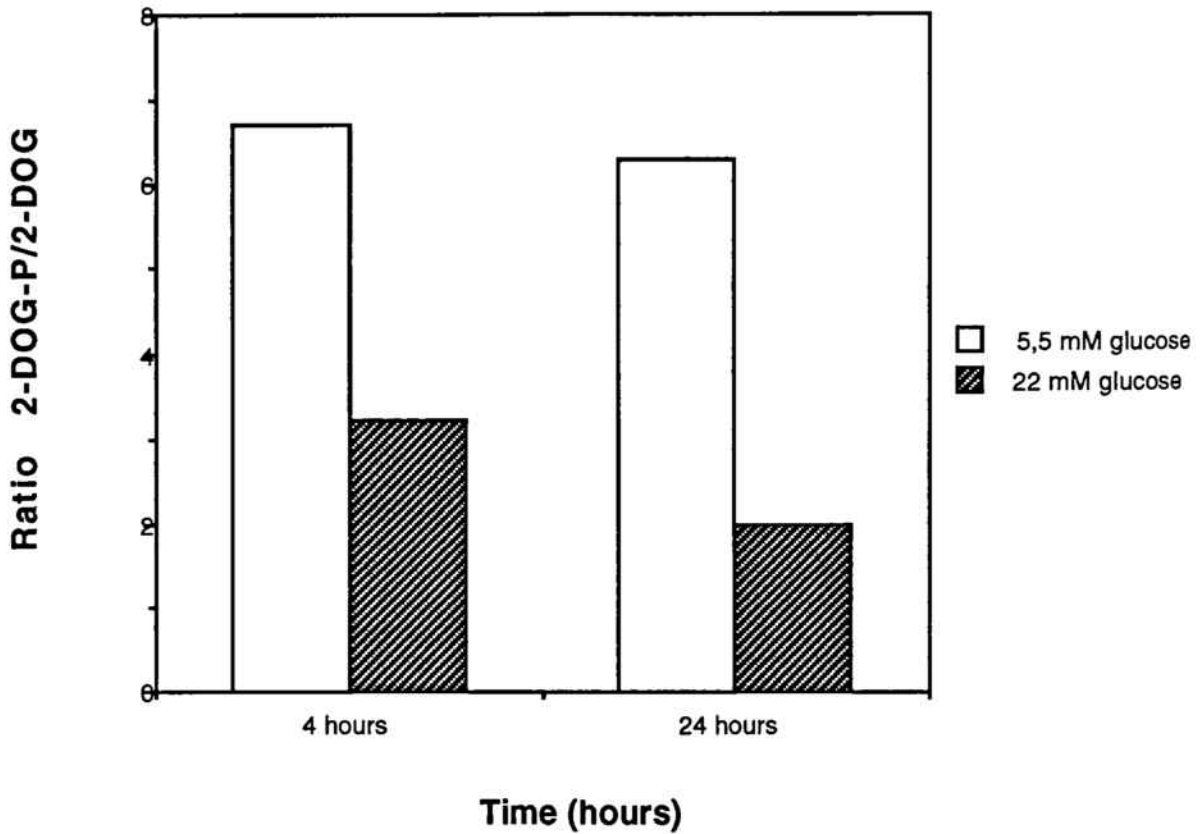


Figura 18: Utilitzant les dades obtingudes en l'experiment anterior, es va calcular el cocient entre la 2-deoxiglucosa fosforilada i la lliure per a cada un dels temps assajats (4 i 24 hores), i per a les cèl.lules tractades amb 5,5 o 22 mM glucosa.

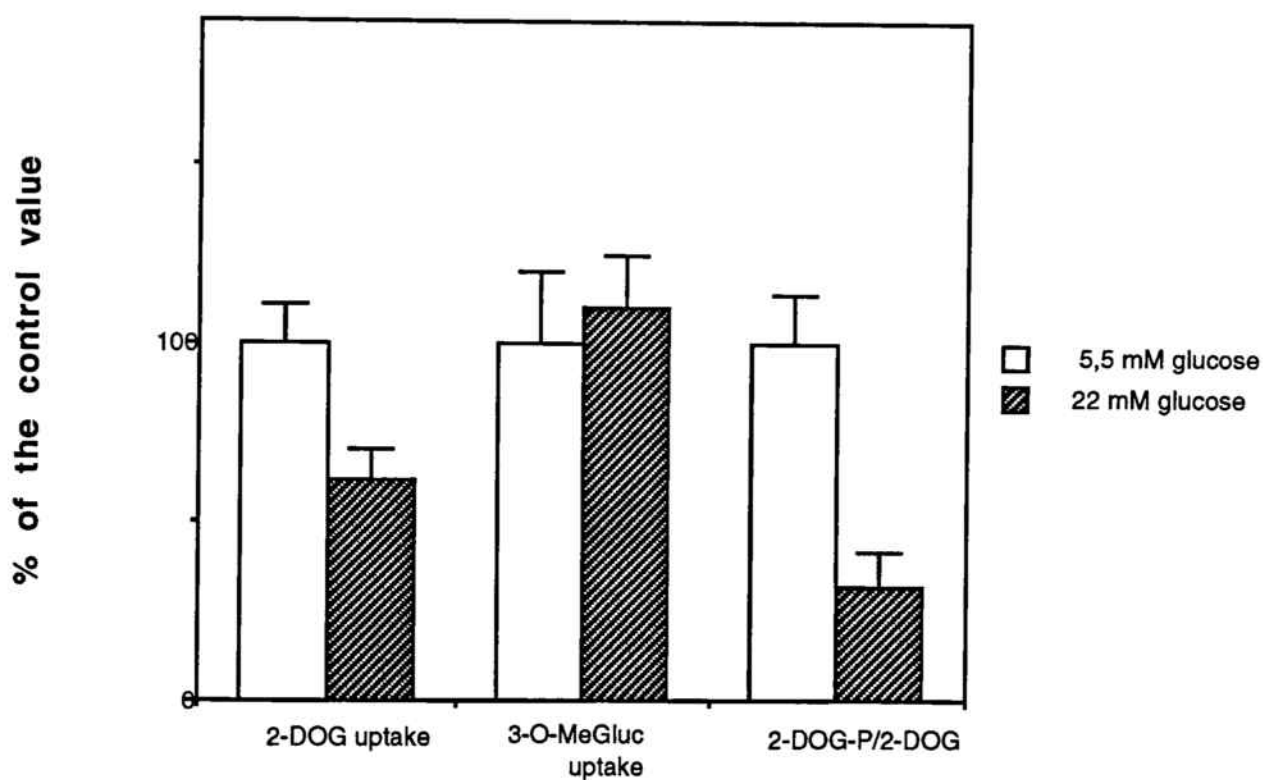


Figura 19: Gràfica resum, en la que es mostren els resultats obtinguts amb cèl.lules ECV304 preincubades al llarg de 24 hores en un medi DMEM sense sèrum amb 5,5 o 22 mM glucosa, després de valorar la captació de 2-deoxiglucosa, la captació de 3-O-metilglucosa (mitjana dels valors obtinguts a la Figura 16 a 30 segons), i la el cocient 2-deoxiglucosa fosforilada respecte a la lliure. Es mostren la mitjana i l'error estàndard de com a mínim tres experiments de cada valoració, expressant els resultats com a % del valor obtingut amb les cèl.lules preincubades en medi 5,5 mM glucosa.

CAPITOL 2

EXPRESSIO DE TRANSPORTADORS DE GLUCOSA DE TIPUS GLUT A LES CEL·LULES MUSCULARS SOL8. EFECTE DE LA INSULINA I DE LA WORTMANINA.

El múscul esquelètic, degut a que representa un 40% de la massa total del cos, és el principal responsable de l'aclariment de glucosa de la sang que té lloc en resposta a la insulina. En aquest procés s'ha demostrat que és limitant el transport de glucosa a través de la membrana plasmàtica, mitjançant en aquest teixit per dues isoformes de la família GLUT, GLUT1, responsable del transport basal de glucosa, i GLUT4, responsable del transport estimulat per la insulina (Zorzano i col., 1996). Donada la importància que té el múscul esquelètic en la utilització de glucosa, i a que s'han descrit deficiències en el transport de glucosa en pacients diabètics de tipus II, el nostre grup ha estat interessat en els darrers anys en l'estudi de l'expressió i regulació dels transportadors de glucosa en diferents situacions "in vivo" en aquest teixit. Així, s'ha estudiat l'efecte del dejuni i de la diabetis induïda per estreptozotocina (Camps i col., 1992), la seva localització subcel·lular dins de la fibra esquelètica i com es regula per la insulina (Muñoz i col., 1995, 1996; Zorzano i col., 1996). Per un altre costat, també s'ha estudiat com es regula l'expressió dels transportadors pel desenvolupament. Així, s'ha demostrat que GLUT1 és el transportador predominant en l'estat fetal i que disminueix la seva expressió amb el desenvolupament (Santalucía i col., 1992). Pel contrari, GLUT4 incrementa la seva expressió al llarg de l'ontogènia, acabant sent el transportador predominant en la vida adulta (Santalucía i col., 1992). En aquest procés de regulació al llarg del desenvolupament s'ha demostrat que podrien estar implicats factors hormonals, com les hormones tiroïdals (Castelló i col., 1994), i l'activitat contràctil dependent de la innervació (Castelló i col., 1993). L'interès del nostre grup en continuar estudiant els mecanismes que condueixen a aquesta regulació dels transportadors de glucosa en el múscul esquelètic, ens va portar a buscar models cel·lulars musculars en cultiu, que poguessin mimetitzar la regulació que es dona en el múscul de l'animal "in vivo" en quant als transportadors de glucosa.

Amb aquest objectiu, vàrem analitzar una sèrie de línies de cèl·lules musculars com a possibles candidates per aquest tipus d'estudi. Les línies cel·lulars de múscul esquelètic proliferen en forma de cèl·lules fibroblàstiques, el que anomenem mio blasts, ja que tenen la particularitat d'expressar algun factor que les fa capaces de, en les condicions adequades de factors de creixement en el medi de cultiu (concretament, baix contingut de sèrum), poder

diferenciar i fusionar-se, formant grans cèl·lules, els miotubs, amb característiques morfològiques i bioquímiques més semblants a les del múscul adult. Pel contrari, les cèl·lules musculars en el seu estat de mioblast tenen característiques bioquímiques més semblants a les del múscul fetal. Els factors que permeten la determinació del mioblast per a poder diferenciar-se cap a miotub (i que el diferencien d'un fibroblast normal, que mai podrà diferenciar-se) pertanyen a una família de factors de transcripció coneguda com la família MyoD, de la que formen part els factors MyoD, Myf5, miogenina i Mrf4 (Olson i Klein, 1994).

2.1 CARACTERITZACIO DEL TRANSPORT DE GLUCOSA I DE L'EXPRESSIO DE TRANSPORTADORS DE GLUCOSA A LES CEL·LULES SOL8. EFECTE DE LA INSULINA.

En aquest capítol exposarem els resultats obtinguts d'analitzar la línia cel·lular Sol8, obtinguda a partir del múscul "soleus" de ratolí (Mulle i col., 1988). En primer lloc, varem analitzar l'expressió de diferents factors miogènics en aquesta línia cel·lular al llarg de la diferenciació. Es va obtenir RNA procedent de cèl·lules de dia 0 (estat de mioblast) i de diferents dies després d'haver-les canviat a un medi pobre en factors de creixement. Varem arribar fins a 7 dies després del canvi de medi, moment en que la diferenciació va ser la màxima assolida. Amb l'RNA obtingut es va realitzar un assaig de "northern blot" per als diferents factors estudiats: Miogenina, MyoD, Id i Myf5. Com es pot observa a la Fig.20, tots aquests factors ja s'expressaven en l'estat de mioblasts, però mentre que l'expressió de miogenina i MyoD es mantenia al llarg de tot el procés de diferenciació, l'expressió tant de Id com de Myf5 disminuïa, especialment i com era d'esperar la d'Id, que ja es reduïa molt als 4 dies del canvi de medi.

A continuació es va passar a estudiar l'expressió de transportadors de glucosa de tipus GLUT. Amb aquest objectiu es va analitzar mitjançant "northern blot" la presència o no de diferents transportadors. Com es pot observar a la Fig.21, en l'estat de mioblast l'únic transportador expressat és GLUT1. No s'expressen ni GLUT4 (resultat esperat, ja que es tractava d'un estat més semblant al fetal) ni GLUT3, a diferència del que té lloc en altres models cel·lular, com ja veurem. Amb la diferenciació GLUT1 es manté constant, sense canvis en la quantitat d'mRNA, mentre que GLUT4 comença a expressar-se, arribant a valors màxims d'expressió en el dia 7 de diferenciació.

Expressió de factors miogènics en cèl.lules Sol8

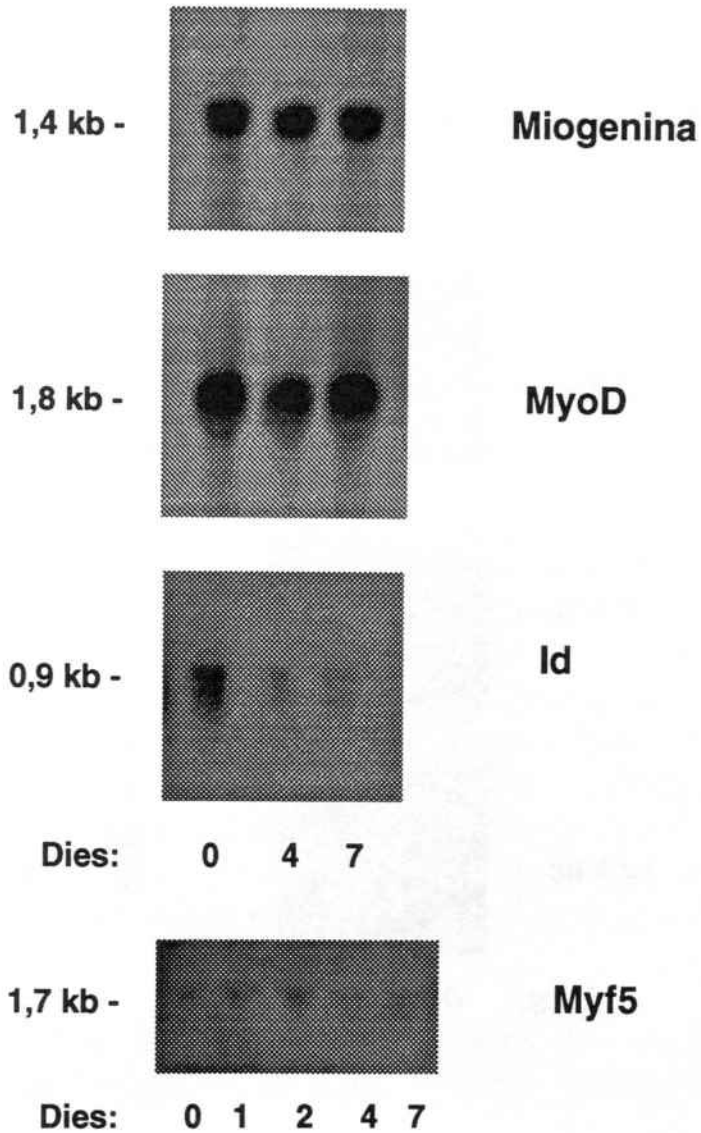


Figura 20: Es va obtenir RNA procedent de cèl.lules Sol8 en l'estat de mioblasts (0 dies), o de cèl.lules mantingudes en medi de diferenciació al llarg dels temps indicats (1, 2, 4 o 7 dies). Es van córrer 25 µg de cada mostra i es va procedir a realitzar un assaig de "northern blot", utilitzant les sondes corresponents a la miogenina, MyoD, Id i Myf5. Es mostra l' autoradiografia d'un experiment representatiu.

Expressió de transportadors de glucosa en cèl.lules Sol8

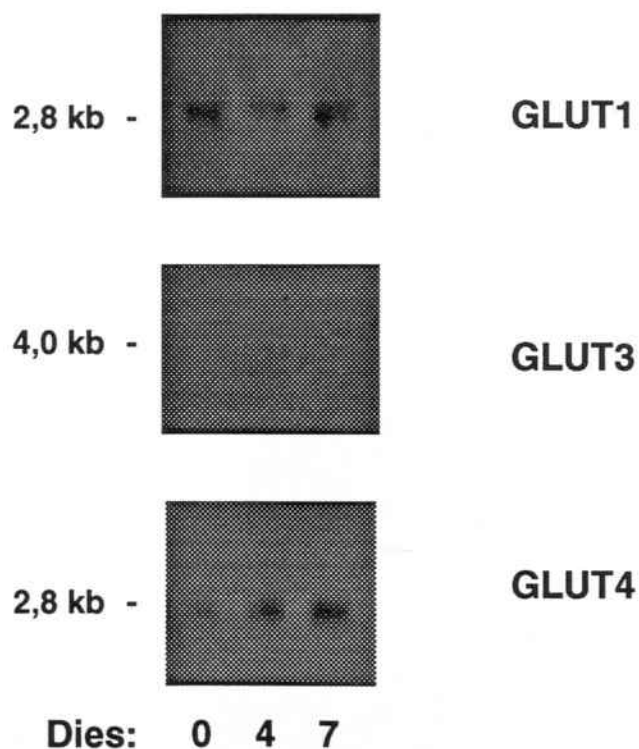


Figura 21: Es va obtenir RNA de cèl.lules Sol8 en estat de mioblast (0 dies) o en estat de miotubs de 4 o 7 dies de diferenciació. Amb 25 μg d'aquestes mostres es van realitzar assajos de "northern blot" amb sondes específiques per als transportadors de glucosa de tipus GLUT1, GLUT3 i GLUT4. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

De manera anàloga es va analitzar la presència de la proteïna per als dos transportadors dels que havíem detectat mRNA, GLUT1 i GLUT4. Es van aïllar membranes totals procedents de cèl·lules Sol8 a diferents dies de diferenciació i es va procedir a realitzar un assaig de "western blot". Com es pot observar a la Fig.22, la proteïna GLUT1 disminueix la seva presència a mesura que incrementa la diferenciació. Per a GLUT4 el patró és completament oposat. Així, és completament absent en l'estat de mioblast i va incrementant la seva presència fins a arribar a un màxim en el dia 7 després del canvi de medi.

Després d'haver analitzat els transportadors de glucosa des del punt de vista de l'expressió d'mRNA i de proteïna, vàrem passar a estudiar la seva funció, és a dir, el transport de glucosa. Es van agafar mioblasts i miotubs de 7 dies, i es va analitzar la capacitat de captar 2-DOG. A l'igual que en el cas de les cèl·lules ECV304, les Sol8 en tots dos estadis podien captar 2-DOG de manera lineal en el temps fins, al menys, els 10 minuts, i aquesta captació era totalment inhibible per la presència de citocalassina B. Com es pot veure a la Fig.23, la captació basal de 2-DOG disminuïa amb la diferenciació, el que està d'acord amb una disminució en la quantitat del transportador responsable del transport basal, GLUT1. Per un altre costat, quan vàrem analitzar l'efecte d'una concentració supramàxima d'insulina, 1 μ M, al llarg d'una hora abans de fer l'experiment de captació, s'observa que tant en el cas dels mioblasts com en el dels miotubs es donava una estimulació (78% en el cas dels mioblasts, 63% en el cas dels miotubs). En tots dos casos es tracta d'una estimulació petita, però similar a la trobada pel grup d'Amira Klip en miotubs L6 (Mitsumoto i col., 1991). Però cal destacar que l'efecte trobat en cèl·lules Sol8 tant en mioblasts com en miotubs és exactament el mateix, el que no es dona en cèl·lules L6.

2.2. EFECTE DE LA WORTMANINA SOBRE EL TRANSPORT DE GLUCOSA I LA DISTRIBUCIO SUBCEL·LULAR DE GLUT1.

S'havia descrit que l'acció de la insulina estimulava el transport de glucosa tant en cèl·lules en cultiu CHO (Hara i col., 1994) i adipòcits 3T3-L1 (Clarke i col., 1994; Cheatham i col., 1994; Herbst i col., 1995; Kotani i col., 1995), com en adipòcits aïllats de rata, era depenent de l'acció de l'enzim fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Aquest enzim fosforila els fosfatidilinositols en la posició 3', generant PI(3)P, PI(3,4)P₂ i PI(3,4,5)P₃, que actuarien com a segons missatgers, encara que no es coneixen els mecanismes pels que ho fan. S'han descrit diferents isoformes de la PI3K: la més caracteritzada i que s'ha implicat en l'acció de la insulina és un heterodímer format per una subunitat

Expressió de transportadors de glucosa en cèl.lules Sol8

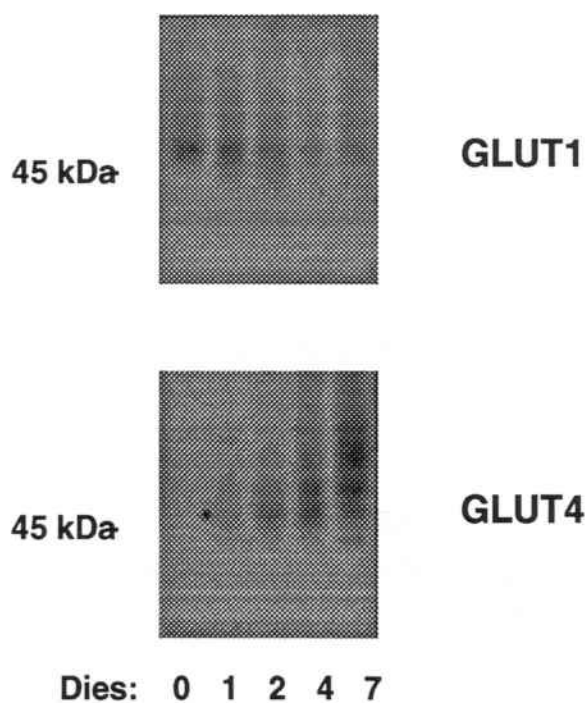


Figura 22: Es van obtenir preparacions de membranes totals de mioblasts Sol8 (dia 0) o miotubs d' 1, 2, 4 i 7 dies després de passar a medi de diferenciació. Es van córrer 15 µg de cada una de les mostres en un gel del 10% de poliacrilamida, i es va procedir a realitzar un assaig de "western blot" utilitzant anticossos específics contra les proteïnes GLUT1 i GLUT4. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

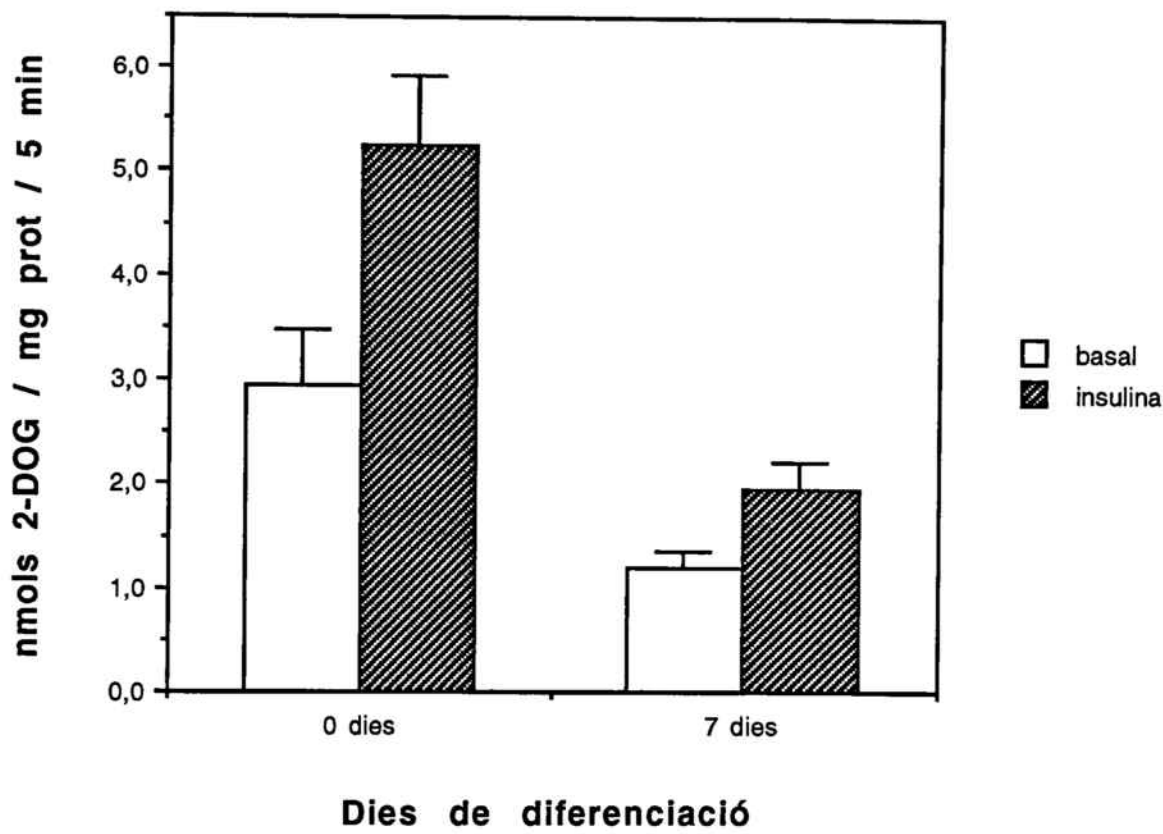


Figura 23: Cèl.lules Sol8 en l'estat de mioblast (0 dies de diferenciació), o de miotub (7 dies després de canviar el medi) es van preincubar al llarg de dues hores i mitja en DMEM complet sense sèrum i amb un 0,2% d'albumina. La darrera mitja hora de preincubació es va afegir o no en el medi insulina 1 μ M (grup insulina o basal, respectivament). Passat aquest temps, es va realitzar un assaig de captació de 2-deoxiglucosa utilitzant exactament el mateix protocol descrit en la Figura 2, però realitzant la incubació només al llarg de cinc minuts. A continuació es va procedir a comptar la radioactivitat internalitzada i es va corregir per la quantitat de proteïna de la mostra. Es mostra la mitjana i error estàndard de tres experiments, en cada un obtingut cada punt per duplicat.

catalítica de 110 kDa (p110), i una subunitat reguladora de 85 kDa. Aquesta última interacciona amb les fosfotirosines del receptor de la insulina o del principal substrat del receptor, IRS1, mitjançant zones SH2 d'unió a fosfotirosines. Però se n'han descrit altres, com una isoforma de llevat (Vps34), implicada en el tràfic de proteïnes a les vacuoles i de les que s'ha descrit darrerament una isoforma en humans, i una altra isoforma de mamífers que és activada per les subunitats $\beta\sigma$ de les proteïnes G. Una eina que ha resultat molt important en l'estudi de l'acció de la PI3K ha estat la descripció de diferents inhibidors, especialment la wortmanina i el LY294002. Aquests inhibidors són específics per a la PI3K a dosis baixes (1-100 nM en el cas de la wortmanina), mentre que a altes dosis (1 μ M per a la wortmanina) poden afectar també a altres quinases.

Donat que s'havia descrit la inhibició de l'estimulació per la insulina del transport de glucosa, en altres models cel·lulars, per part de la wortmanina, ens vam proposar estudiar si passaria el mateix en l'acció de la insulina que havíem trobat tant en els mioblasts com en els miotubs. Amb aquest objectiu es van incubar tant mioblasts Sol8 (resultats mostrats a la Fig.24) com miotubs de 7 dies (resultats mostrats a la Fig.25) sense o amb dues dosis de wortmanina (100 i 1000 nM) al llarg d'una hora i mitja abans de realitzar l'experiment de captació. 30 minuts després d'haver afegit la wortmanina es va afegir en el medi o no insulina 1 μ M. Finalitzat aquest temps, es van rentar les cèl·lules i es va passar a mesurar la captació de 2-DOG al llarg de 5 minuts. Com es pot observar a la Fig.24, la presència de wortmanina en el medi provocava una disminució en l'acció de la insulina sobre la captació per part dels mioblasts de forma dosi dependent, de manera que a 1 μ M ja no teníem cap efecte de la insulina. Per un altre costat, cal destacar que la presència de l'inhibidor provocava una disminució en la captació basal de 2-DOG també dosi dependent. En el cas dels miotubs de 7 dies (Fig.25), l'efecte observat de la wortmanina era exactament el mateix, tant pel que fa a la captació basal com pel que fa a la captació estimulada per la insulina.

Per tal d'intentar evidenciar quins eren els mecanismes implicats en la caiguda de la captació basal de 2-DOG en els mioblasts, es van realitzar experiments d'immunofluorescència. Es van sembrar cèl·lules Sol8 sobre cubres de vidre, es van fer créixer, i a continuació es va realitzar exactament el mateix protocol d'incubació amb wortmanina i amb insulina que en el cas dels experiments anteriors: 1 hora i mitja d'acció de la wortmanina i 1 hora d'acció de la insulina. Passat aquest temps, es van fixar els cubres amb metanol i es va passar a detectar mitjançant anticossos específics GLUT1, β 1-integrina i la subunitat α 1 de la Na^+ - K^+ -ATPasa (tots dos com a marcadors de membrana

Efecte de la wortmanina en mioblasts Sol8

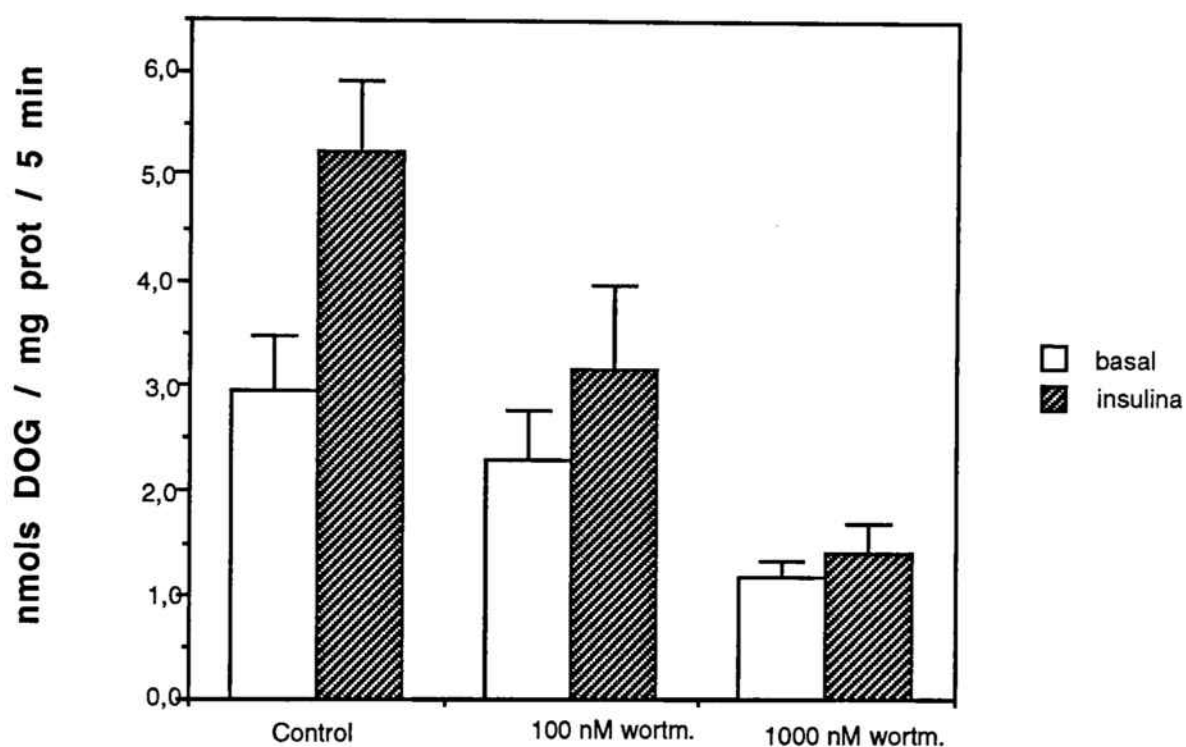


Figura 24: Cèl.lules Sol8 en l'estat de mioblast es van preincubar al llarg de 2 hores i mitja en un medi DMEM complet sense sèrum i amb un 0,2% d'albumina. Una hora abans d'acabar la preincubació es va afegir o no (grup control) wortmanina en les concentracions indicades, i mitja hora després, insulina 1 μ M (grup insulina) o sense (basal). Passat aquest temps, es van rentar les cèl.lules i es va procedir a assajar la captació de 2-deoxiglucosa al llarg de cinc minuts.

Efecte de la wortmanina en miotubs Sol8 de 7 dies

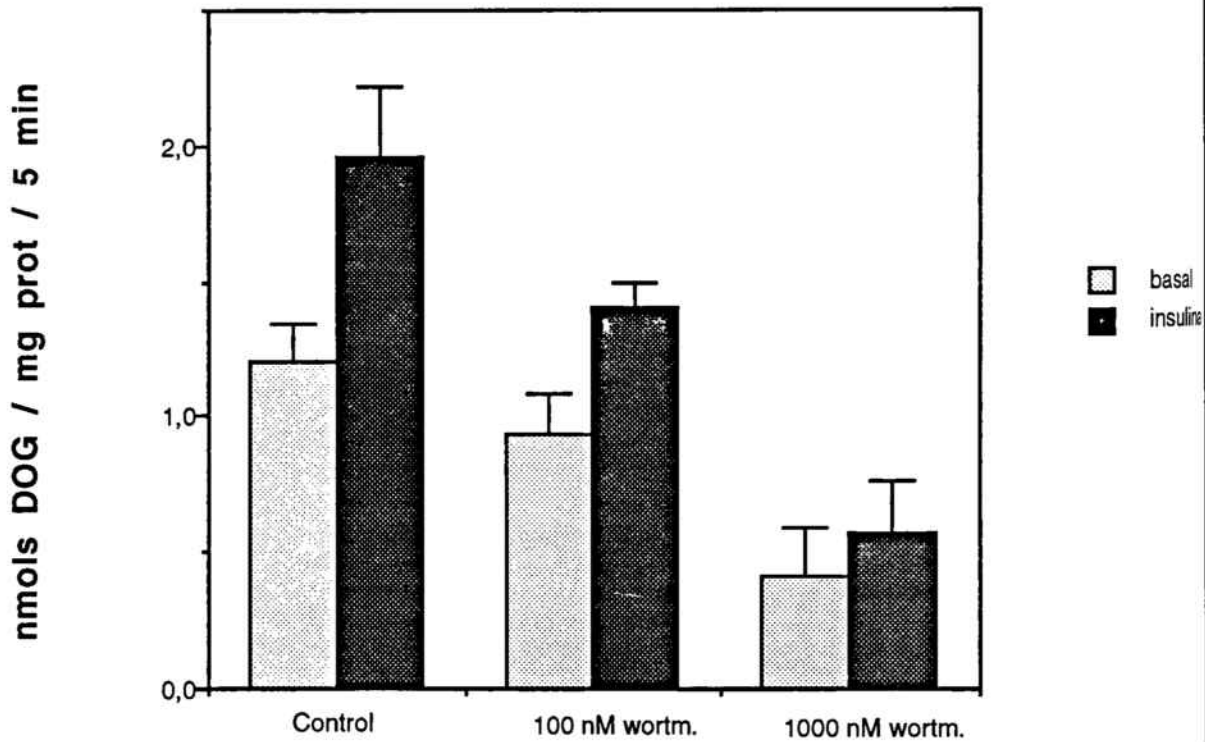


Figura 25: Es va realitzar exactament el mateix experiment que en la Figura 24, però utilitzant cèl.lules Sol8 en el setè dia de diferenciació.

plasmàtica). Com es pot observar a la Fig.26, GLUT1 es localitzava en els mioblats Sol8 dins de la cèl.lula, en una localització perinuclear i amb un patró de distribució marcant tota la cèl.lula, indicatiu de marcatge a membrana plasmàtica. Quan incubàvem les cèl.lules amb wortmanina, tant 100 nM com 1 μ M, el patró canviava radicalment. Així, ara trobàvem GLUT1 només dins de la cèl.lula, en una localització perinuclear que podria correspondre a reticle endoplàsmic. Quan s'incubaven les cèl.lules amb insulina, no podiem detectar cap modificació en la distribució basal del transportador, però en presència a més de wortmanina, el patró també canviava de manera anàloga al que passava en absència d'insulina. Per tant, l'efecte de la wortmanina disminuint la captació basal de glucosa era degut a una disminució en la presència del transportador GLUT1 a la membrana plasmàtica, modificació causada, molt probablement, per una disminució en la taxa d'exocitosi del transportador cap a la membrana plasmàtica. A més, aquest efecte era específic, ja que a l'analitzar el patró de distribució per als dos altres marcadors de membrana plasmàtica, la β 1-integrina i la subunitat α 1 de la Na^+ - K^+ -ATPasa, no trobàvem cap modificació per la presència de wortmanina (Fig.27).

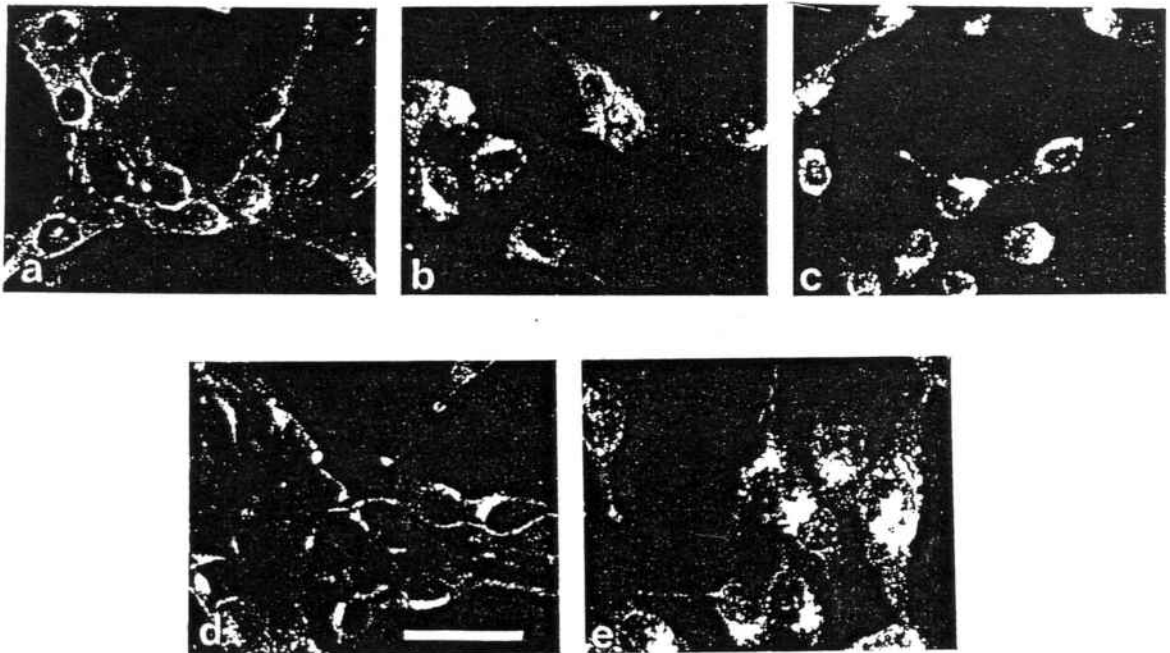


Figura 26: Es van fer créixer cèl.lules Sol8 sobre cubres de vidre estèrils. Dos dies després de la sembra es van preincubar al llarg de dues hores i mitja en medi DMEM complet i sense sèrum, amb un 0,2% d'albúmina. A la darrera hora de la incubació es va afegir o no wortmanina (sense als requadres a i d; wortmanina 100 nM al requadre b; i wortmanina 1000 nM als requadres c i e). Mitja hora abans d'acabar la incubació es va afegir (requadres d i e) o no (requadres a, b i c) insulina 1 μ M. Passada la incubació, es va procedir a rentar les cèl.lules i a fixar-les amb metanol. Posteriorment es va realitzar la detecció de GLUT1 mitjançant la utilització d'un anticòs específic i de tècniques d'immunofluorescència (veure secció de Materials i Mètodes).

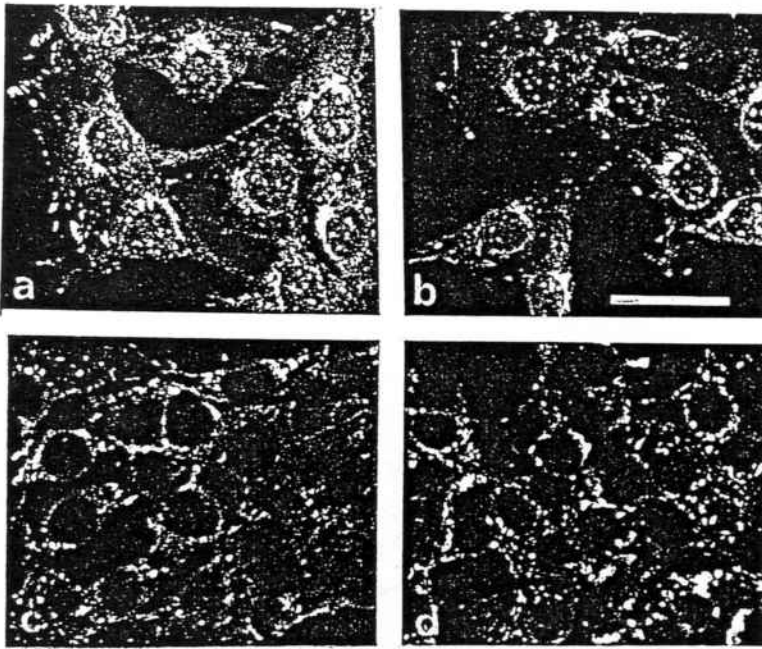


Figura 27: Mioblasts Sol8 es van preincubar al llarg de dues hores i mitja en un medi DMEM sense sèrum i contenint un 0,2% d'albúmina. Es va afegir wortmanina (requadres b i d) $1 \mu\text{M}$ o no (requadres a i c) al llarg de la darrera hora d'incubació. A continuació es van fixar les cèl.lules amb metanol i es va procedir a detectar la $\beta 1$ -integrina (requadres c i d) i la subunitat $\alpha 1$ de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPasa}$ (requadres a i b) per immunofluorescència.

CAPITOL 3

REGULACIO DE L'EXPRESSIO DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT1 A CEL·LULES MUSCULARS L6E9. EFECTE DE LA DIFERENCIACIO I DE L'AMPc.

Com ja hem comentat en el capítol anterior, el principal objectiu que ens havíem plantejat a l'hora d'iniciar els estudis amb cèl·lules musculars, era trobar un bon model cel·lular en cultiu que ens permetés abordar més fàcilment l'estudi dels mecanismes implicats en la regulació dels transportadors GLUT1 i GLUT4 a múscul esquelètic. Les cèl·lules Sol8 hem vist que representaven un bon model per a determinats tipus d'estudi, ja que mimetitzen el comportament del múscul de l'animal, en quant a que només expressen GLUT1 i GLUT4, i en que el patró d'expressió de les proteïnes és el mateix que l'observat "in vivo". Però en quant a l'mRNA, aquestes cèl·lules tenen un comportament diferent que l'observat "in vivo", ja que l'mRNA per a GLUT1 no cau amb la diferenciació, com esperariem. Això les descartava en quan a ser centre de l'estudi encaminat a estudiar els factors implicats en la repressió de l'expressió de GLUT1 amb la diferenciació. Calia, doncs, buscar un altre model muscular en que sí es donés la repressió de GLUT1.

Coneixiem el treball realitzat pel grup de la Dra. Amira Klip, a Toronto, amb la línia cel·lular L6, que havien caracteritzat àmpliament des del punt de vista del transport i transportadors de glucosa (Sargeant i col., 1993). Aquestes cèl·lules havien estat obtingudes a partir de cultius primaris de cèl·lules de múscul de la cuixa de rata (Yaffe, 1968), també es diferencien en les condicions apropiades de baix contingut de factors de creixement formant llargs miotubs multinucleats, miotubs que retenen moltes de les característiques del múscul esquelètic de l'animal adult. El grup de la Dra. Klip havia vist que aquestes cèl·lules expressaven GLUT1 en l'estadi de mioblast, però també GLUT3 (absent del múscul de l'animal, tant fetal com adult) (Sargeant i col., 1993). Amb la diferenciació, aquestes cèl·lules disminuien el seu contingut en GLUT1 i GLUT3, i començaven a expressar GLUT4, incrementant llavors l'acció de la insulina estimulant el transport de glucosa (Mitsumoto i col., 1991). Amb aquest antecedents, vàrem decidir estudiar la línia muscular L6E9, obtinguda per Nadal Ginard com un subclon de les L6 (Nadal Ginard, 1978).

3.1 EXPRESSIO DELS TRANSPORTADORS DE GLUCOSA EN CEL·LULES L6E9. EFECTE DE LA DIFERENCIACIO, DE LA INSULINA I DE L'AMPc.

En primer lloc, i a l'igual que el realitzat per a les cèl.lules Sol8, vàrem caracteritzar l'expressió de factors miogènics en aquestes cèl.lules. Amb aquest objectiu es va realitzar un "norther blot" amb mostres procedents de cèl.lules L6E9 diferenciades al llarg de diferents dies. Com es pot observar a la Fig.28, aquestes cèl.lules expressaven molt poc MyoD a l'estat de mioblast, però induïen la seva expressió amb la diferenciació, encara que en una molt baixa quantitat. Pel contrari, sí expressaven ja en l'estat de mioblast Myf5, factor del que queia l'expressió al llarg dels dies en medi pobre en factors de creixement. En el cas de la miogenina s'observava el patró invers: baixa expressió en l'estat no diferenciat i inducció al llarg de la diferenciació. En aquestes cèl.lules no vàrem poder detectar la presència de cap transcrit per al factor repressor de la diferenciació Id.

El següent pas va ser estudiar l'expressió dels transportadors de glucosa de la família GLUT en aquestes cèl.lules al llarg de la diferenciació. A la Fig.29 mostrem els "northerns blots" corresponents a l'expressió de GLUT1, GLUT4 i GLUT3 al llarg de diferents dies després del canvi a un medi pobre en factors de creixement. Com es pot observar, l'expressió de GLUT1 queia ràpidament, assolint valors d'expressió mínims en el dia 4 de diferenciació. El resultat de la quantificació dels "northerns" indicava una caiguda del 43% ja el primer dia de diferenciació (valor arbitrari de 100 pel valor de mioblasts, 57 per miotubs d'un dia de diferenciació, de 34 per a 4 dies, i de 31 per a 7 dies). Pel contrari, GLUT4 començava a expressar-se paulatinament, arribant a un màxim l'expressió mesurada en el dia 7. A més d'aquests dos transportadors, i com en el cas de les L6, també s'expressa GLUT3, transportador que a l'igual que GLUT1 disminueix la seva expressió amb la diferenciació. Per tant, en aquest cas sí ens trobavem davant d'un bon model per estudiar els mecanismes implicats en la regulació de GLUT1.

A continuació ens vàrem plantejar si la regulació en l'expressió de GLUT1 es donava també per altres factors que es coneixia que l'afectaven en altres models cel·lulars. Així, vam analitzar l'efecte de l'exposició crònica a AMPc i a insulina, tractaments tots dos que incrementen l'expressió d'aquest transportador de glucosa a adipòcits 3T3-L1 (García de Herreros i Birnbaum, 1989; Kaestner i col., 1991). Es van tractar tant mioblasts com miotubs de 4 dies de diferenciació amb una dosi d'1 μ M d'insulina al llarg de 24 hores, i amb una dosi d'1 mM de l'anàleg de l'AMPc 8-bromo-AMPc (8-Br-AMPc) al

Expressió de factors miogènics en cèl.lules L6E9

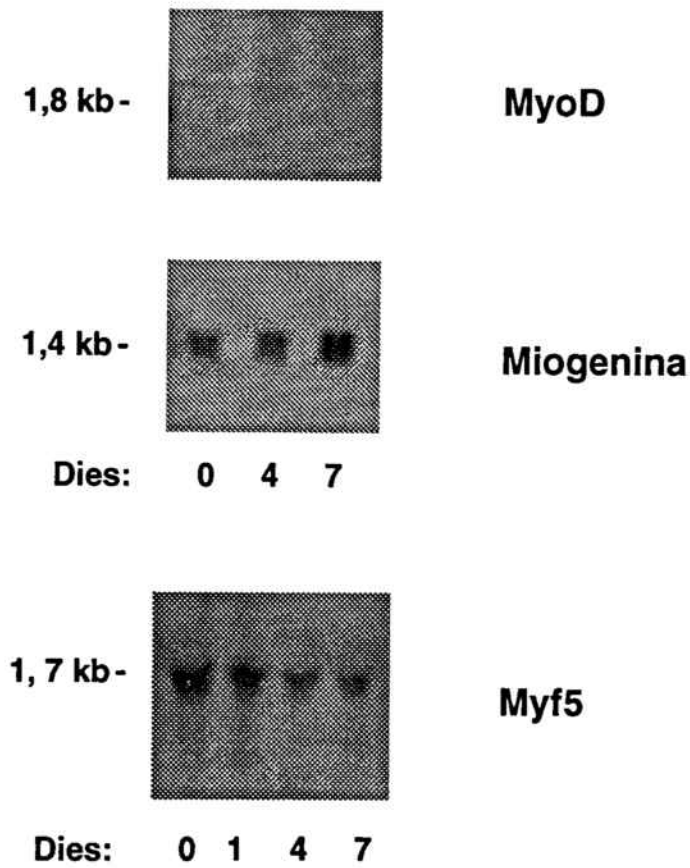


Figura 28: Es va obtenir RNA de cèl.lules L6E9 en l'estadi de mioblast (0 dies de diferenciació) o després d'1, 4 i 7 dies en medi de diferenciació. A continuació es van córrer 25 µg d'RNA de cada mostra en un gel d'agarosa i es va procedir a detectar MyoD, miogenina i Myf5 mitjançant "northern blot". Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

Expressió de transportadors de glucosa en cèl.lules L6E9

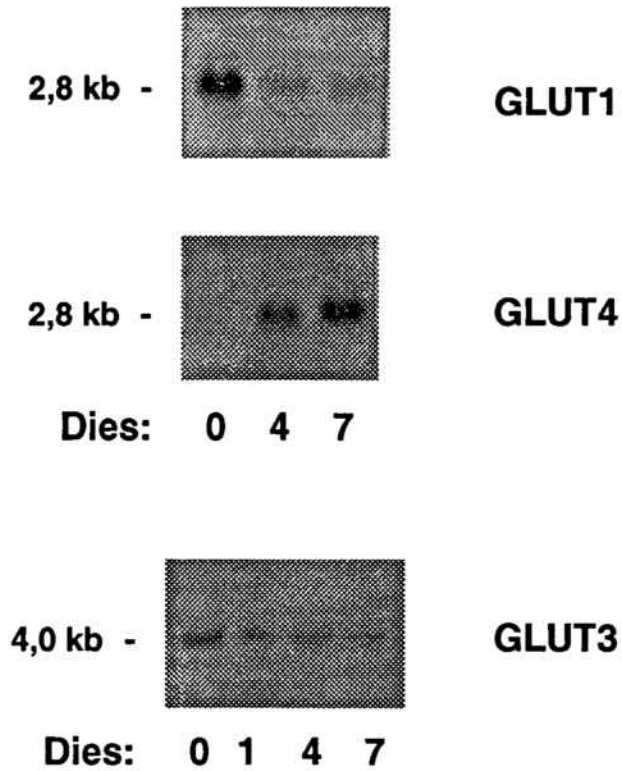


Figura 29: Es van córrer 25 µg d'RNA procedent de cèl.lules L6E9 en l'estat de mioblast (0 dies) o en l'estat de miotub d'1, 4 i 7 dies de diferenciació. A continuació es van realitzar assajos de "northern blot" amb sondes específiques per als transportadors de glucosa GLUT1, GLUT3 i GLUT4. Es mostra el resultat obtingut en un experiment representatiu.

llarg de 48 hores. A l'acabar el tractament, es va obtenir RNA de les cèl·lules i es va realitzar un assaig de "northern blot". Com es pot observar a la Fig.30, tant el 8-Br-AMPC com la insulina incrementen la quantitat d'mRNA per a GLUT1 (un $222 \pm 16\%$ en el cas del 8-Br-AMPC i un $402 \pm 28\%$ en el cas de la insulina). En canvi, en el cas dels miotubs només vàrem trobar un petit increment ($140 \pm 4\%$) en el cas dels exposats 24 hores a insulina, sense cap canvi en el cas dels exposats 48 hores a 8-Br-AMPC. Per tant, les cèl·lules L6E9 semblaven un bon model per a l'estudi de la regulació del gen de GLUT1, tant pel que fa als factors implicats en la diferenciació, com pel que fa als factors implicats en la resposta a hormones, com la insulina i l'AMPC.

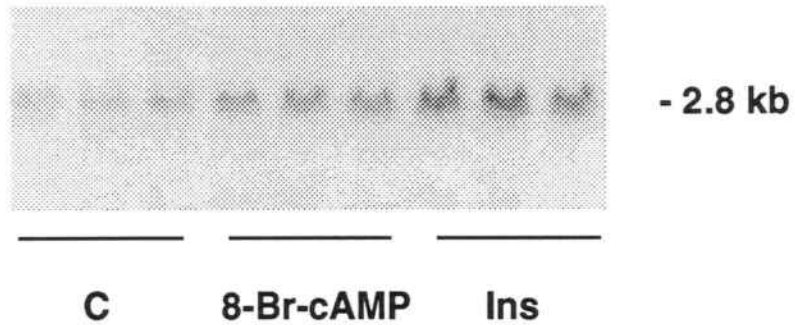
La modificació en la quantitat de l'mRNA per a GLUT1 podia ser efecte d'una modificació en l'activitat transcripcional, o bé, modificació de la vida mitjana de l'mRNA. Per tal de veure si es tractava d'aquest darrer efecte, es va realitzar el següent experiment: es van incubar mioblasts o miotubs de 4 dies de diferenciació amb una concentració de $5 \mu\text{g/ml}$ d'actinomicina D en el medi, un conegut inhibidor de la síntesi d'RNA. A diferents temps després de l'addició de l'actinomicina D es va obtenir RNA i va quantificar la quantitat de GLUT1 present. El resultat obtingut el mostrem a la Fig.32. A partir d'aquests resultats es pot calcular una vida mitja per l'mRNA de GLUT1 en el cas dels mioblasts i dels miotubs, que va resultar ser d'unes 5 hores, resultats similars als trobats per altres autors en models cel·lulars diferents (2-2,5 hores en el cas de mioblasts L6 (Maher i Harrison, 1990). Per tant, l'efecte de la diferenciació reprimint GLUT1 no es devia a una modificació de la vida mitja de l'mRNA. Calia buscar la resposta a nivell del promotor de GLUT1.

3.2. ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE GLUT1.

L'aproximació clàssica a l'estudi de l'activitat d'un promotor, és lligar-lo a un gen que codifiqui per una activitat enzimàtica fàcil de mesurar i que no estigui present en les cèl·lules a estudiar, l'anomenat gen "reporter". Els més utilitzats són els gens que codifiquen per a la β -galactosidasa (β -GAL) i el que codifica per a la cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Es tracta de gens bacterians, les activitats dels quals no estan presents a les cèl·lules de mamífer. Com s'explica a la part de Materials i Mètodes, per mesurar l'activitat CAT s'utilitza un mètode radioactiu, basat en mesurar la incorporació de grups acetat a cloranfenicol marcat amb ^{14}C , mentre que l'activitat β -GAL es mesura per un mètode colorimètric. Normalment s'utilitza el mètode més sensible (el que valora activitat CAT) lligat al promotor a estudiar, mentre que l'activitat β -GAL

L6E9 Myoblasts

GLUT1 mRNA



Et Br

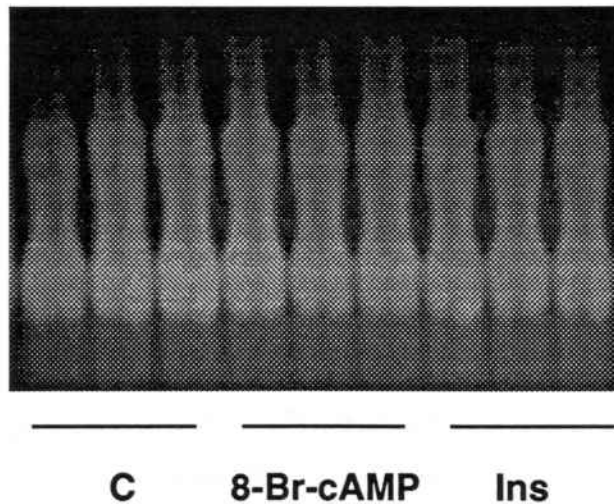
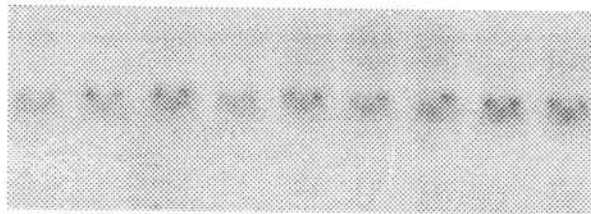


Figura 30: Cèl.lules L6E9 en l'estat de mioblast es van tractar al llarg de 48 hores amb l' anàleg de l'AMPc 8-bromo-AMPc en una concentració d'1 mM, 24 hores amb 1 μ M insulina, o sense cap hormona (grup control, C). A continuació es va obtenir RNA d'aquestes cèl.lules i es va realitzar un assaig de "northern blot" detectant GLUT1. Com a control de la càrrega es mostra la imatge que es va obtenir del bromur d' etidi de la mateixa membrana.

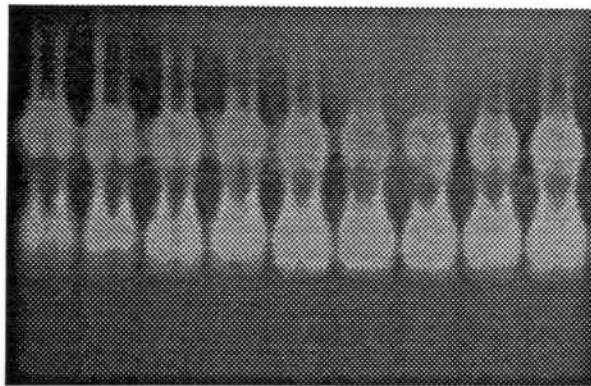
L6E9 Myotubes

GLUT1 mRNA



C 8-Br-cAMP Ins

Et Br



C 8-Br-cAMP Ins

Figura 31: Cèl.lules L6E9 en l'estat de miotubs de 7 dies es van tractar al llarg de 24 hores amb insulina 1 μ M, al llarg de 48 hores amb 8-bromo-AMPC 1 mM, o sense cap hormona (grup control, C). Passats aquests temps es va aïllar RNA d'aquestes mostres i es va realitzar un "northern blot" corrent 25 μ g d'RNA per a cada una, per tal de detectar l'mRNA de GLUT1. Es mostra la imatge del bromur d'etidi obtinguda per a la mateixa membrana utilitzada.

GLUT1 mRNA decay

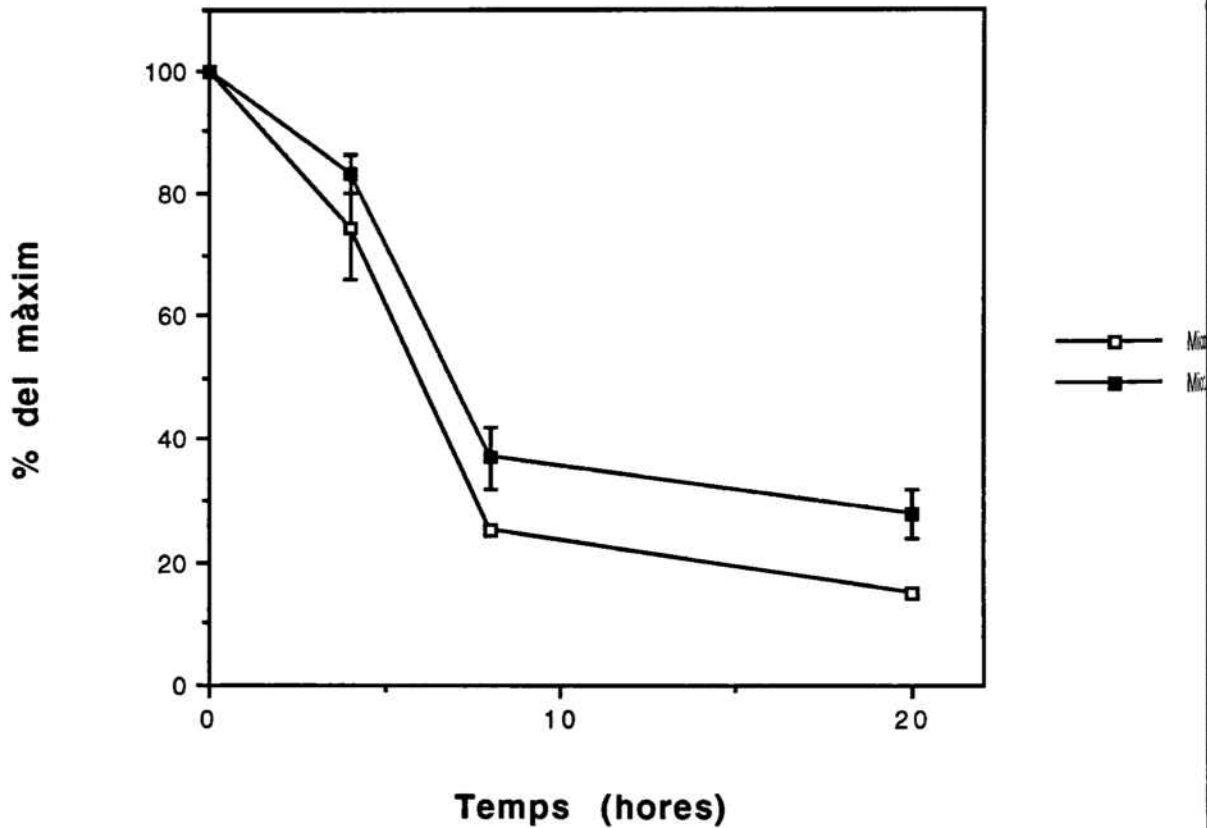


Figura 32: Es van incubar cèl.lules L6E9 en l'estat de mioblast o de miotub de 4 dies de diferenciació, amb una concentració de 5 $\mu\text{g/ml}$ d'actinomicina D al llarg dels temps indicats. Passat aquests temps, es va obtenir RNA de cada un dels punts i es va procedir a realitzar un assaig de "northern blot" corrent 30 μg de cada mostra. Es va quantificar el resultat obtingut mitjançant densitometria, i es va representar com a % del valor obtingut en el temps 0 d'incubació en actinomicina D.

s'utilitza per normalitzar l'activitat obtinguda per l'eficiència de transfecció.

Es va obtenir un troç del promotor de GLUT1 de rata (Williams i Birnbaum, 1988), cedit amablement pel Dr. Morris Birnbaum, de Boston, que contenia 2016 parells de bases de la zona 5'a partir de l'inici de transcripció i 134 parells de bases de la zona 3'a partir també de l'inici de transcripció (veure Fig.33). Utilitzant els enzims de restricció adequats es va subclonar aquest fragment a 5' del gen codificant per a CAT (utilitzant el plasmidi CAT bàsic), per tal d'utilitzar-lo com a índex de l'activitat transcripcional d'aquesta zona. Aquest plasmidi és el que anomenarem G1CAT o -2106/+134. Ara el que calia fer era posar a punt les condicions de transfecció adequades per a les cèl·lules L6E9, de manera que poguessim introduir i expressar els plasmidis desitjats. Per això, es van utilitzar els plasmidis descrits fins el moment, comparant l'activitat obtinguda no transfectant les cèl·lules o amb els plasmidis CAT bàsic o G1CAT. En primer lloc, calia comprovar que les cèl·lules es transfectaven i, a més, que el nostre promotor tenia activitat. Utilitzant el mètode del fosfat càlcic es van transfectar mioblasts L6E9 amb el promotor enganxat a CAT (G1) o amb el vector CAT bàsic, i es va comparar l'activitat CAT obtinguda amb la de cèl·lules no transfectades. El resultat es pot observar a la part esquerra de la Fig.34. Com es pot apreciar, les cèl·lules transfectades havien incorporat el DNA i aquest s'expressava, ja que obteníem activitat CAT. A més, el nostre promotor estava estimulant la transcripció, ja que trobavem una activitat molt més gran que la de cèl·lules transfectades només amb el CAT bàsic.

A continuació vàrem realitzar diferents proves dirigides a optimitzar les condicions de transfecció, utilitzant el vector G1CAT. Així, es va provar el temps que es mantenien les cèl·lules després de l'exposició al precipitat, per tal de veure fins quan podíem mesurar bé l'activitat. Com es pot observar també a la part esquerra de la Fig.34, no es modificava l'activitat CAT trobada entre 48 i 72 hores després de l'exposició al precipitat. En segon lloc, les cèl·lules es transfectaven millor si sembravem una baixa densitat de cèl·lules que si en sembravem una alta quantitat. En tercer lloc, podíem obtenir una millor transfecció amb 10 μg que amb 5 (Fig.35) i, per últim, també trobavem una millor activitat amb 14 hores d'exposició al precipitat que amb només 6. Tots aquests resultats ens van fer triar unes condicions per a la transfecció que van ser les que es van utilitzar al llarg de la majoria d'estudis: 10 μg del plasmidi a assajar, 14 hores d'exposició al precipitat, 72 hores d'incubació després de l'exposició al precipitat i utilitzant cèl·lules sembrades en una baixa densitat.

El primer que vam estudiar va ser l'efecte de la diferenciació sobre l'activitat del troç del promotor de GLUT1 que teníem. Es van transfectar

Efecte de la densitat cel.lular i dels dies post transfecció

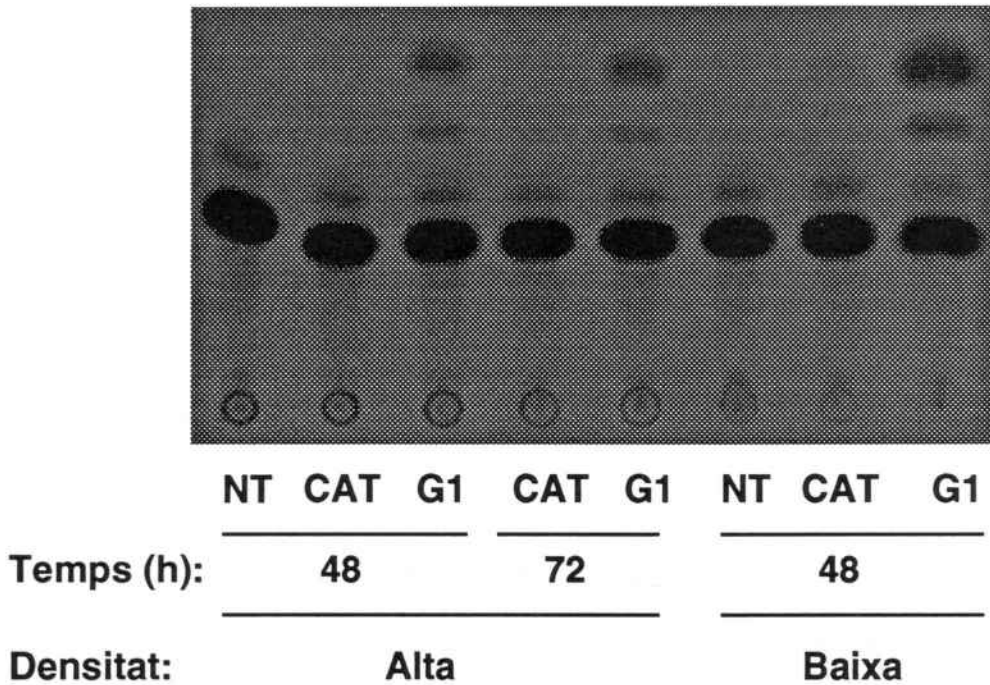
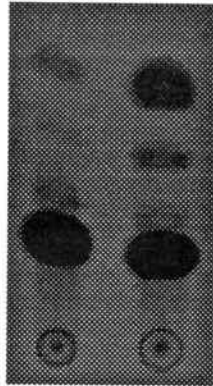


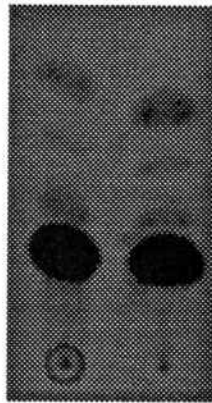
Figura 34: Es van sembrar cèl.lules L6E9 en baixa densitat (500.000 cèl.lules per placa) o en alta densitat (1.000.000 cèl.lules per placa), i dos dies després es van transfectar mitjançant el mètode del fosfat càlcic (veure secció de Materials i Mètodes) amb 40 µg totals de DNA. Es van utilitzar 10 µg dels plasmidis CAT bàsic (CAT) i el troç -2106/+134 del promotor de GLUT1 enganxat al CAT bàsic (G1). Passades 48 o 72 hores després de l'exposició al precipitat, es van arrancar les cèl.lules, es van obtenir extractes citoplasmàtics, i es va passar a valorar l'activitat cloranfenicol acetil transferasa (veure secció de Materials i Mètodes), que es va comparar amb l'activitat obtinguda en cèl.lules no transfectades (NT). Es mostra l' autoradiografia d'un experiment representatiu.

a) **Concentració de DNA**



Concentració (μg): 5 10

b) **Temps d'exposició al precipitat**



Temps (h): 6 14

Figura 35: a) Cèl·lules L6E9, sembrades en una densitat de 500.000 cèl·lules per placa, es van transfectar pel mètode del fosfat càlcic amb 40 μg totals de DNA que contenen 5 o 10 μg del plasmidi amb la seqüència -2106/+134 del promotor lligada al CAT bàsic (-2106/+134G1CAT). Passades 72 hores, es van arrancar les cèl·lules, es van obtenir extractes citoplasmàtics, i es va valorar l'activitat cloranfenicol acetil transferasa. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

b) Es van transfectar cèl·lules L6E9 sembrades en la mateixa densitat que en l'apartat a), amb 40 μg totals de DNA que contenen 10 μg del plasmidi -2106/+134 G1CAT. Es va deixar el precipitat de fosfat càlcic al llarg de 6 o 14 hores, es va rentar, i es va fer el xoc de glicerol. Es va afegir medi complet i es van mantenir al llarg de 72 hores. Passat aquest temps, es van obtenir extractes citoplasmàtics i es va valorar l'activitat cloranfenicol acetil transferasa. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

cèl·lules L6E9 en l'estadi de mioblast, i a continuació es van mantenir en un medi d'alta concentració de sèrum, o es van canviar a un medi pobre en factors de creixement. Al final de les 72 hores d'incubació teniem a les plaques un percentatge significatiu de miotubs a les plaques posades a diferenciar, al voltant d'un 40-50%, i en aquestes condicions, es va mesurar l'activitat CAT. Com es pot observar en la Fig.36, no trobavem grans diferències en l'activitat CAT procedent de cèl·lules no transfectades mioblasts o miotubs, ni en el cas de les transfectades amb el vector CAT bàsic (encara que sempre existia una tendència a baixar en el cas dels miotubs). Però quan mesuràvem l'activitat pel que fa al promotor de GLUT1, trobavem una clara disminució (60%). Semblava, doncs, que en aquesta zona del promotor hi havia la informació en la seqüència responsable de la disminució de l'activitat transcripcional del promotor de GLUT1 amb la diferenciació.

Vàrem realitzar la mateixa aproximació experimental pel que fa a l'AMPc. Es van transfectar mioblasts L6E9 amb el troç sencer de promotor enllaçat a CAT, i 48 hores abans d'arrancar les cèl·lules es van tractar amb una concentració d'1 mM 8-Br-AMPc. El resultat de valorar l'activitat CAT obtinguda, després de normalitzar el resultat per l'activitat β -GAL, es mostra a la part superior de la Fig.39 (la construcció -2106/+134). Com es pot observar, també en aquest cas obteniem el resultat que esperariem del 8-Br-AMPc, és a dir, un increment en l'activitat del promotor de GLUT1. En canvi, quan es va realitzar el mateix en el cas del tractament amb 24 hores amb insulina, no es va detectar cap canvi en l'activitat transcripcional. Semblava, doncs, que aquest troç del promotor contenia la o les seqüències responsables de l'estimulació per l'AMPc, però no per la insulina.

Per tal de mapar més concretament la zona responsable de la repressió en el cas de la diferenciació, o de l'estimulació, en el cas de l'AMPc, es van generar una sèrie de construccions utilitzant enzims de restricció adequats, en les que anàvem tallant la zona a 5'de l'inici de transcripció, mantenint sempre la zona més propera a l'inici de transcripció intacte. Es van utilitzar aquestes construccions per tal d'evaluar la seva activitat CAT basal, i la resultant després d'estimular-les amb 8-Br-AMPc o de diferenciar les cèl·lules a miotubs. Com es pot observar a la Fig.37, a mesura que es van fer deleccions del promotor l'activitat basal es manté, fins el moment en que es va deleccionar la zona entre -812 i -201, en que l'activitat es va incrementar en un 80%. Això indicava que en aquesta zona entre -812 i -201 existiria una zona repressora de l'activitat. Si es deleccionaven 102 parells de bases més (construcció -99) l'activitat queia una mica (entre un 10 i un 20%) respecte l'anterior construcció, però era quan tallàvem la zona entre -99 i -33 quan teniem una caiguda més gran en

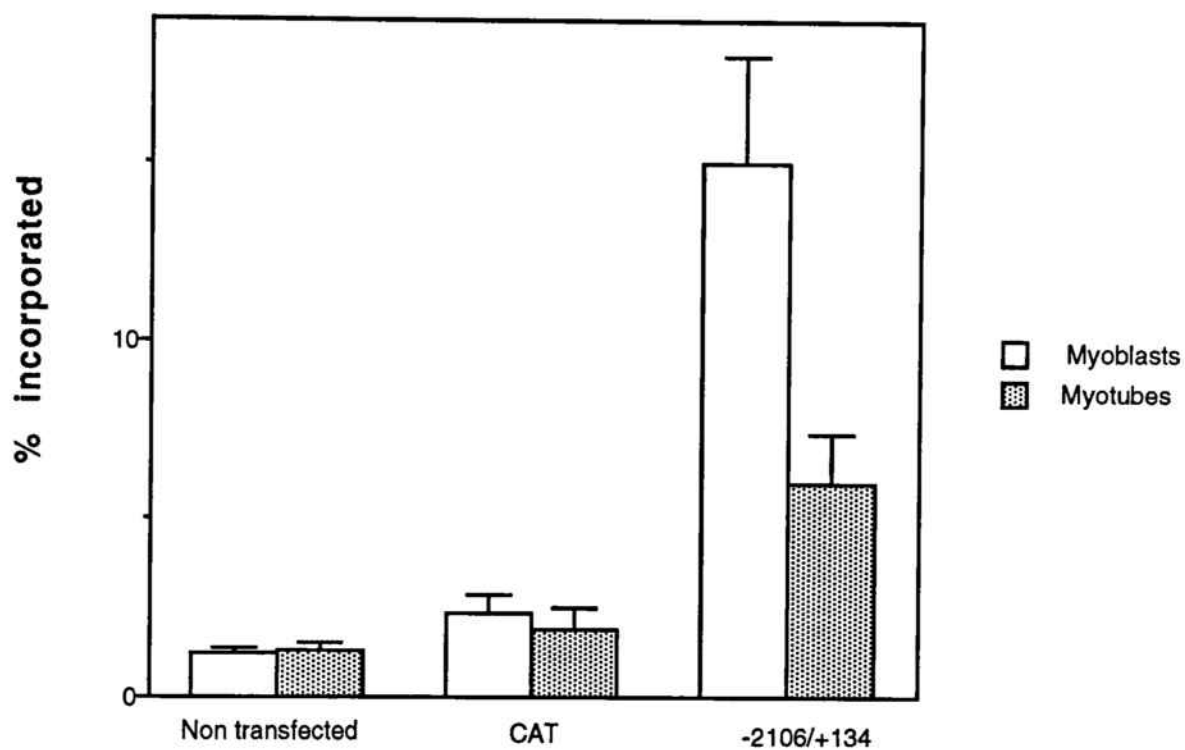


Figura 36: Cèl.lules L6E9 es van transfectar utilitzant el mètode del fosfat càlcic amb el plasmidi CAT bàsic o amb el plasmidi -2106/+134G1CAT. Immediatament després d'afegir el precipitat, es va afegir medi complet amb un 10% (mioblasts) o amb un 2% de sèrum (miotubs), que es va mantenir al llarg de 72 hores després del xoc de glicerol. Passat aquest temps, es va valorar l'activitat cloranfenicol acetil transferasa, que es va comparar amb la de cèl.lules sotmeses al mateix temps d'incubació però sense estar transfectades. Mostrem el resultat de quantificar amb un aparell AMBIS el % de radioactivitat en forma de cloranfenicol acetilat al menys de 5 experiments, amb els seu error estàndard.

Figura 37: Es van generar, mitjançant talls amb enzims de restricció adequats (veure secció de Materials i Mètodes), diferents construccions amb deleccions progressives de la zona 5' del promotor de GLUT1 contenint les seqüències -1672/+134, -1203/+134, -812/+134, -201/+134, -99/+134 i -33/+134. Aquestes, juntament amb la construcció inicial (-2106/+134G1CAT), es van transfectar en cèl.lules L6E9, i després de l'exposició al precipitat es van incubar en medi 10% (mioblasts, MB) o 2% (miotubs, MT) de sèrum. Passats 4 dies es va valorar l'activitat cloranfenicol acetil transferasa i es va corregir per l'activitat β -galactosidasa. Es mostren les mitjanes i l'error estàndard obtinguts d'entre 4 i 10 experiments, expressant els resultats com a % del valor màxim obtingut, el de la construcció -201/+134.

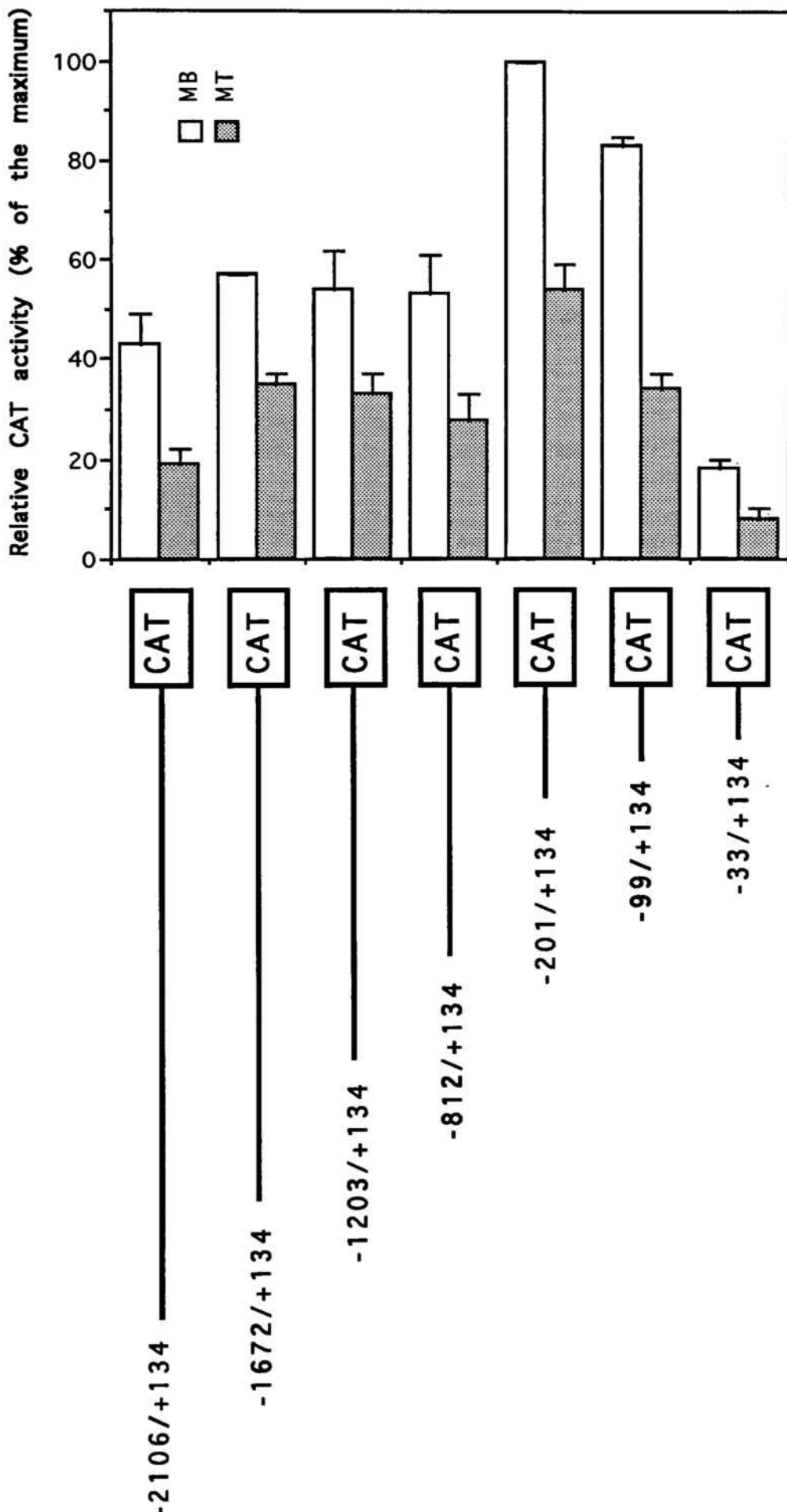
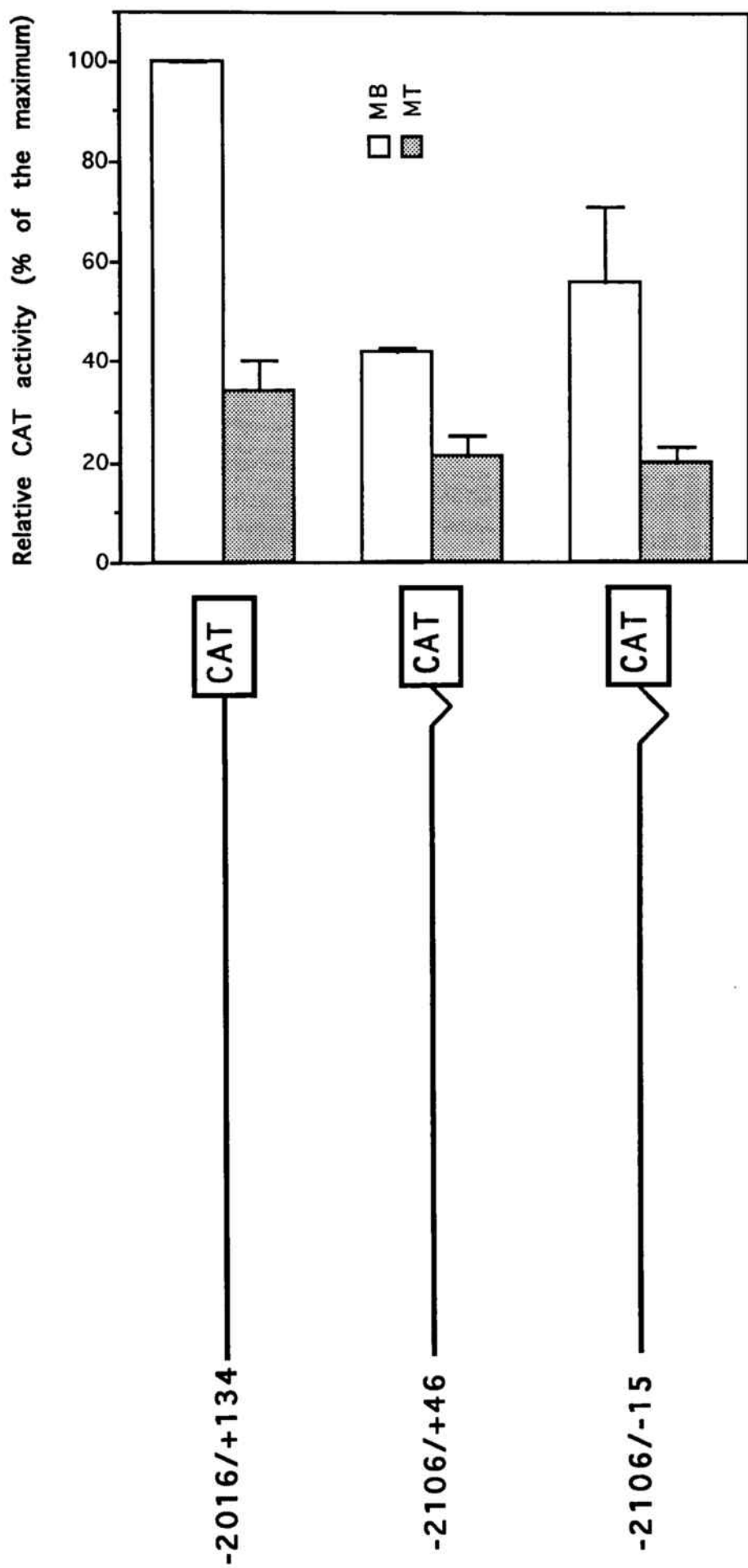


Figura 38: A partir de la construcció -2106/+134G1CAT es van generar, utilitzant els enzims de restricció adequats (veure secció de Materials i Mètodes), dues deleccions de la part situada més a 3' del promotor. Es van utilitzar, juntament amb la construcció original per transfectar cèl.lules L6E9 que, després de l'exposició al precipitat es van incubar en medi de diferenciació (miotubs) o en medi de creixement (mioblasts) al llarg de quatre dies. Passat aquest temps, es va valorar l'activitat cloranfènicol acetil transferasa dels extractes citoplasmàtics (utilitzant l'AMBIS), i es va corregir per l'activitat β -galactosidasa. Es mostra la mitjana i error estàndard de tres experiments, expressats com a % del valor màxim obtingut, el de la construcció de -2106/+134G1CAT.

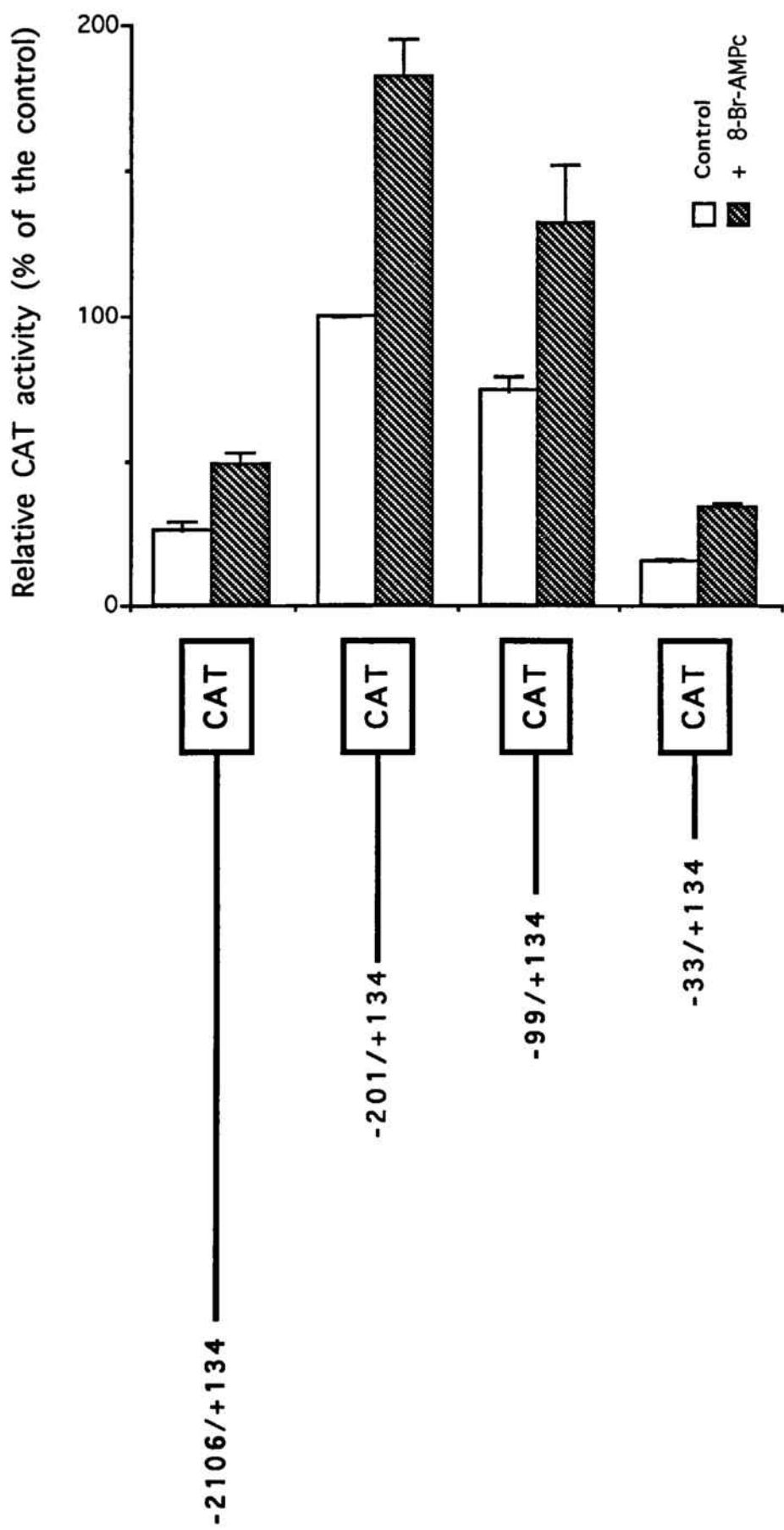


l'activitat, disminuint fins un 58% del valor del troç de promotor sencer (-2106/+134). Cal indicar que aquesta construcció (-33/+134) contenia només una seqüència TATA, l'inici de transcripció i els 133 parells de bases a 3'de l'inici de transcripció. Això indicava que entre -99 i -33 existirien seqüències responsables del manteniment de l'activitat més important que havíem trobat per al promotor. Però quan es va analitzar l'efecte repressor de la diferenciació sobre l'activitat d'aquest troç del promotor de GLU1, es va trobar que es mantenia la repressió per a totes les construccions assajades (Fig.37), fins i tot per a la més petita que contenia només els 33 parells de bases a 5'de l'inici de transcripció. El mateix es va observar quan es va analitzar l'efecte del 8-Br-AMPC sobre diferents construccions: sempre trobavem una estimulació per part del 8-Br-AMPC independentment de la construcció assajada. L'efecte era, per a totes, més o menys el mateix (Fig.39). Tots aquests resultats semblaven indicar que l'efecte, tant de la diferenciació com de l'AMPC, es realitzaria sobre la zona de la caixa TATA. Per tal de descartar un efecte de la zona més a 3'de l'inici de transcripció, es van realitzar unes construccions tallant troços de la zona més a 3'(Fig.38), i es va provar si la diferenciació mantenia els seus efectes repressors. Com es pot observar en la Fig.38, al tallar un fragment de 88 parell de bases d'aquesta zona, l'activitat del promotor va caure en un 60%, indicant l'existència d'alguna seqüència important per a l'activitat transcripcional. Però també en aquest cas en totes les construccions assajades es mantenia l'efecte repressor per part de la diferenciació. Semblava, doncs, que la seqüència responsable er la caixa TATA.

3.3 ASSAJOS PER IDENTIFICAR ELS FACTORS RESPONSABLES DE L'ACTIVITAT DE LA ZONA -99/-33.

Donat que la construcció entre -99 i +134 donava una activitat basal molt semblant a la màxima obtinguda (la del fragment -201/+134), semblava que en aquesta zona (entre -99 i -33) es trobarien molts dels elements responsables de l'activitat basal del promotor. Es tractava d'una zona prou curta (uns 66 parells de bases) com per utilitzar-la per realitzar experiments de retardament en gel ("band shift"). A la Fig.40 es mostra un mapa d'aquesta zona, en el que s'han marcat les seqüències conegudes d'unió per a diferents factors de transcripció. Així, destaquen una caixa CAAT (d'unió de factors C/EBP), dues zones d'unió del factor AP2, i una caixa d'unió del factor SP1. Es va aïllar un fragment de DNA que englobava la seqüència entre -102 i -37, es va marcar radioactivament, i es va utilitzar per experiments de retardament en gel incubant-la amb extractes nuclears procedents de cèl·lules L6E9 en estat de

Figura 39: Es van utilitzar les construccions indicades per transfectar cèl.lules L6E9, mantingudes en medi 10% de sèrum. 38 hores després de l'exposició al precipitat, es va afegir en el medi o no (control) 1 mM 8-bromo-AMPC, que es va mantenir al llarg de 48 hores. Passat aquest temps, es va valorar l'activitat cloranfenicol acetil transferasa de les mostres, i es va corregir per l'activitat β -galactosidasa. Es mostren la mitjana i error estàndard d'entre tres i vuit experiments, expressats com a % del valor obtingut amb la construcció -201/+134.



mioblast o en estat de miotub de 7 dies. A la Fig.41 es mostra el resultat d'un experiment d'aquest tipus. Com es pot observar, la sonda marcada sense extracte migra com dues bandes, una de més baix pes molecular majoritària, i una banda de més alt pes molecular menys abundant. Desconeixem l'origen de la segona banda, però va aparèixer sempre amb els diferents marcatges. Quan s'afegia extracte procedent de mioblasts o miotubs observem que apareixien diferents bandes de retardament, el que indicava que s'unien a aquest fragment diferents proteïnes, i que el patró d'unió és diferent entre els mioblasts i els miotubs. La unió era específica, ja que a l'incubar amb una quantitat de 100 vegades de fragment sense marcar, desplaçavem totes les bandes retardades. Amb fletxes s'han indicat els complexos més abundants: els A1, A2, B, D1 i D2 són específics (cas dels complexos A1, A2 i B) o molt més abundants (cas dels D1 i D2) en els mioblasts que en els miotubs. Pel contrari, els complexos C2 i D3 són específics dels miotubs. Només el complex C1 apareix amb la mateixa intensitat tant en mioblasts com en miotubs.

El següent pas era intentar mapar on s'unia cada un dels complexos. Per això, el camí més ràpid i informatiu és la realització d'assajos de "footprinting". Es va intentar però els resultats van ser decebedors. Com una alternativa que també ens podia donar molta informació es va decidir dissenyar una sèrie d'oligonucleòtids que englobessin tot el fragment, i intentar competir amb ells la unió dels factors proteïcs a la nostra sonda marcada. A la Fig.42 es mostra un esquema amb els oligonucleòtids que es van fer sintetitzar, i que van ser utilitzats en els experiments que s'exposaran a continuació. Cal destacar que ni amb l'oligonucleòtid IV ni amb el V es va lograr competir cap dels complexos visualitzats. Però sí vàrem obtenir resultats positius amb els altres tres oligonucleòtids, com veurem a continuació.

El primer oligonucleòtid utilitzat va ser l'I, el que englobava des de la posició -100 fins a la -85, on es situava la zona d'unió al factor SP1. Com es pot veure a la Fig.43, la utilització d'aquest oligonucleòtid en quantitats creixents no va desplaçar mai cap banda de les que formaven els extractes procedents de miotubs. Però en el cas dels extractes de mioblasts, l'oligonucleòtid sí lograva desplaçar clarament dues bandes, els complexos A1 i A2, específics dels mioblasts. Això deixava oberta la possibilitat de que aquestes bandes correponguessin al factor SP1. Cal destacar que per tal de lograr competència amb aquest oligonucleòtid es precisaven quantitats elevadíssimes de competidor fred (de l'ordre de 2000 vegades), molt més altes que les requerides en el cas dels altres dos oligonucleòtids (de l'ordre de 200 vegades) o en el cas del fragment sencer quan s'utilitzava per desplaçar (de l'ordre de 50 vegades). Vàrem comprovar que realment tot l'oligonucleòtid

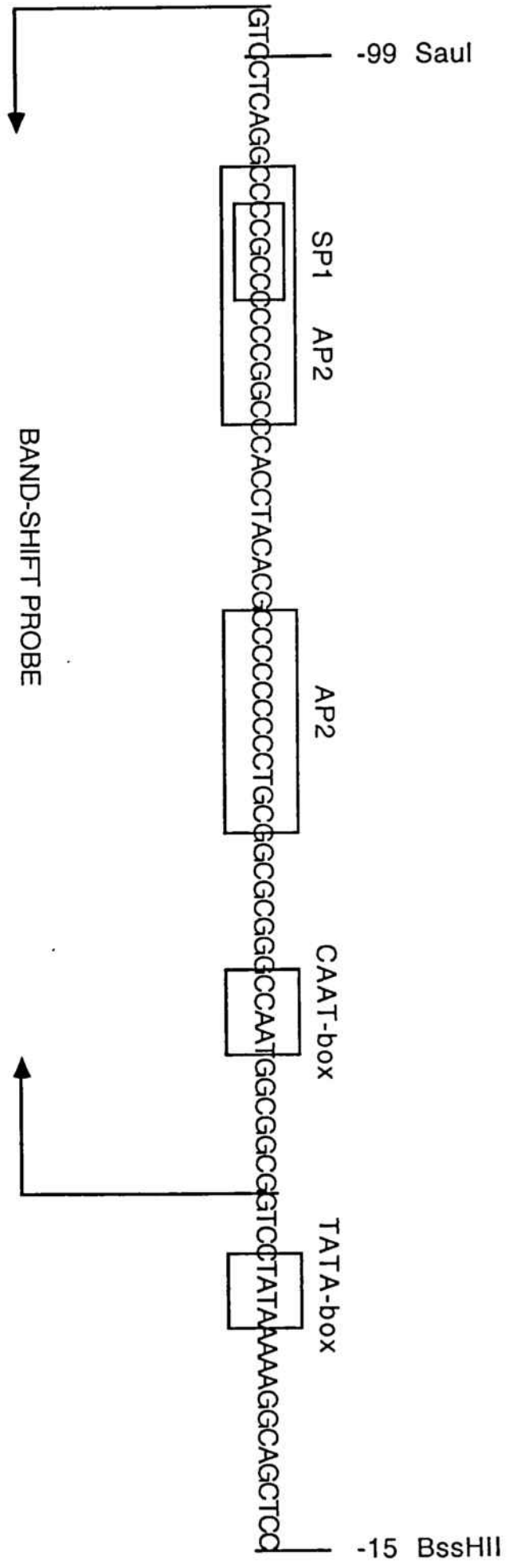


Figura 40: Esquema de la zona compresa entre els nucleòtids -102 i -15, on s'ha marcat la zona utilitzada en els experiments de retardament en gel que s'exposaran a continuació. S'han enquadrat les seqüències consens per a diferents factors de transcripció ben coneguts, com una per a SP1, dues per a AP2, una caixa CAAT i una caixa TATA.

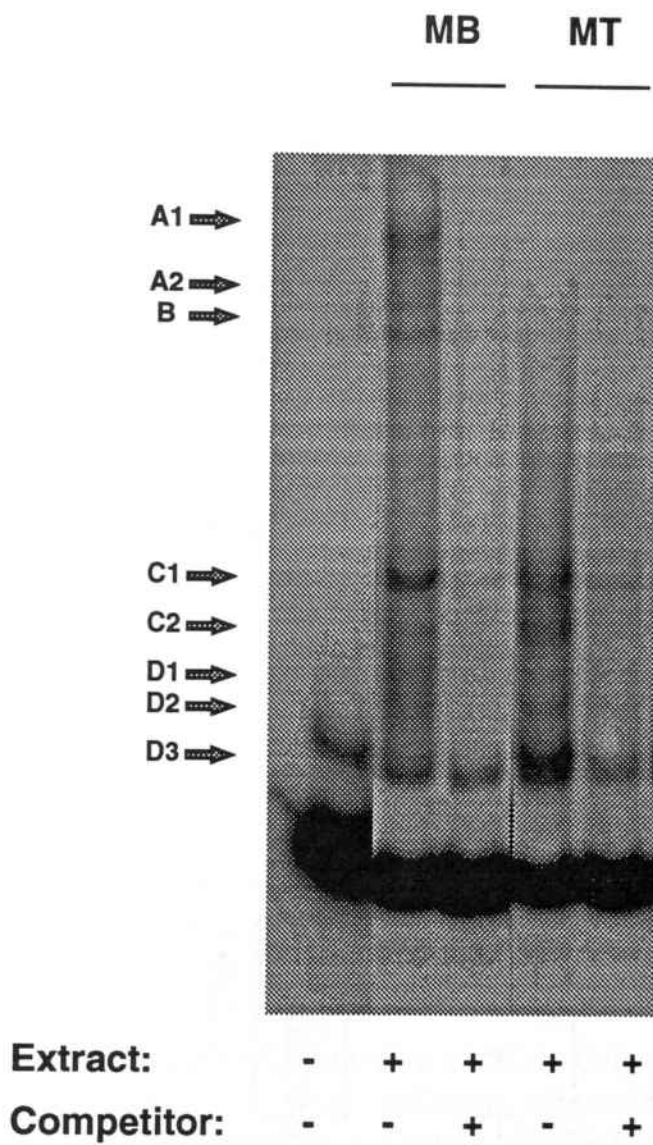


Figura 41: Assaig de retardament en gel incubant la seqüència de DNA del promotor de GLUT1 AvaII-AvaII que comprenia entre els nucleòtids -102 i -37, marcada radioactivament, amb o sense extractes nuclears procedents de cèl.lules L6E9 en l'estat de mioblast (MB) o de miotub de 7 dies (MT). A més, en determinats carrils es va afegir 50 vegades el mateix troç de DNA però sense marcar com a competidor. Després d'una preincubació inicial, de 15 minuts a temperatura ambient, dels extractes amb la resta de components de la barreja de reacció (veure secció de Materials i Mètodes), però sense el troç de DNA marcat, es va afegir aquest i es va incubar la barreja al llarg de 10 minuts a 4°C. Passat aquest temps es van carregar les mostres en un gel del 7% de policacrilamida i es van córrer al llarg de tres hores. A continuació es va assecar el gel i es va posar a exposar. Es mostra l'autoradiografia d'un gel representatiu. S'han indicat amb fletxes els diferents complexos que es van formar.

Band shift probe

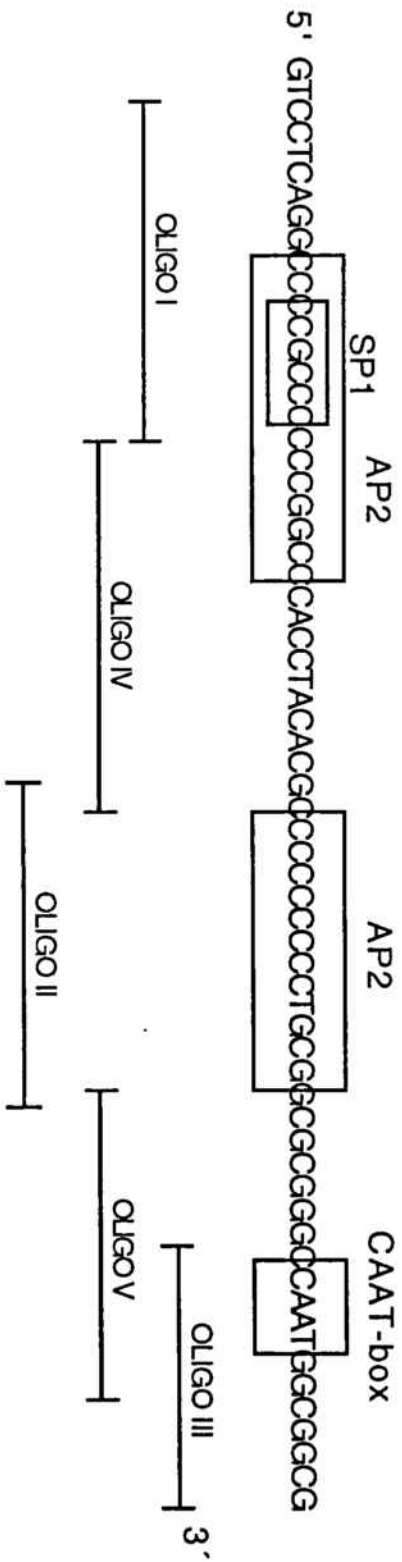


Figura 42: Esquema dels oligonucleòids utilitzats en els experiments de retardament en gel per tal de competir amb el troç -102/-37 marcat radioactivament.

estigués ben anellat, tant corrent gels de poliacrilamida com mitjançant marcatge radioactiu, i efectivament no hi havia contaminació d'oligonucleòtid sense marcar, el que indicava que la manca de competició a dosis petites d'oligonucleòtid es devia a una baixa afinitat d'aquest pel factor protèic.

Quan es va utilitzar l'oligonucleòtid II (que engloba des de la posició -69 fins a la -55) com a competidor fred (Fig. 44), es va observar que desplaçava les bandes corresponents als complexos de mobilitat electroforètica més gran, els D1 i D2 dels extractes de mioblasts, i el D3 dels extractes de miotubs. En aquest cas la competició s'assolia ja a concentracions baixes de l'oligonucleòtid fred, d'unes 100 vegades. Recordem que aquesta zona es correspon exactament amb el putatiu lloc d'unió AP2 central del fragment.

Per últim, amb l'oligonucleòtid III (de les posicions -48 a la -35, que englobava la possible zona d'unió CAAT) vàrem poder competir les bandes de mobilitat intermitja, C1 en el cas dels mioblasts, i C1 i C2 en el cas dels miotubs. Així, i com a resum, podem agrupar els complexos en tres grans zones. Un grup de complexos, de mobilitat més petita, que englobaria els complexos A1 i A2 (exclusius de mioblasts) que maparien a la zona -100/85; un conjunt de complexos de mobilitat intermitja, que englobaria el C1 (present tant en mioblasts com en miotubs) i el C2 (exclusiu de miotubs) que maparien a la zona -48/-35; i per últim, un conjunt de complexos de mobilitat més elevada del que formarien part els D1 i D2 (típics del mioblast) i el D3 (típic dels miotubs), que maparien a la zona de la caixa CAAT, entre els nucleòtids -69 i -55.

Calia intentar conèixer la identitat protèica dels complexos. Coneixent les possibles zones d'unió es van utilitzar oligonucleòtids comercials que englobaven les zones conservades tant per al factor SP1 com per al factor AP2. Aquests oligonucleòtids es van utilitzar com a competidors freds del mateix fragment marcat. Com es pot observar a la Fig.46, només vàrem obtenir competència en el cas de l'oligonucleòtid de la zona SP1 i mai del de la zona AP2. A més, les bandes desplaçades per l'oligonucleòtid comercial eren exactament les mateixes que es desplaçaven amb l'oligonucleòtid I, el que englobava la zona d'unió SP1 del nostre fragment, els complexos A1 i A2. Cal destacar a més, que la competència es va donar només en el cas dels extractes de mioblasts, allà on havíem observat retardament dels complexos A1 i A2 i no es va competir cap banda dels extractes de miotubs.

Semblava, doncs, que els complexos A1 i A2 podien ser deguts a la unió del factor SP1. Aquest és un factor molt conegut, present en els promotors de

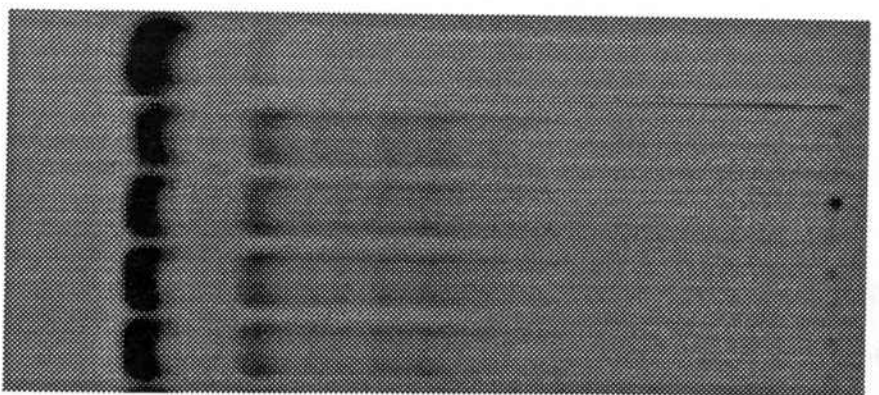
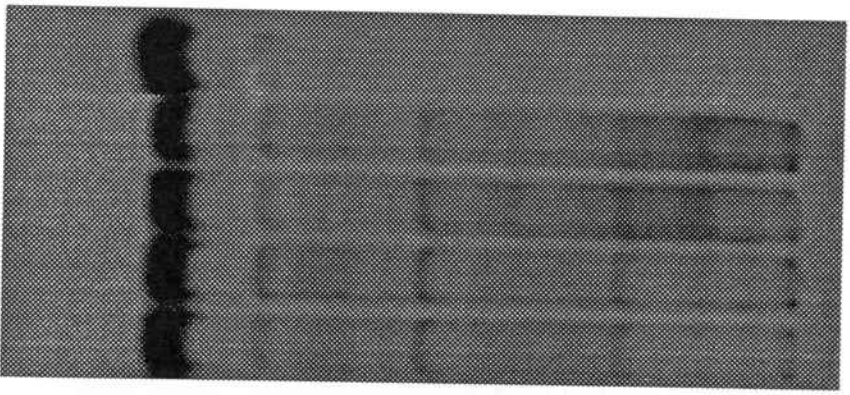
Figura 43: Es van incubar extractes nuclears de cèl.lules L6E9 mioblasts (MB) o miotubs (MT) en presència del troç -102/-37 marcat radioactivament i de quantitats creixents (1000, 5000 i 10.000x) de l'oligonucleòtid I (-100/-85) sense marcar. S'han assenyalat els complexos que van modificar la seva presència en els diferents experiments realitzats. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

Competitor Oligonucleotide I (-100/-85)

MB

MT

A1
A2



Extract: - + + + +
Competitor: - - 

Extract: - + + + +
Competitor: - - 

Figura 44: Es van incubar extractes nuclears obtinguts de mioblasts (MB) o miotubs de 7 dies (MT) L6E9 amb el troç de DNA -102/-37 marcat radioactivament. A més, es van afegir o no quantitats creixents (50, 200, 500 i 1000x en el cas dels MB, 50, 200 i 500x en el cas dels MT) de l'oligonucleòtid II (-69/-55). S'han marcat els complexos que van desplaçar la seva unió per la presència de l'oligonucleòtid no marcat. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

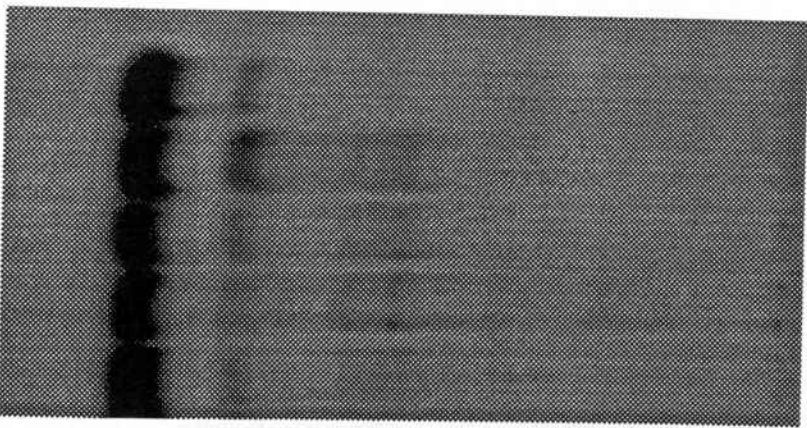
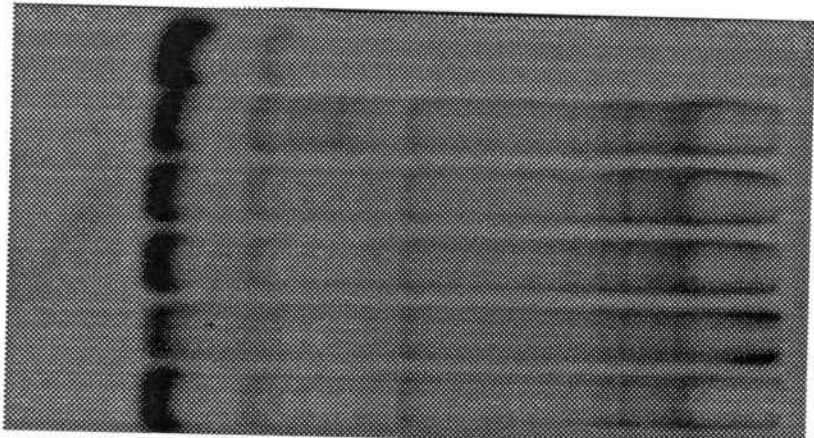
Competitor oligonucleotide II (-69/-55)

MB

MT


D1 →
D2 →

D3 →



Extract:

Competitor:

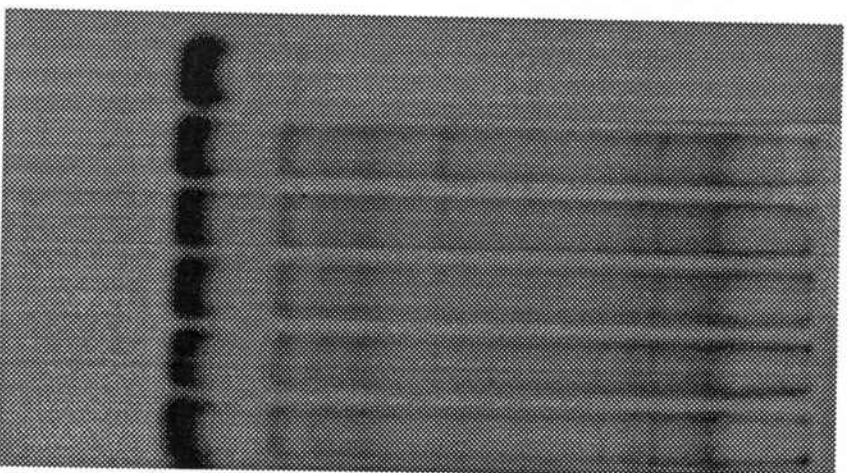
- + + + + +
- - 

- + + + + +
- - 

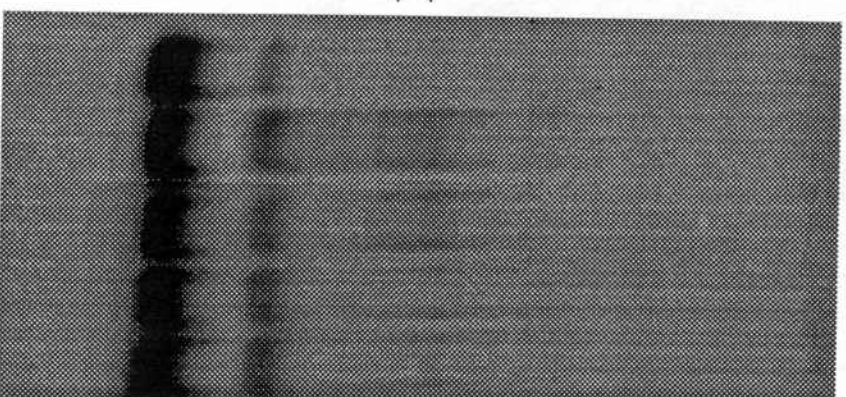
Figura 45: El troç de DNA -102/-37 del promotor de GLUT1, marcat radioactivament, es va incubar amb presència o absència d'extractes nuclears procedents de mioblasts (MB) o miotubs de set dies de diferenciació (MT) L6E9, afegint quantitats creixents (50, 200, 500 i 1000x en el cas dels mioblasts, 50, 200 i 500x en el cas dels miotubs) de l'oligonucleòtid III (-48/-35) sense marcar. S'han marcat els complexos que van desplaçar la seva unió per efecte de la presència de l'oligonucleòtid competidor. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

Competitor oligonucleotide III (-48/-35)

MB



MT

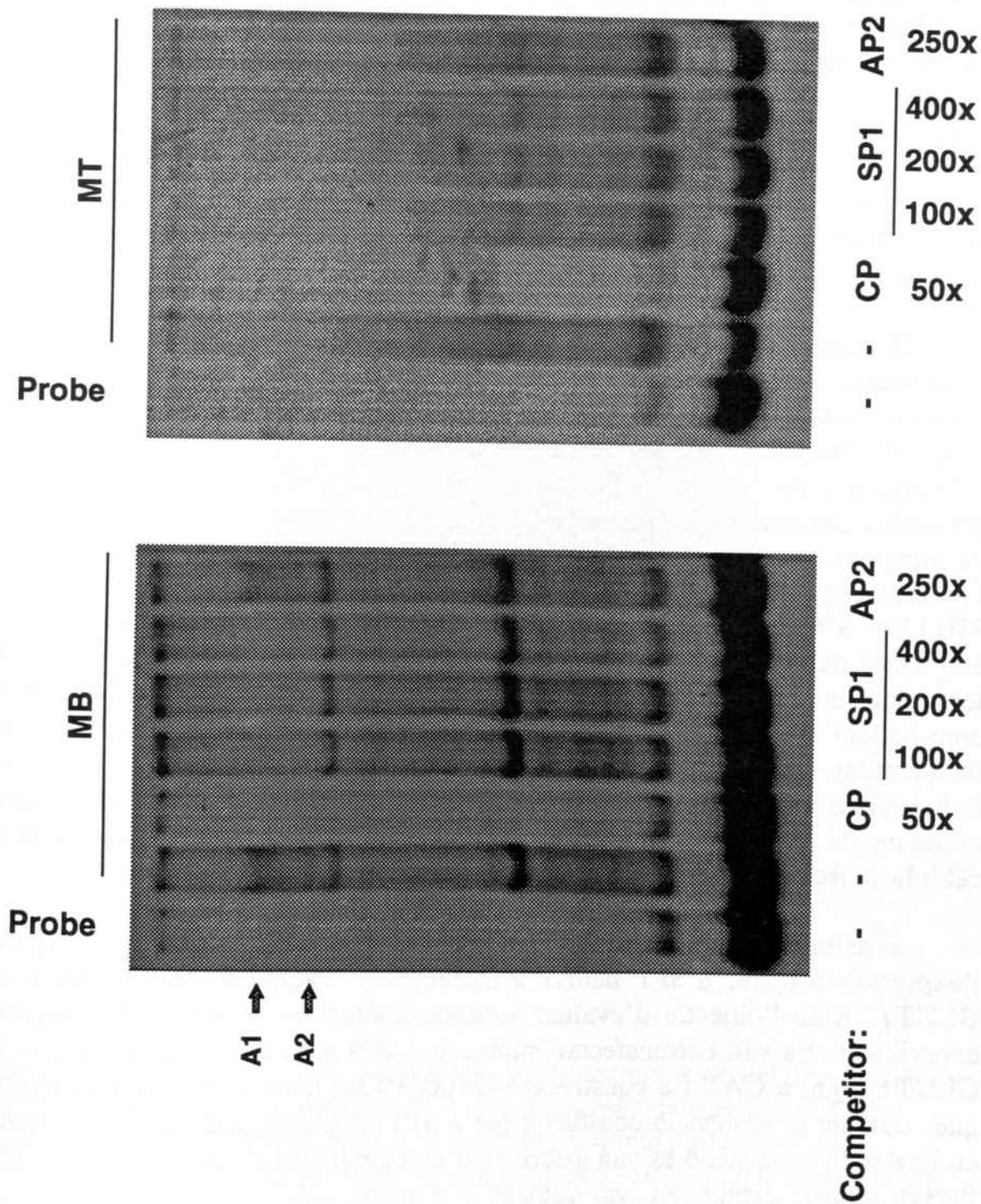


Extract: - + + + + +
Competitor: - - 

- + + + +
- - 

Figura 46: Es van incubar extractes nuclears procedents de mioblasts (MB) o miotubs de set dies de diferenciació (MT) L6E9, amb el troç de DNA -102/-37 marcat radioactivament. Quan s'indica, es va afegir, a més, un excés sense marcar del propi troç de DNA (CP), o d'oligonucleòtids comercials per a les zones consens dels factors SP1 i AP2. Amb fletxes s'han indicat els complexos que van modificar la seva unió per la presència de l'oligonucleòtid competidor. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

SP1 and AP2 Oligos competence



molts gens (Briggs i col., 1986; Kadonaga i col, 1986). Aquest factor de transcripció pertany a la família dels anomenats "zinc fingers", ja que requereixen Zn^{+2} per tal de poder unir-se al DNA. Així, una prova més de que podia tractar-se de SP1 era intentar evidenciar si la seva capacitat d'unió era dependent de la presència o no de Zn^{+2} en el medi. Es va realitzar el mateix experiment de retardament incubant el fragment marcat amb extractes nuclears de mioblasts L6E9, però afegint ara en el medi Zn^{+2} , EDTA (un quelant de cations divalents) o tots dos a l'hora. Com es pot observar a la Fig.47, afegint Zn^{+2} en el medi incrementa la unió, sobre tot, del complex A2, de manera dosi dependent. Pel contrari, el fet d'afegir EDTA en el medi provoca la disminució, també de manera dosi dependent, sobre tot dels complexos A1 i A2, encara que a la dosi més alta assajada, 2,5 mM d'EDTA també el complex B disminueix la seva unió. Així, els complexos A1 i A2 semblen ser dependents, per la seva unió de Zn^{+2} , el que confirmaria que es tracta de factors de la família SP1.

Si realment es tractava de factors de la família SP1, ¿a que es devia la modificació en la unió observada entre els extractes de mioblasts i els de miotubs?. La resposta podia estar a nivell de la capacitat d'unió del factor o a nivell de modificacions en la quantitat de proteïna SP1 presents entre els diferents estadis cel·lulars. Per tal d'esbrinar quin era el mecanisme, es va procedir a realitzar un assaig de "western blot" amb extractes nuclears obtinguts de mioblasts o bé de miotubs de 7 dies. Com es pot observar a la Fig.48, amb l'anticòs contra SP1 detectem dues bandes majoritàries localitzades entre 90 i 110 kDa. S'ha descrit que l'SP1 purificat de cèl·lules HeLa apareix com dues isoformes majoritàries, una de 95 i l'altre de 105 kDa, el que coincideix amb les bandes majoritàries observades en els extractes de cèl·lules musculars. Però, com podem apreciar, la quantitat d'SP1 en els mioblasts és molt superior que la quantitat que apareix en els miotubs, el que coincideix plènamment amb l'absència d'unió dels complexos A1 i A2 en els assajos de retardament amb extractes de miotubs. Així, SP1 està regulat per l'estat de diferenciació de la cèl·lula muscular.

Finalment, si SP1 té realment un paper activant el promotor de GLUT1, l'expressió forçada d'SP1 hauria d'incrementar l'activitat del promotor de GLUT1. Amb l'objectiu d'evaluar aquesta hipòtesi es va realitzar el següent experiment. Es van cotransfectar mioblasts L6E9 amb el troç de promotor de GLUT1 lligat a CAT (la construcció -2106/+134) amb un vector d'expressió que contenia la seqüència codificant per a SP1. A continuació es van mantenir en l'estat de mioblast o es van diferenciar cap a miotubs al llarg de quatre dies. Passat aquest temps es va valorar l'activitat CAT present en aquestes cèl·lules. Com es pot observar a la Fig.49, la cotransfecció d'SP1 amb el vector

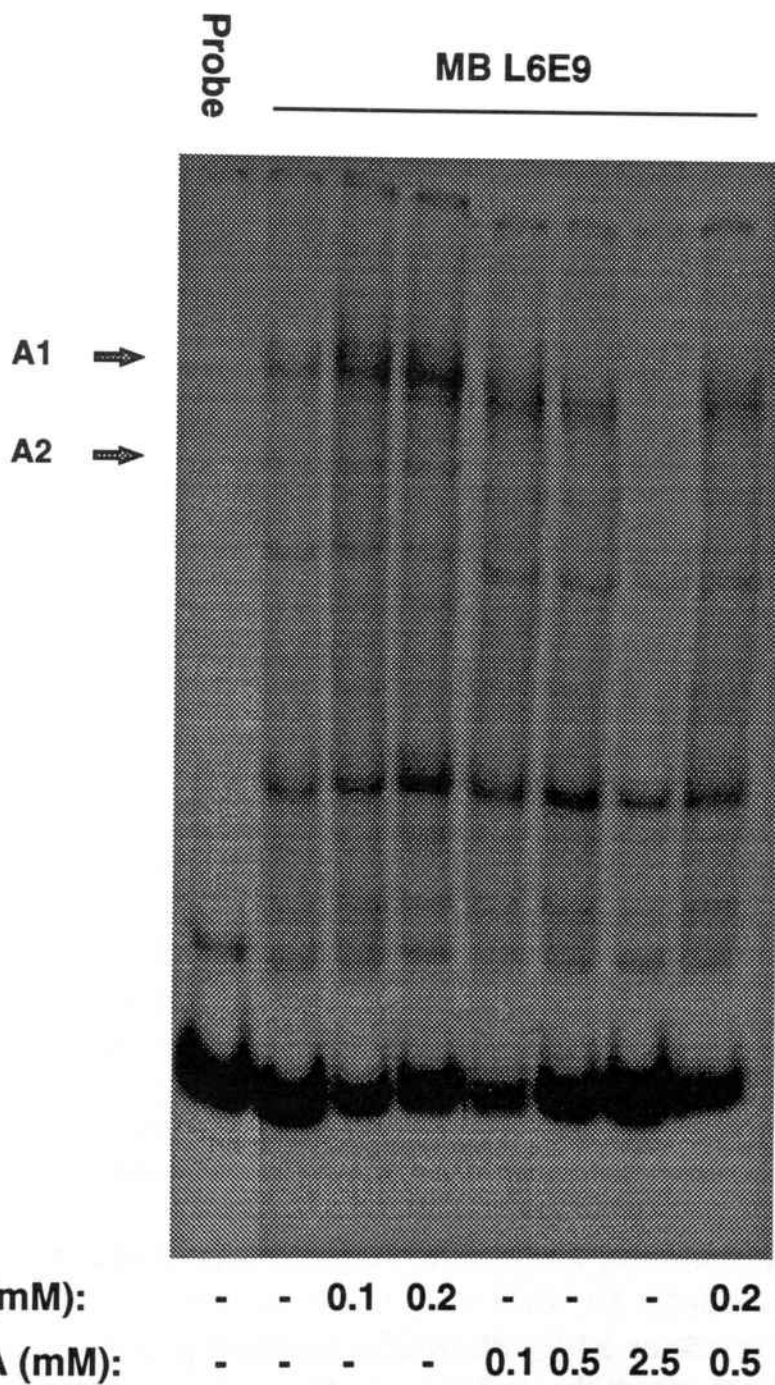


Figura 47: Es van preincubar extractes nuclears obtinguts de cèl.ules L6E9 en l'estat de mioblasts o de miotubs de 7 dies, en presència o absència de les quantitats indicades de Zn⁺² i EDTA al llarg de 15 minuts a temperatura ambient. A continuació, es va afegir el troç de DNA -102/-37 del promotor de GLUT1 marcat radioactivament, i es va incubar la barreja de reacció al llarg de 10 minuts a 4°C. En acabar, es van carregar les mostres en un gel del 5% de poliacrilamida i es van córrer al llarg de tres hores. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

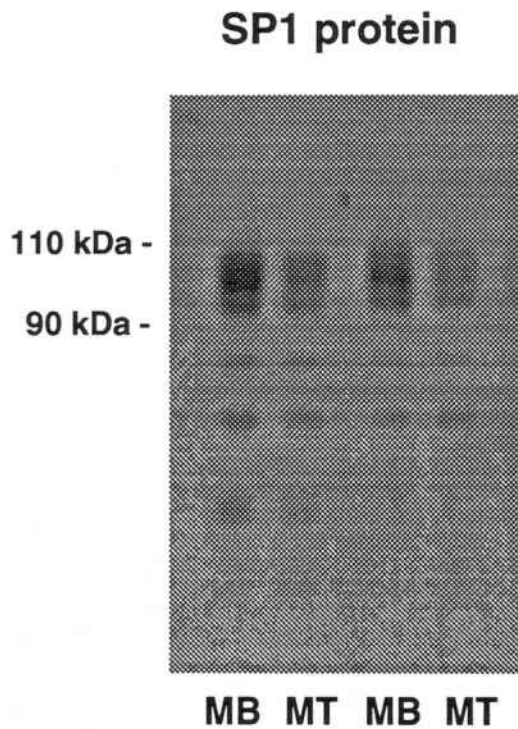


Figura 48: Es van córrer 20 μ g d'extractes nuclears procedents de cèl.lules L6E9 mioblasts (MB) o miotubs de 7 dies de diferenciació (MT) en un gel del 7,5% de poliacrilamida. A continuació, es va realitzar un assaig de "western blot" amb un anticòs específic contra la proteïna SP1, i es va revelar pel sistema ECL. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

CAT bàsic no provoca cap modificació en l'activitat CAT. Pel contrari, qual el que es cotransfecta és la construcció -2106/+134 del promotor de GLUT1 amb SP1 obtenim una activitat CAT molt superior que sense SP1, tant en els mioblasts com en els miotubs. Com també es pot apreciar, l'increment és molt més important en el cas dels mioblasts que en el cas dels miotubs.

3.2. FACTORS SIMILARS ALS DE LES CEL·LULES L6E9 S'EXPRESSEN EN ALTRES TIPUS CEL·LULARS MUSCULARS.

Com hem vist en l'apartat anterior, les cèl·lules L6E9 expressen una sèrie de factors de transcripció que s'uneixen a la zona -102/-37, amb un patró ben diferent entre mioblasts i miotubs. Per tal de poder identificar factors que fossin específics de cèl·lules musculars, es van obtenir extractes nuclears procedents de cèl·lules musculars Sol8 (tant de mioblasts com de miotubs de 7 dies), i de cèl·lules C3H10T1/2. Aquesta és una línia de fibroblasts obtinguts a partir de ratolí. Aquesta va ser la línia cel·lular que va permetre la clonació dels factors miogènics, ja que a l'expressar MyoD, miogenina, Myf5 o Mrf4 en grans quantitats en aquestes cèl·lules, i en les mateixes condicions de baixa concentració de factors de creixement en el medi, aquestes cèl·lules poden diferenciar cap a miotubs, expressant gens típics de cèl·lules musculars. El Dr. Vicente Andrés, de Boston, ens va cedir gentilment cèl·lules C3H10T1/2 salvatges, i altres que havien estat transfectades establement amb el cDNA per a MyoD, de manera que l'expressaven en altes quantitats. Aquestes cèl·lules podien diferenciar al baixar la quantitat de sèrum del medi. Així, es van aïllar extractes nuclears tant de cèl·lules C3H10T1/2 salvatges, com de les transfectades en l'estat de mioblast (expressant MyoD però sense diferenciar) o en l'estat de miotub.

Com es pot observar a la Fig.50, l'assaig de retardament en gel realitzat utilitzant aquests extractes va donar una sèrie de bandes de retardament, diferents entre els diferents tipus cel·lulars estudiats, però amb la particularitat que tots ells ja s'havien observat en les cèl·lules L6E9. Així, eren fàcilment identificables els complexos que havíem anomenat As, i que, a l'igual que l'observat en els mioblasts L6E9, eren clarament desplaçats per la incubació amb l'oligonucleòtid comercial corresponent a la seqüència d'unió d'SP1. Aquests complexos es podien observar en els mioblasts Sol8, també en els miotubs (encara que menys clars), i en els fibroblasts C3H10T1/2. Pel contrari, mai es va observar cap banda desplaçable en el cas dels mioblasts o miotubs de les cèl·lules C3H10T1/2 transfectades establement amb MyoD. També com

SP1 transactivates the -2106/+134 GLUT1 promoter

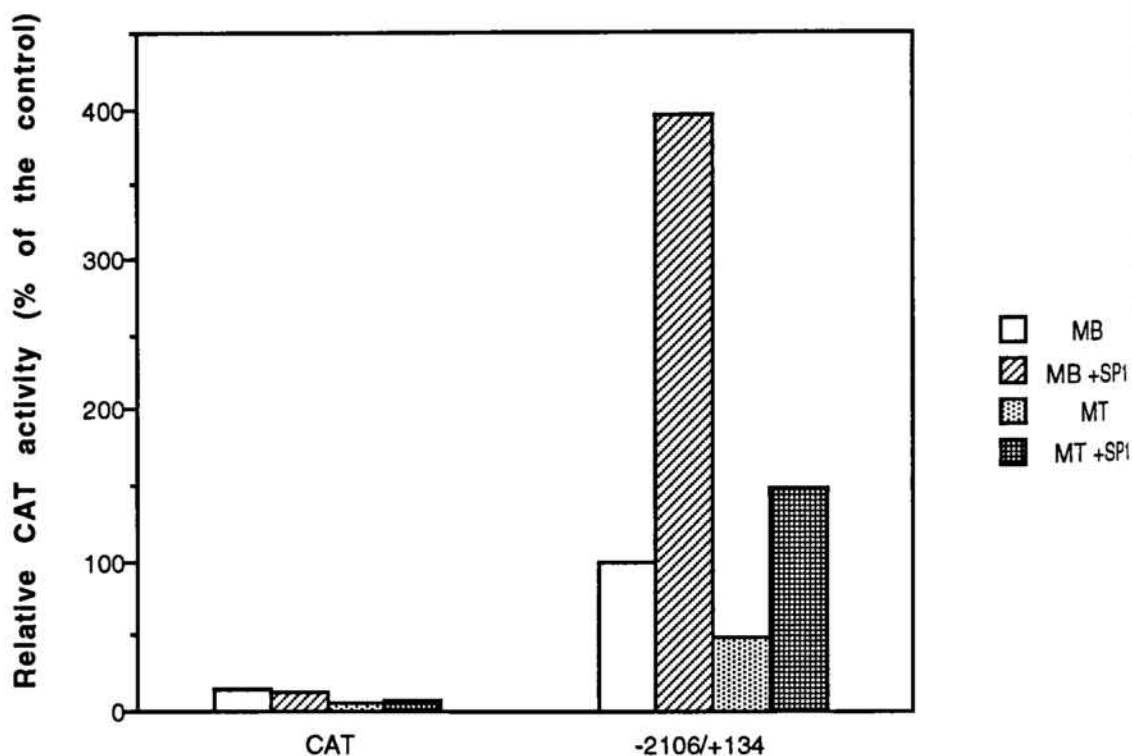


Figura 49: Es van transfectar cèl.lules L6E9 amb els plasmidis CAT bàsic (CAT) o amb la construcció del troç de promotor de GLUT1 -2106/+134 lligat a CAT, en presència (+SP1) o en absència (control), d'un vector d'expressió contenint la seqüència codificant per al factor de transcripció SP1. Després de l'exposició al precipitat, es va afegir medi 10% (MB) o 2% (MT) i es van obtenir extractes citoplasmàtics 4 dies després. Es va valorar l'activitat cloranfenicol acetil transferasa i es va corregir per la quantitat de proteïna de les mostres. Es mostra la mitjana de tres experiments, expressats com a % del valor obtingut amb la construcció -2106/+134 sense SP1 en els mioblasts.

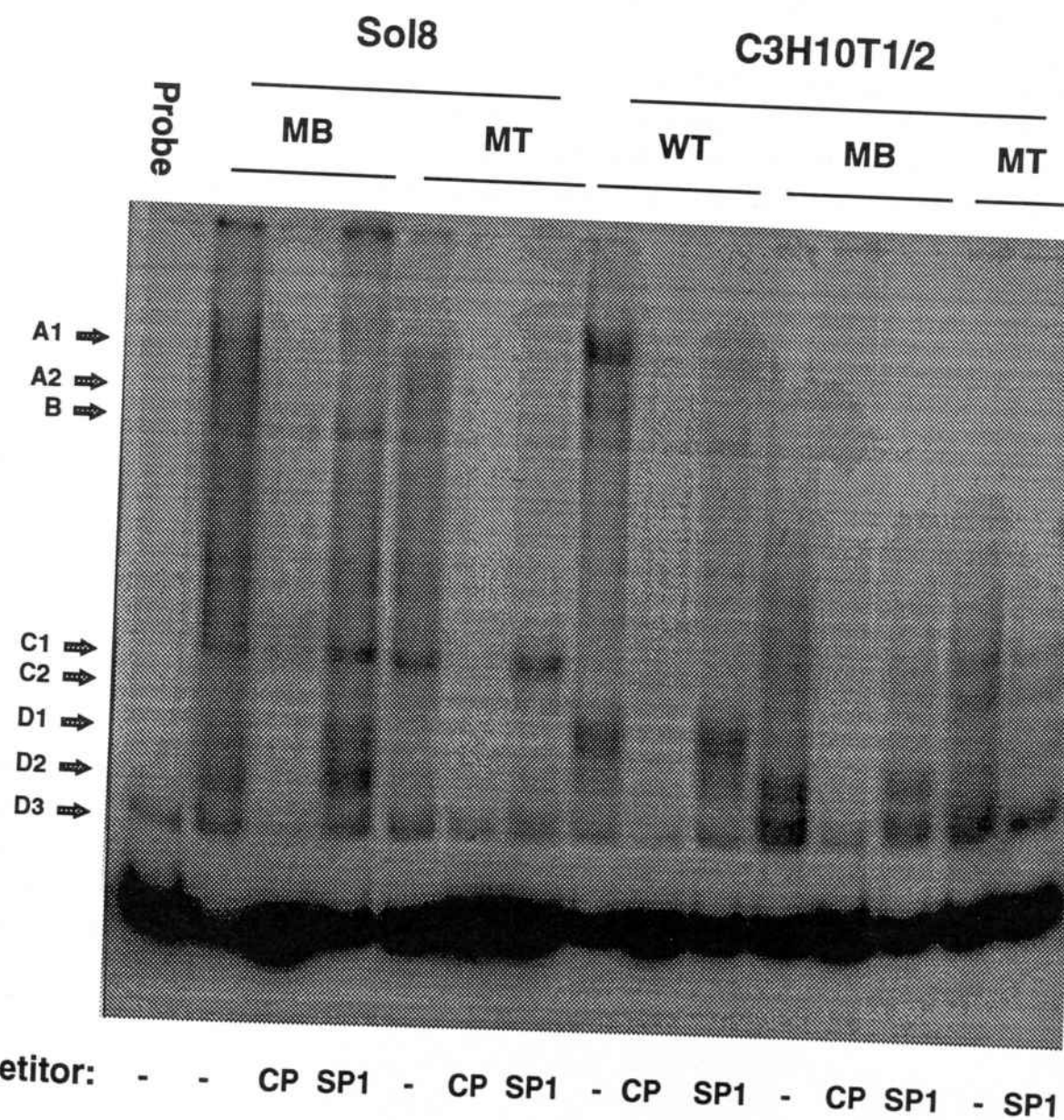


Figura 50: Es van incubar extractes nuclears procedents de cèl.lules Sol8 mioblasts (MB) o miotubs de set dies (MT), de cèl.lules C3H10T1/2 salvatges (WT) o de cèl.lules C3H10T1/2 transfectades establement amb MyoD, en l'estat de mioblast (MB) o de miotub de set dies (MT), amb el troç de DNA de -102 a -37 del promotor de GLUT1 marcat radioactivament. A més, quan s'indica, es va afegir un excés de 50 vegades del propi troç -102/-37 (CP) o de 200 vegades de l'oligonucleòtid comercial per a la seqüència consens per a SP1. Amb fletxes s'indiquen els complexos majoritaris que apareixien amb els diferents extractes. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.

passava amb les cèl·lules L6E9, es podien observar una sèrie de complexos intermitjos, els anomenats C1 i C2, i una sèrie de complexos d'alta mobilitat, els D1, D2 i D3. Bandes específiques de cèl·lules musculars són només les C1 i C2, i la D2 i D3. Bandes específiques de mioblast serien les A1 i A2, la B, i les D1 i D3, que mai apareixen a miotubs. I bandes específiques de miotub seria la C2. La D3 també apareix sempre només en el cas de miotub, excepte en el cas dels mioblasts de C3H10T1/2, que també la tenen. Com es pot comprovar, el patró trobat en aquests mioblasts seria un pas entremig entre el d'un mioblast i un miotub, expressant bandes que només apareixen en els mioblasts (com la D2), però també bandes que només apareixen en els miotubs (com la D3).

La localització dels diferents complexos és exactament la mateixa que en el cas de les cèl·lules L6E9, com es pot apreciar a les Fig.51-55: els complexos As mapen a la zona entre -100 i -85, els complexos intermitjos C1 i C2 mapen a la zona entre -48 i -35, i els complexos més ràpids D1, D2 i D3 mapen entre -69 i -55.

Ja per acabar, es va estudiar si, a l'igual que passava en el cas dels mioblasts i miotubs L6E9, on la presència o absència dels complexos As es correlacionava amb la presència o absència de la proteïna SP1, en aquest cas també passava el mateix. Així, es va realitzar un assaig de "western blot" amb els extractes nuclears de les cèl·lules C3H10T1/2 salvatges o de les transfectades establement amb MyoD en l'estat de mioblast. El resultat es pot observar en la Fig.56, on es pot observar que, efectivament, a les cèl·lules salvatges, on hi ha unió dels complexos As hi ha proteïna SP1, mentre que a les cèl·lules transfectades amb MyoD desapareix quasi bé completament aquest factor.

Figura 51: Extractes nuclears de cèl.lules C3H10T1/2 salvatges es van incubar amb el troç -102/-37 del promotor de GLUT1 marcat radioactivament, i amb un excés dels oligonucleòtids indicats (10.000x per a l'I, 50, 200 i 500x per al II, 200 i 500x per al III). S'indiquen els complexos que modificaven la seva unió per la presència del competidor. Es mostra l'autoradiografia d'un experiment representatiu.



C3H10T1/2 WT CELLS

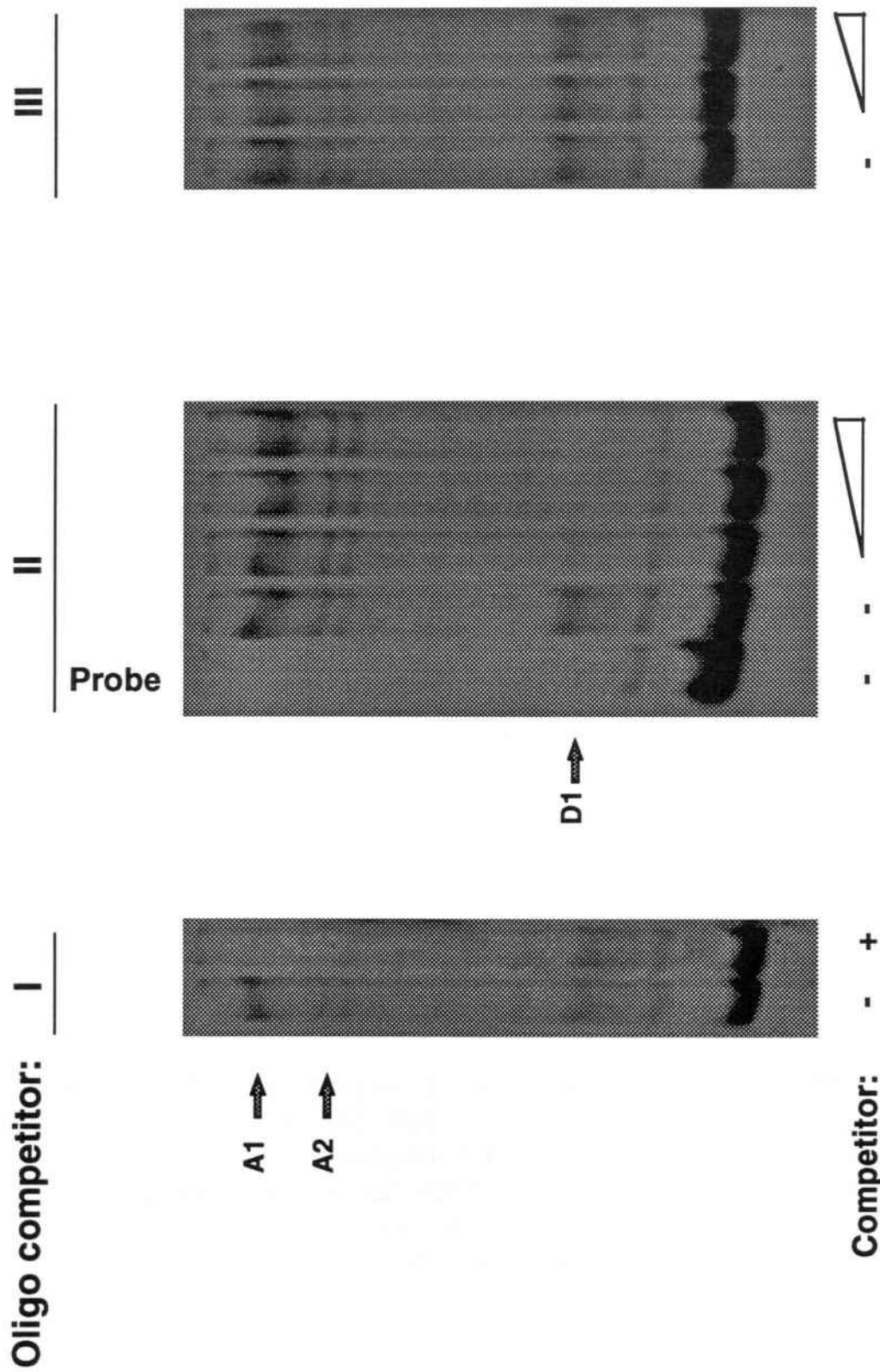


Figura 52: Extractes nuclears procedents de cèl.lules C3H10T1/2 transfectades establement amb MyoD i mantingudes en medi 10% de sèrum, es van incubar amb el fragment -102/-37 del promotor de GLUT1 marcat radioactivament, i amb la presència o no d'un excés dels oligonucleòtids I (10.000x), II (50, 200 i 500x) i III (500x). Amb fletxes s'indiquen els complexos que modifiquen la seva unió per efecte de la incubació amb l'oligonucleòtid sense marcar.

C3H10T1/2 -MyoD myoblasts cells

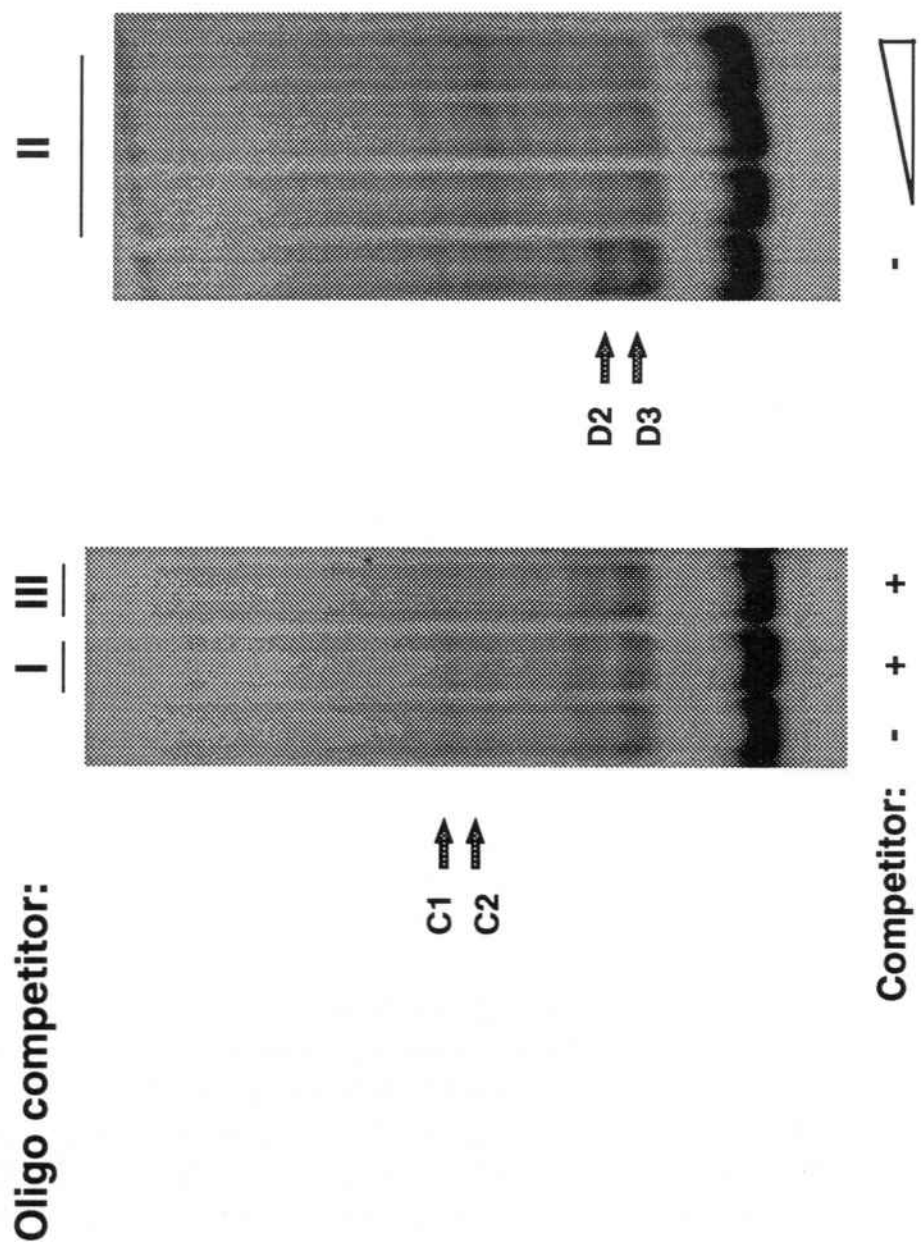
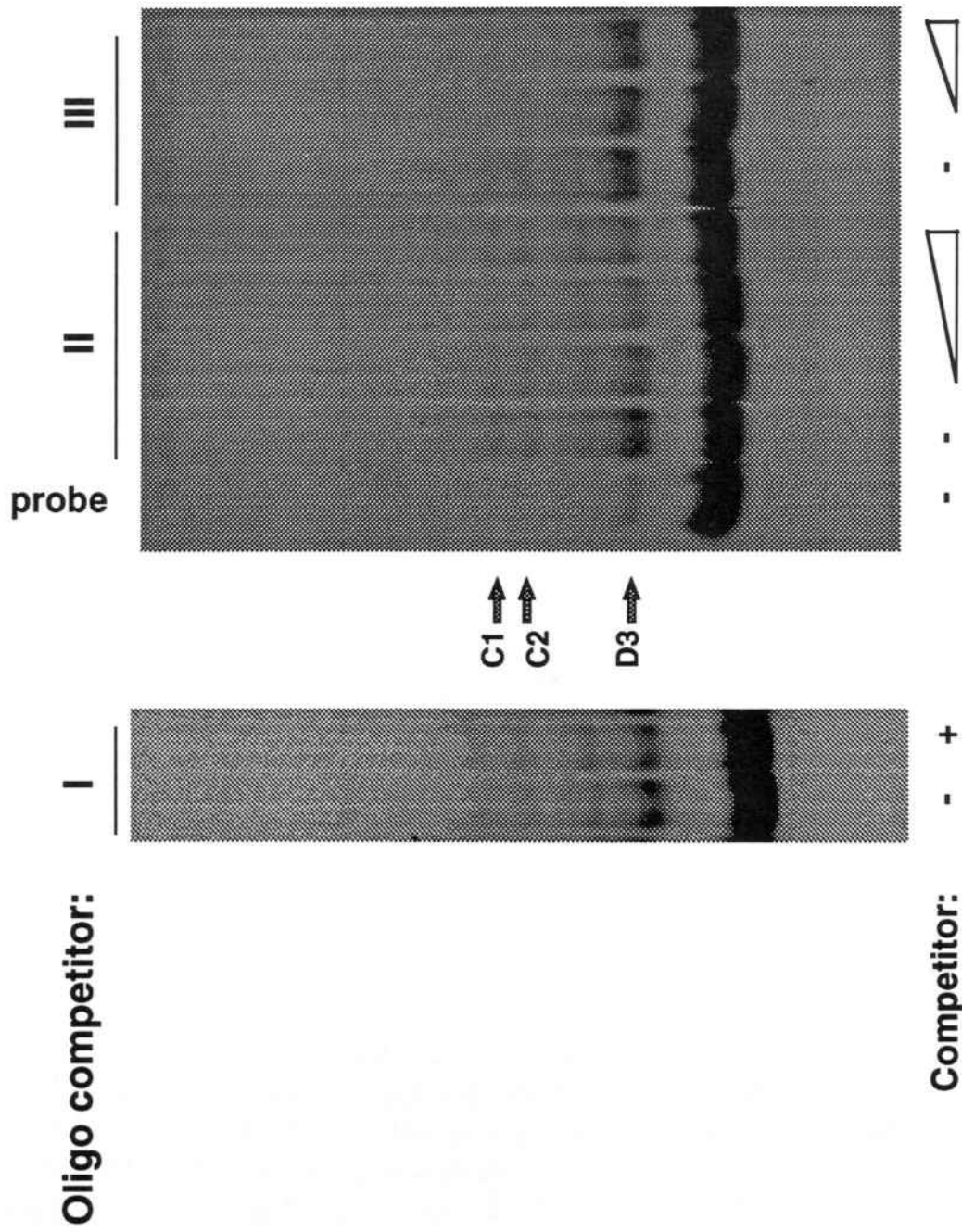


Figura 53: Extractes nuclears de cèl.lules C3H10T1/2 transfectades establement amb MyoD i mantingudes set dies en medi de diferenciació, es van incubar amb el fragment del promotor de GLUT1 -102/-37 marcat radioactivament, i amb o sense o excés dels oligonucleòtids I (10.000x), II (50, 200 i 500x) i III (50 i 200x). Amb fletxes s'indiquen els complexos que modifiquen la seva unió per la presència de l'oligonucleòtid. Es mostra l'autoradiografia d'un gel representatiu.

C3H10T1/2 -MyoD myotube cells



Sol8 cells

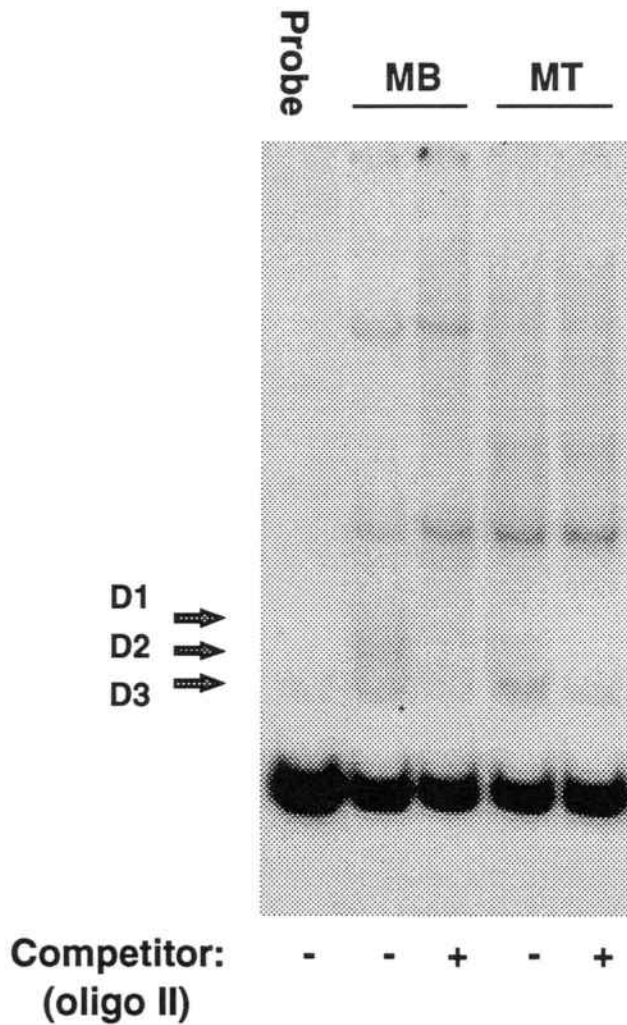


Figura 55: Extractes de mioblasts (MB) o miotubs de set dies de diferenciació (MT) de cèl.lules Sol8, es van incubar amb el fragment -102/-37 del promotor de GLUT1 marcat radioactivament, i amb la presència o no d'un excés (500x) de l'oligonucleòtid II sense marcar. Amb fletxes s'indiquen els complexos que modifiquen la seva unió per la presència de l'oligonucleòtid sense marcar. Es mostra l' autoradiografia d'un experiment representatiu.

SP1 protein

C3H10T1/2 CELLS

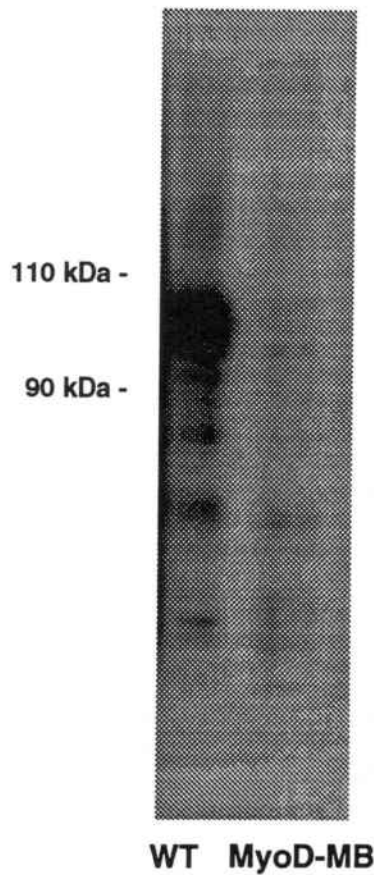


Figura 56: 20 μg d'extractes nuclears de cèl.lules C3H10T1/2 salvatges (WT) o transfectades establement amb MyoD i mantingudes en medi 10% de sèrum (MB), es van carregar en un gel del 7,5% de poliacrilamida. A continuació es va realitzar un assaig de "western blot" utilitzant un anticòs específic per a la proteïna SP1.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIO

1. EFECTE DE LA HIPERGLUCEMIA SOBRE EL TRANSPORT DE GLUCOSA EN LES CÈL·LULES ENDOTELIALS ECV304.

Com ja s'ha comentat a l'apartat d'Introducció, un dels efectes més generals provocats per les altes concentracions de glucosa és la disminució en el transport de glucosa (Klip i col., 1994). Aquest és un fet general per a tots els models cel·lulars estudiats en cultiu, des de fibroblasts, mioblasts i miotubs, adipòcits, cèl·lules endotelials de microvasos del cervell, neurones, etc. Els mecanismes pels que té lloc aquesta disminució depenen del model cel·lular, però l'efecte final és el mateix: el control nutricional de l'aport de glucosa (Klip i col., 1994). L'excepció d'aquest efecte general són les cèl·lules endotelials de macrovasos. Els nostres resultats amb la línia derivada de cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humà, i els resultats obtinguts en cèl·lules endotelials d'aorta bovina (Kaiser i col., 1993), van en el mateix sentit: la inexistència de modificacions en el transport de glucosa ni en l'expressió del transportador de la família GLUT expressat, GLUT1.

Com hem vist, la línia endotelial ECV304 pot considerar-se un bon model de cèl·lula endotelial de macrovasos. Així, a més d'altres marcadors típics de l'endoteli, com l'"angiotensin-converting enzyme", resposta a la lectina UEA-I i a l'anticòs PHM5, provocar neovascularització "in vivo" en el test de la còrnea de conill (Takahashi i col., 1990) o la producció d'activadors del plasminogen del tipus u-PA (Takahashi i Sawasaki, 1991), hem detectat en aquestes cèl·lules la presència d'un dels marcadors més clàssics de l'endoteli, com és el factor de von Willebrand, i l'expressió de la integrina $\alpha V\beta 3$, proteïna que participa en l'angiogènesi induïda per l'FGF (Fiedlander i col., 1995). A més, pel que fa a l'expressió de transportadors de glucosa, només expressa GLUT1, característica també de les cèl·lules endotelials de macrovasos. En aquest sentit, cal destacar que no hem pogut detectar la presència de GLUT3, proteïna per la que sí s'ha descrit la seva expressió en cèl·lules endotelials dels microvasos de la retina (Knott i Forrester, 1995). La proteïna GLUT1 que hem detectat té el pes molecular esperat per a la proteïna típica de cèl·lules endotelials, amb una glicosilació heterogènia que fa que es detecti com una banda ampla d'entre 60 i 50 kDa, amb un pes molecular més elevat que la proteïna detectada en membranes totals de cervell. Aquests resultats coincideixen amb els descrits per a cèl·lules endotelials procedents dels microvasos de cervell (Devaskar i col., 1991; Maher i col., 1993; Maher i col., 1994).

Com ja hem comentat, les cèl·lules ECV304 no responen a la hiperglucèmia modificant el transport de glucosa (assajat com a transport de l'anàleg 3-O-Metilglucosa), ni modificant la quantitat d'mRNA, de la proteïna, o la localització subcel·lular de GLUT1. El mateix resultat va ser obtingut per Kaiser i col. (Kaiser i col., 1993), utilitzant cèl·lules endotelials d'aorta bovina. La diferència amb aquests autors, és que Kaiser i col. tampoc troben cap diferència en la captació de l'anàleg de la glucosa 2-deoxiglucosa, anàleg que sí pot patir el primer pas en la metabolització de la glucosa, la fosforilació per part del'hexoquinasa. Els nostres resultats sí mostren una inhibició en la captació de 2-DOG per part de la hiperglucèmia, inhibició que, per les dades obtingudes de la modificació en la relació 2-DOG-P/2-DOG, sembla ser deguda a una inhibició de l'hexoquinasa. Aquest resultat bé confirmat pel fet que la inhibició que hem trobat es deu a una modificació de la V_{max} , sense canvis en la K_m . Aquest catalitza la formació de glucosa 6-fosfat (o 2-DOG-P) a partir de glucosa i ATP, i és ben conegut que és inhibït alostèricament per la glucosa 6-fosfat. El mecanisme que provoca la disminució de l'activitat en les cèl·lules ECV304, és, fins el moment, desconegut. Que sigui una inhibició directa per un augment en la concentració de glucosa 6-fosfat sembla difícil, ja que la inhibició no es dona clarament fins a les 6 hores de preincubació en el medi amb alta concentració de glucosa, i sembla difícil que una inhibició per augment dels nivells de glucosa 6-fosfat requereixi de temps tant llargs. Desconeixem quins són els isoenzims d'hexoquinasa que s'expressen a la cèl·lula ECV304. Fins el moment s'han descrit 4 isoformes d'aquest enzim diferents (HK I-IV), codificades per gens diferents i amb diferents característiques cinètiques, d'inhibició, i de patró d'expressió. S'ha descrit, per exemple, que la inhibició per part de la glucosa 6-fosfat no es dona en el cas de la isoforma IV (la també anomenada glucoquinasa), mentre que sí s'ha descrit, per aquesta isoforma, l'existència d'un inhibidor protèic. Per un altre costat, s'ha descrit que l'hexoquinasa pot ser soluble, o bé associada a la membrana de la mitocòndria. Aquesta darrera és mensy sensible a la inhibició per part de la glucosa 6-fosfat, i té la possibilitat d'utilitzar l'ATP generat en aquest orgànul, de manera que se la considera la forma més activa. S'han descrit situacions que regulen l'activitat de l'hexoquinasa modificant la relació de l'enzim lligat a la mitocòndria respecte el soluble. Un mecanisme similar a aquest podria ser el que es dona a les cèl·lules ECV304. De qualsevol manera, el mecanisme responsable de la repressió/desrepressió ha de ser asimètric, ja que els temps que hem trobat als que es dona la inhibició en la captació de 2-DOG per la hiperglucèmia són molt més llargs que els temps requerits perquè desapareixi la inhibició al tornar a un medi 5,5 mM glucosa, i a més, ha de ser independent de la síntesi de proteïnes, ja que la inhibició s'observa també quan hem incubat les cèl·lules en presència de cicloheximida.

Un altre punt a tenir en compte, és la dosi resposta que hem trobat per a la inhibició. Com es pot apreciar a la Fig.?, la inhibició de la captació de 2-DOG no es dona fins a concentracions molt altes de glucosa en el medi (entre 20 i 30 mM). En canvi, no hi ha cap inhibició al passar d'un medi sense glucosa a un amb una concentració de 2-10 mM. Aquesta forma de la corva és completament diferent de la que s'acostuma a trobar en altres models cel·lulars, com per exemple, a les cèl·lules de la glia (Walker i col., 1988), a mioblasts L6 (Walker i col., 1989) o en adipòcits 3T3-L1 (Tordjman i col., 1990). Sembla, doncs, que les cèl·lules endotelials dels macrovasos són menys sensibles a petits canvis en la concentració de glucosa, pel que fa a la modificació del transport de glucosa. Podria ser que això fos degut a l'exposició, per part d'aquestes cèl·lules a les condicions canviants de glucosa en els vasos.

2. TRANSPORT DE GLUCOSA I EXPRESSIÓ DE TRANSPORTADORS EN CEL·LULES MUSCULARS SOL8. EFECTE DE LA WORTMANINA.

Com hem vist, les cèl·lules Sol8 mimetitzen perfectament, pel que fa a l'expressió protèica de transportadors de glucosa, el que s'observa en el múscul esquelètic. Així, expressen només el transportador GLUT1 en l'etapa de mioblasts, de manera idèntica al que fa el múscul fetal (Castelló i col., 1993). Amb la diferenciació, comencen a expressar l'mRNA i la proteïna per a GLUT4 de manera gradual, fins arribar a un màxim amb el màxim de diferenciació que hem assolit. També en aquest aspecte coincideix aquest comportament perfectament amb l'increment en l'expressió observada en múscul de GLUT4 amb el desenvolupament (Santalucía i col., 1992). Fins el moment, només s'havia descrit un altre model cel·lular de múscul esquelètic que expressés GLUT4 amb la diferenciació. Es tracta de la línia cel·lular L6. Aquesta, però, té la particularitat d'expressar també GLUT3, transportador que no està clar si disminuiria o mantindria la seva expressió amb la diferenciació (Xia i col., 1993; Bilan i col., 1992). Per un altre costat, tampoc està clar si l'aparició de GLUT3 és el reflexe d'una expressió real en algun moment del desenvolupament del múscul, o si es tracta merament d'un artefacte del cultiu "in vitro". Malgrat haver-se clonat a partir d'una llibreria de múscul esquelètic fetal humà (Kayano i col., 1988), mai s'ha pogut detectar la seva presència ni en múscul adult (Kayano i col., 1988; Haber i col., 1993; Shepherd i col., 1992), ni en múscul fetal (Castelló i Zorzano, dades no publicades). Curiosament, mioblasts de fetus de rata de 19 dies en cultiu primari expressen transitòriament GLUT3: la seva expressió és baixa en mioblasts de fetus, puja

al fusionar-se les cèl·lules per formar miofibrils, i disminueix en els miofibrils contràctils (Guillet-Deniau i col., 1994). Aquests resultats semblen indicar que si GLUT3 realment s'expresses en el múscul, seria al llarg d'un període molt concret del desenvolupament. Les cèl·lules Sol8 no imiten el comportament observat en el múscul "in vivo" en el desenvolupament pel que fa a l'mRNA de GLUT1. Així, mentre que en el múscul l'mRNA disminueix (Castelló i col., 1993), en les cèl·lules Sol8 no ho fa, manté els nivells estables. Això implica que han d'existir mecanismes alternatius, a nivell de l'estabilitat de la proteïna GLUT1, que provoquin la clara disminució observada amb la diferenciació. Mecanismes d'aquest tipus ja s'ha postulat que existirien per tal d'explicar les diferències entre la proteïna i l'mRNA pel que fa a GLUT4 i el dejuni en múscul vermell (Camps i col., 1992), o pel que fa a GLUT1 i la transformació cel·lular (Shawver i col., 1987).

Els resultats obtinguts de mesurar la captació de 2-deoxiglucosa en miofibrils o miofibrils Sol8, indiquen que amb la diferenciació, el transport basal de glucosa disminueix. Això està d'acord amb el fet que la proteïna encarregada del transport basal, GLUT1, disminueix la seva expressió, i està d'acord amb els resultats obtinguts en cèl·lules L6 (Mitsumoto i col., 1991). La diferència està quan s'evalua l'efecte de la insulina. Així, com hem vist, la insulina estimula la captació de 2-deoxiglucosa a les cèl·lules Sol8, però curiosament ho fa tant en miofibrils com en miofibrils, i amb un efecte molt similar en tots dos casos. L'efecte és petit, però és del mateix ordre que el trobat en les L6. Per un altre costat, que la insulina també estimuli el transport de glucosa en els miofibrils, implica que l'únic transportador expressat en aquests, GLUT1, ha de ser el responsable. Quin pot ser el mecanisme encara és desconegut, però ja s'ha descrit que la insulina estimula la seva translocació en adipòcits de rata (Zorzano i col., 1989), i en adipòcits 3T3-L1 (Gould i col., 1989; Calderhead i col., 1990; Verhey i col., 1995), en fibroblasts 3T3-L1 (Harrison i col., 1990), en cèl·lules CHO (Hara i col., 1994) i en miofibrils L6 (Robinson i col., 1993), de manera que molt possiblement en els miofibrils Sol8 podria passar quelcom similar, encara que efectes de la insulina sobre l'activitat intrínseca del transportador no es poden descartar.

Com ja hem comentat, en l'acció de la insulina estimulants el transport de glucosa s'ha implicat l'activitat de la fosfatidilinositol 3'quinasa (PI3K) (Hara i col., 1994; Clarke i col., 1994; Cheatham i col., 1994; Okada i col., 1994). Aquesta estimulació es deu tant a la translocació de GLUT4 (Cheatham i col., 1994, Herbst i col., 1995), com de GLUT1 (Hara i col., 1994). Donat que en el nostre cas, tant els miofibrils com els miofibrils Sol8 responien a la insulina incrementant el transport de glucosa, i l'estimulació era del mateix ordre, ens

vàrem preguntar si aquest efecte podia ser també depenent de l'activitat de la PI3K. Com hem pogut observar (Figures 24 i 25), tant en el cas dels mioblasts, com en el dels miotubs, l'acció de la insulina és completament bloquejada per l'acció de la wortmanina, un inhibidor molt específic de la PI3K (Ui i col., 1995). Aquest resultat implica també en el cas dels mioblasts i miotubs Sol8 a la PI3K en la via de transsenyalització que acaba portant a l'estímul del transport de glucosa. Paral·lelament a aquest estudi, altres grups van descriure la implicació d'aquest enzim en aquesta mateixa via en miotubs L6 (Berger i col., 1994; Tsakiridis i col., 1995) i en múscul esquelètic. S'han descrit diferents isoformes de la PI3K. La isoforma implicada en la via de senyalització a partir del receptor de la insulina seria el dímer format per la subunitat p85 reguladora, i la subunitat p110 catalítica. Aquest dímer interacciona amb el receptor de la insulina i amb el seu principal substrat, la proteïna IRS-1, mitjançant la subunitat reguladora p85, a través de interaccions entre la zona SH2 d'aquesta i les fosfotirosines del receptor i d'IRS-1. Treballs recents, però, demostren que l'activació de la isoforma p85/p110 de la PI3K seria necessària però no suficient perquè es dongui l'activació de la translocació de GLUT-4, ja que aquesta estimulació mai es dona per part d'altres receptors que sí estimulen l'activitat de la PI3K o de la seva interacció amb IRS-1 (Isakoff i col., 1995).

Com es pot observar en els nostres resultats (Figures 24 i 25), tant en el cas dels mioblasts com en el dels miotubs, la wortmanina a més de disminuir l'acció de la insulina, també disminueix la captació basal de glucosa, més del 60% en tots dos casos. Aquesta disminució del transport basal de glucosa era sorprenent, i només havia estat descrita en adipòcits 3T3-L1 a l'utilitzar un altre dels inhibidors de la PI3K, el LY294002 (Cheatham i col., 1994). Donada la importància de l'efecte, es va voler comprovar mitjançant experiments d'immunofluorescència si s'afectava a la distribució subcel·lular de GLUT1. Con s'ha pogut observar (Figura 26), l'efecte de la wortmanina, en els mioblasts Sol8, és degut a que provoca el segrest de GLUT1 dins de la cèl·lula, disminuint molt la seva presència a la membrana plasmàtica. Aquest efecte és específic, ja que l'inhibidor no modifica la distribució de dues proteïnes típics marcadors de membrana plasmàtica, com són la $\beta 1$ -integrina i la subunitat $\alpha 1$ de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPasa}$. Un efecte d'aquesta mena només es pot deure a una inhibició de l'exocitosi (sense modificacions en l'endocitosi) o a un increment en la velocitat d'endocitosi (sense modificacions en la velocitat d'exocitosi). Resultats posteriors del grup de Holman en adipòcits 3T3-L1, han demostrat que la PI3K afecta a la velocitat d'exocitosi tant de GLUT1 com de GLUT4, disminuint-la la incubació amb wortmanina i sense canvis aparents en la velocitat d'endocitosi (Yang i col., 1996). Així, la PI3K estaria implicada, no només en l'estimulació de l'exocitosi de GLUT4 per part de la insulina, sinó

a més, en l'exocitosi constitutiva de determinades proteïnes, com els transportadors de glucosa. Un efecte en el mateix sentit s'ha observat també en el cas del receptor de la transferrina, en que també es bloqueja la seva exocitosi, sense efectes en l'endocitosi, per part d'inhibidors de la PI3K (Shepherd i col., 1995). No seria aquest l'únic paper de la PI3K en el control del tràfic de membranes. Així, s'ha implicat la existència d'una isoforma de la PI3K controlant l'arribada d'enzims hidrolítics (Brown i col., 1995; Davidson, 1995) o de proteïnes endocitades (Joly i col., 1995) als lisosomes. A més, en llevats s'ha trobat una isoforma de la PI3K, la proteïna VPS34, que és essencial per al tràfic de proteïnes a les vacuoles (Schu i col., 1993), un procés equivalent al tràfic de proteïnes des del trans-Golgi als lisosomes que té lloc a les cèl·lules dels mamífers. Una isoforma de la PI3K amb característiques semblants a les de la VPS34 ha estat clonada en mamífers, encara que la seva funció no està encara clara. Si una isoforma de la PI3K d'aquest tipus, està implicada o no en la inhibició per la wortmanina de l'exocitosi de GLUT1 en les cèl·lules Sol8 està, encara, per demostrar.

3. REGULACIO DE L'EXPRESSIO GENICA DE GLUT1 EN CEL·LULES L6E9. EFECTE DE LA DIFERENCIACIO SOBRE L'EXPRESSIO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIO SP1.

Com hem vist, les cèl·lules L6E9 són un fidel reflexe, des del punt de vista de l'expressió de transportadors de glucosa, de la línia cel·lular de la que es van originar, les L6. Així, a l'igual que passa en aquestes cèl·lules, les L6E9 expressen en l'estat de mioblast GLUT1 i GLUT3 (Mitsumoto i col., 1991; Bilan i col., 1992; Xia i col., 1993). Amb la diferenciació, l'expressió de GLUT1 i de GLUT3 disminueix, encara que no està clar si també passar el mateix en les cèl·lules L6 (Bilan i col., 1992; Xia i col., 1993), mentre que l'expressió de GLUT4 incrementa, com té lloc en les L6 (Mitsumoto i col., 1991). La disminució que té lloc en els nivells d'mRNA amb la diferenciació es va fer pensar en la seva utilització per a l'estudi dels mecanismes implicats en aquesta repressió. En aquest mateix sentit, es va estudiar si altres factors (en aquest cas, hormonals) que ja s'han descrit que afecten a l'expressió de GLUT1 en cèl·lules L6, o en altres models cel·lulars, afectaven la producció d'mRNA per a GLUT1. Com s'ha pogut observar, tant la insulina com l'anàleg de l'AMPc, el 8-bromo-AMPc, incrementen els nivells de l'mRNA per a GLUT1. Aquests resultats estan d'acord amb dades obtingudes en adipòcits 3T3-L1 (García de Herreros i Birnbaum, 1989; Tordjman i col., 1989), en adipòcits de rata en cultiu primari (Hajduch i col., 1992) i en miotubs L6 (Walker i col.,

1989; Wang i col., 1989) pel que fa al tractament crònic amb insulina, i en adipòcits 3T3-L1 pel que fa al tractament amb AMPc. Aquest efecte és el contrari a l'observat per GLUT4, en que el tractament amb tots dos factors provoca una disminució en els seus nivells. Aquests resultats indiquen que les variacions en els nivells d'AMPc podrien ser les responsables dels efectes observats en els nivells de transportadors de glucosa per part de la denervació del múscul esquelètic (Coderre i col., 1992; Castelló i col., 1993). Així, s'ha descrit que, amb la denervació, els nivells d'AMPc augmenten, el que sabem que en cèl·lules L6E9 provoca l'augment en els nivells de GLUT1, augment idèntic a l'observat en el múscul denervat.

L'efecte repressor de la diferenciació no es deu a modificacions en la vida mitja de l'mRNA de GLUT1, com el que ha estat descrit per a la insulina en cèl·lules L6 (Maher i Harrison, 1990). Així, la vida mitjana que es va trobar estava al voltant de les 5 hores, comparable al trobat per altres autors en cèl·lules L6 (Maher i Harrison, 1990). Es tracta d'un temps curt si el comparem amb el d'altres transportadors de glucosa, com GLUT4 (Ferré i Zorzano, dades no publicades), però esperable tenint en compte l'alt recanvi que esperem que tingui GLUT1. Més important, en cap temps dels assajats per calcular la caiguda d'mRNA, es va trobar cap disminució en la vida mitja de l'mRNA, vers al contrari, fins i tot en algun punt s'observava una pujada. Així, la caiguda en els nivells d'mRNA de GLUT1 s'han de deure a una modificació de la capacitat transcripcional del gen de GLUT1.

El troç de promotor assajat, de 2106 parells de bases a 5'de l'inici de transcripció, i 134 parells de bases a 3' del mateix punt, ha demostrat respondre a la diferenciació i al 8-Br-AMPc de la manera esperada, és a dir, incrementant la seva activitat amb l'anàleg de l'AMPc, i disminuint la seva activitat amb la diferenciació. Cal destacar que s'han descrit dues zones "enhancers" per al promotor de GLUT1, una situada entre -3,3 i -2,7 kilobases, i l'altra dins del primer intró, entre +16,7 i +18 kilobases (Murakami i col., 1992). Aquests "enhancers" s'han identificat com els responsables de la major resposta al sèrum, a l'estimulació per PDGF i a la transformació per l'oncogén ras (Murakami i col., 1992), de la resposta a la hipòxia i als inhibidors mitocondrials (Ebert i col., 1995) i, com veurem, de la resposta a insulina (Todaka i col., 1994). Per contra, el promotor que anomenarem "proximal", la zona compresa entre -2,1 kilobases i l'inici de transcripció i amb la que hem treballat, no respon a la hipòxia i poc a l'estimulació per sèrum o PDFD, però en canvi, sí respon i més que els "enhancers" a la transformació per l'oncogén src (Murakami i col., 1992). Quan amb aquest promotor proximal hem assajat l'efecte de la incbació crònica amb insulina (24 hores), no hem detectat cap

resposta. Com es pot apreciar en els "northern blots", la insulina estimula els nivells de GLUT1 més que no ho fa el 8-Br-AMPC (4 vegades per a la insulina, dues vegades per a l'AMPC). Però malgrat aquest increment, no té cap mena d'efecte sobre el troç de promotor assajat. Com ja hem comentat, la resposta es troba en la zona dels "enhancers", ja que s'ha demostrat que els elements de resposta a la insulina, en fibroblasts NIH/3T3, es troben dins d'aquests dos fragments, sense que es doni cap resposta en la zona del promotor proximal (Todaka i col., 1994).

Com hem vist en els experiments amb deleccions successives del promotor, mai hem pogut eliminar ni l'estimulació provocada per l'AMPC, ni la disminució provocada per la insulina. Amb un petit troç, de només 33 parells de bases a bans de l'inici de transcripció n'hi ha prou per conferir la regulació. Amb deleccions de la zona a 3'de l'inici de transcripció hem pogut descartar també, al menys en el cas de la diferenciació, que es pugui donar la regulació per elements presents en aquesta zona. Així, la disminució en la resposta provocada per la diferenciació, i molt probablement l'increment en l'activitat per part de l'AMPC, seran mitjançats per la zona de la caixa TATA. La caixa TATA és la més coneguda de les zones consens que permeten a la RNA polimerasa II, l'encarregada de transcriure tots els mRNAs, unir-se a un promotor i decidir en quina direcció tindrà lloc la transcripció (McKnight, 1996). La unió de la RNA polimerasa II al DNA vé donada per la formació d'un macrocomplex entre la polimerasa i un conjunt de proteïnes, els TFs, que són els que permetran tant la unió al DNA, com la seva activació per part dels diferents factors de transcripció. Dins dels TFs destaca el factor TFIID, que en realitat està format per un conjunt de proteïnes, bàsicament la TBP i les TAFs. La TBP és la "TATA-box binding protein", la proteïna que s'unirà a la caixa TATA. Una d'aquestes proteïnes podria ser la responsable de la disminució o increment de l'activitat transcripcional del promotor basal que hem analitzat. Pel cas de l'AMPC ja s'ha descrit un altre cas en el que va ser impossible mapar la zona responsable de l'activació, i els autors acabaven referint-se a una augmentada expressió de factors de transcripció generals (Christoffels i col., 1995). Per un altre costat, cal recordar la ubicuitat de GLUT1 i la seva rapidíssima regulació per part dels factors de creixement o de la transformació cel·lular. Podria ser que GLUT1, juntament amb altres factors, com Fos, fossin molt dependents de factors molt generals de la maquinària de síntesi d'mRNAs, factors que podrien veure modificada la seva quantitat o la seva activitat en situacions com la sortida de cicle cel·lular i/o la diferenciació. Cal més feina per acabar de quins factors podria tractar-se.

Com hem vist a l'analitzar el patró d'activitat basal de les diferents

construccions, l'activitat transcripcional es manté constant fins arribar a una zona entre -812 i -201, zona que quan és eliminada provoca un increment substancial (al voltant d'un 80%) de l'activitat. Aquest fet implica l'existència, en aquesta zona de 611 nucleòtids, d'un element repressor de l'activitat. Aquesta pateix una petita disminució al tallar 102 parells de bases (disminució al voltant del 15%), però és al tallar la zona entre -99 i -33 que l'activitat es veu reduïda substancialment (reducció del 80%). Cal tenir en compte, que la construcció -33/+134 només manté la caixa TATA i la zona a 3'de l'inici de transcripció. Aquest resultat indica que és en la zona compresa entre -99 i -33 on es maparien les seqüències responsables de la principal activitat d'aquest fragment del promotor. Analitzant aquesta zona es troben diferents seqüències consens per a diferents factors de transcripció molt coneguts, com són una zona d'unió a SP1, dues zones d'unió a AP2, i una zona d'unió a factors de la família C/EBP. Aquesta combinació d'elements SP1, caixes CAAT i la TATA s'han trobat a les proximitats de l'inici de transcripció de molts gens, i representen els elements essencials de la resposta "basal" del promotor.

Experiments de retardament en gel han permès comprovar l'existència de diferents complexos que s'unirien a aquesta zona del promotor de GLUT1, i mapar la regió on s'unirien. Podem dividir-los en tres grans famílies: una primera són els factors de movilitat inferior (As), de més alt pes molecular aparent i que mapen tots a la regió més a 5'del fragment. En aquesta zona és on es troba la seqüència consens per al factor de transcripció SP1 (Kadonaga i col., 1986). Mitjançant experiments de competició amb un oligonucleòtid comercial que contenia la seqüència consens per a SP1, i experiments de dependència d'ions Zn^{+2} , utilitzats àmpliament com a demostració de la participació de SP1 al ser un "zinc-finger" (Robidoux i col., 1992; Jensen i col., 1995), podem arribar a la conclusió que es tracta d'un factor de la família SP1, encara que manquen experiments per concloure amb tota exactitud de quin factor exactament es tracta. Per un altre costat, cotransfectant el promotor de GLUT1 amb un vector d'expressió per a SP1, s'observa una marcada estimulació de l'activitat del promotor, una prova més de que realment SP1 pot estar jugant un paper en l'activitat d'aquesta zona. Una segona família de complexos són els de movilitat superior, de menys pes molecular aparent i que hem mapat a la zona intermitja del fragment, els que hem anomenat complexos Ds. La zona on mapen coincideix exactament amb un putatiu element de resposta al factor AP2, però hem demostrat, mitjançant experiments de competició amb un oligonucleòtid comercial contenint la zona consens per a aquest factor de transcripció, que no pot tractar-se d'AP2. S'ha descrit, també en cèl·lules musculars, l'existència d'un factor que s'uniria a una zona molt semblant a l'ocupada per aquests complexos Ds. Es tracta de l'anomenat factor GBF (per

"GC binding factor"), que s'ha descrit en el promotor de la subunitat α del receptor de l'acetilcolina, gen que pateix una regulació pel desenvolupament i per la denervació molt semblant a la que pateix GLUT1 (Piette i col., 1989; Bessereau i co., 1993). Si es tracta d'aquest factor o d'algun altre està, encara, per esbrinar. Per últim, el darrer grup de factors són els que mapen a la zona mes a 3'del fragment, la zona de la caixa CAAT, i que hem anomenat complexes Cs. Per últim, només hi ha un complex que no hem pogut mapar. Es tracta del B, molt probablement perquè els oligonucleòtids deuen trencar la zona de reconeixement per aquest factor.

Com hem vist, el patró de retardament obtingut entre mioblasts i miotubs és molt diferent. Així, els complexes As, que hem identificat com a pertanyents a la família de SP1 desapareixen en el cas dels miotubs. A més, amb la diferenciació apareix un nou complex C, C2, a més del C1, i canvia el patró per als complexes Ds, disminuint la quantitat de complexes D1 i D2, i apareixent molt marcat el complex D3. Per últim, la banda B, l'única que no hem pogut mapar, també desapareix en els miotubs. Així, tenim una sèrie de complexes típics de mioblasts (As, B, D1 i D2), uns altres típics de miotubs (C2 i D3), i un darrer compartit en tots dos estadis (C1). La importància de cada un en el manteniment de l'activitat transcripcional està encara per evaluar. Aquests mateixos complexes apareixen en altres cèl·lules musculars evaluades, com són les Sol8 i les cèl·lules transfectades establement amb MyoD. Així, apareixen complexes de mides idèntiques i que mapen exactament en els mateixos llocs. A més, l'única banda identificada, les corresponents a SP1, també són desplaçades per la incubació amb altes concentracions d'un oligonucleòtid comercial per a SP1.

Com hem vist, els complexes As corresponen a membres de la família SP1. Amb la diferenciació, la capacitat d'unió d'aquests complexes desapareix. S'ha descrit que la capacitat d'unió al DNA per SP1 varia en funció del seu acomplexament amb altres proteïnes (Chen i col., 1994; Suzuki i col., 1995; Datta i col., 1995), del seu estat de fosforilació (Jackson i col., 1990; Leggett i col., 1995) i de la seva competència amb altres factors de transcripció per unir-se a un mateix lloc d'unió en el DNA (Ebert i Wong, 1995; Birnbaum i col., 1995). Per tal d'evaluar si la diferència entre mioblasts i miotubs, pel que fa a l'activitat dels complexes SP1, es devia a diferències en la capacitat d'unió, o a diferències en la quantitat de proteïna SP1 expressada, es van realitzar els assajos de "western blot". Aquests indiquen inequívocament que la disminució en la unió es deu, al menys en part, a una clara disminució en l'expressió de la proteïna SP1 en l'estat de mioblast. A més, aquesta disminució es deu a l'expressió de factors de la família MyoD, ja que en cèl·lules C3H10T1/2

transfectades establement amb MyoD però sense diferenciar, el que podríem anomenar mioblasts C3H10T1/2, l'expressió de SP1 ja es reprimeix quan la comparem amb la de fibroblasts salvatges.

SP1 ha estat considerat sempre un factor d'expressió ubíqua. Aquesta idea es té a partir dels resultats obtinguts amb experiments realitzats amb diferents línies cel·lulars en cultiu, però les evidències més directes són, si més no, poc concnordants amb aquesta idea. Així, SP1 s'ha comprovat que està regulat per l'estadi de desenvolupament (Saffer i col., 1991), expressant-se baixos nivells en cèl·lules en un estat de diferenciació alt, com per exemple en els teixits musculars. Altres autors també discrepen d'aquesta distribució ubíqua de SP1 (Robidoux i col., 1992). Pel que fa a les cèl·lules musculars, no s'havia examinat mai al nivell de l'expressió de la proteïna la quantitat amb l'estat de diferenciació, només s'havien estudiat les capacitats d'unió de factors que es pensava que eren SP1, però fins i tot per aquestes s'havia descrit una disminució en la capacitat d'unió al formar-se miotubs (Gustafson i Kedes, 1989). Possiblement, SP1 podria tenir un paper més actiu en estadis d'activa proliferació, el que estaria d'acord amb la seva expressió en cèl·lules no diferenciades i amb el seu paper activant l'expressió del promotor de GLUT1. A més, s'ha descrit la interacció de SP1 amb factors molt importants al llarg del cicle cel·lular, com la proteïna retinoblastoma (Chen i col., 1994) o la proteïna E2F.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Les cèl·lules endotelials ECV304 no modifiquen ni en el transport de glucosa, ni en l'expressió o distribució subcel·lular de GLUT1, l'únic transportador de glucosa expressat en aquestes cèl·lules en resposta a la hiperglucèmia. En canvi, sí es produeix una disminució en la capacitat de fosforilar glucosa en les cèl·lules incubades en altes concentracions de glucosa, alteració provocada molt probablement per una inhibició de l'hexoquinasa.

2. Les cèl·lules musculars Sol8 expressen GLUT1 en l'estat de mioblast. Amb la diferenciació s'indueix l'expressió de l'mRNA i de la proteïna GLUT4, mentre que l'expressió de la proteïna GLUT1 disminueix, sense canvis en la quantitat d'mRNA. La insulina provoca un increment en el transport de glucosa del mateix ordre tant en mioblasts com en miotubs. L'acció de la insulina en tots dos models cel·lulars és inhibida per la wortmanina, inhibidor de la PI3K. A més, la wortmanina provoca una disminució en la captació basal de glucosa, disminució provocada per una major internalització de GLUT1, el que implica a la PI3K en el mecanisme de recanvi d'aquest transportador de glucosa.

3. Les cèl·lules musculars L6E9 expressen GLUT1 i GLUT3 en l'estat de mioblast. Amb la diferenciació disminueix l'expressió gènica de tots dos transportadors, mentre que incrementa l'expressió de GLUT4. Tant la insulina com l'AMPc estimulen l'expressió de GLUT1 en els mioblasts, sense canvis en els miotubs. En aquestes condicions, un fragment de 2240 parells de bases del promotor de GLUT1 va respondre a la diferenciació disminuint la seva activitat, i a l'AMPc incrementant-la. L'estimulació o repressió de l'activitat del promotor es va mantenir al llarg de totes les deleccions practicades en el promotor, fins arribar a un fragment de -33 parells de bases. Per un altre costat, la màxima activitat basal del promotor es deu, majoritàriament, a la zona compresa entre els nucleòtids -99 i -33. En aquesta zona s'ha evidenciat la unió de diferents factors, mapats en tres zones majoritàries i que també s'expressen en altres línies musculars. La seva unió es veu modificada per l'estat de diferenciació. S'ha identificat la presència d'un factor de la família Sp1, factor que estimula l'activitat transcripcional del promotor de GLUT1.

4. El factor de transcripció Sp1 veu disminuïda tant la seva expressió protèica com la seva unió a DNA per la diferenciació muscular. Aquesta disminució està provocada per l'expressió de factors de la família MyoD.

BIBLIOGRAFIA

Allard, W.J., Gibbs, E.M., Witters, L.A. & Lienhard, G.E. (1987) "The glucose transporter in human fibroblasts is phosphorylated in response to phorbol ester but not in response to growth factors". *Biochim. Biophys. Acta* 929, 288-295.

Asano, T., Takata, K., Katagiri, H., Tsukuda, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Hirano, H., Yazaki, Y. & Oka, Y. (1992) "Domains responsible for the differential targeting of glucose transporter isoforms". *J. Biol. Chem.* 267, 19636-19641.

Asano, T., Takata, K., Katagiri, H., Ishihara, H., Inukai, K., Anai, M., Hirano, H., Yazaki, Y. & Oka, Y. (1993) "The role of N-glycosylation in the targeting and stability of GLUT1 glucose transporter". *FEBS Lett.* 324, 258-261.

Asano, T., Katagiri, H., Takata, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Tsukuda, K., Kikuchi, M., Hirano, H., Yazaki, Y. & Oka, Y. (1991) "The role of N-glycosylation of GLUT-1 for glucose transport activity". *J. Biol. Chem.* 266, 24632-24636.

Asano, T., Katagiri, H., Tsukuda, K., Lin, J.L., Ishihara, H., Inukai, K., Yazaki, Y. & Oka, Y. (1992) "Glucose binding enhances the papain susceptibility of the intracellular loop of the GLUT1 glucose transporter". *FEBS Lett.* 298, 129-132.

Baldwin, S.A. (1993). "Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins". *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 17-49.

Barnett, J.E.G., Holman, G.D., Chalkley, R.A. & Munday, K.A. (1975) "Evidence for two asymmetric conformational states in the human erythrocyte sugar-transport system". *Biochem. J.* 145, 417-429.

Bashan, N., Burdett, E., Gumà, A., Sargeant, R., Tumiati, L., Liu, Z. & Klip, A. (1993) "Mechanisms of adaptation of glucose transporters to changes in the oxidative chain of muscle and fat cells". *Am. J. Physiol.* 264, C430-C440.

Bashan, N., Burdett, E., Hundal, H.S. & Klip, A. (1992) "Regulation of glucose transport and GLUT1 glucose transporter expression by O₂ in muscle cells in culture". *Am. J. Physiol.* 262, C682-C690.

Begum, N. & Draznin, B. (1992) "Effect of streptozotocin-induced diabetes on GLUT-4 phosphorylation in rat adipocytes". *J. Clin. Invest.* 90, 1254-1262.

- Begum,N., Leitner,W., Reusch,J.E.B., Sussman,K.E. & Draznin,B. (1993) "GLUT-4 phosphorylation and its intrinsic activity". *J. Biol. Chem.* 268, 3352-3356.
- Bell,G.I., Burant,C.F., Takeda,J. & Gould,G.W. (1993) "Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters". *J. Biol. Chem.* 268, 19161-19164.
- Berger,J., Hayes,N., Szalkowski,D.M. & Zhang,B. (1994) "PI 3-kinase activation is required for insulin stimulation of glucose transport into L6 myotubes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 570-576.
- Bessereau,J.L., Mendelzon,D., LePoupon,C., Fiszman,M., Changeux,J.P. & Piette,J. (1993) "Muscle-specific expression of the acetylcholine receptor α -subunit gene requires both positive and negative interactions between myogenic factors, Sp1 and GBF factors". *EMBO J.* 12, 443-449.
- Bibi,E. & Kaback,H.R. (1990) "In vivo expression of the lacY gene in two segments leads to functional lac permease". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4325-4329.
- Bilan,P.J., Mitsumoto,Y., Maher,F., Simpson,I.A. & Klip,A. (1992) "Detection of the GLUT3 facilitative glucose transporter in rat L6 muscle cells: regulation by cellular differentiation, insulin and insulin-like growth factor-I". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 1129-1137.
- Birnbaum,M.J., Haspel,H.C. & Rosen,O.M. (1986) "Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5784-5788.
- Birnbaum,M.J., Haspel,H.C. & Rosen,O.M. (1987) "Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription". *Science* 235, 1495-1498.
- Birnbaum,M.J. (1989) "Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein". *Cell* 57, 305-315.
- Birnbaum,M.J., van Wijnen,A.J., Odgren,P.R., Last,T.J., Suske,G., Stein,G.S. & Stein,J.L. (1995) "Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3". *Biochemistry* 34, 16503-16508.

Birnbaum, M.J. (1992) "The insulin-sensitive glucose transporter". *Int. Rev. Cytol.* 137B, 239-297.

Bramwell, M.E., Davies, A. & Baldwin, S.A. "Heterogeneity of the glucose transporter in malignant and suppressed hybrid cells". *Exp. Cell Res.* 188, 97-104.

Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P. & Tjian, R. (1986) "Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, SP1". *Science* 234, 47-52.

Brown, W.J., DeWald, D.B., Emr, S.D., Plutner, H. & Balch, W.E. (1995) "Role for phosphatidylinositol 3-kinase in the sorting and transport of newly synthesized lysosomal enzymes in mammalian cells". *J. Cell Biol.* 130, 781-796.

Burant, C.F. & Bell, G.I. (1992) "Mammalian facilitative glucose transporters: Evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins". *Biochemistry* 31, 10414-10420.

Burant, C.F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G.I. & Davidson, N.O. (1992) "Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5". *J. Biol. Chem.* 267, 14523-14526.

Burnol, A.F., Ferre, P., Leturque, A. & Girard, J. (1987) "Effect of insulin on in vivo glucose utilization in individual tissues of anesthetized lactating rats". *Am. J. Physiol.* 252, E183-E188.

Burnol, A.F., Leturque, A., Loizeau, M., Postic, C. & Girard, J. (1990) "Glucose transporter expression in rat mammary gland". *Biochem. J.* 270, 277-279.

Cagliero, E., Roth, T., Roy, S. & Lorenzi, M. (1991) "Characteristics and mechanisms of high-glucose-induced overexpression of basement membrane components in cultured human endothelial cells". *Diabetes* 40, 102-110.

Cairns, M.T., Elliot, D.A., Scudder, P.R. & Baldwin, S.A. (1984) "Proteolytic and chemical dissection of the human erythrocyte glucose transporter". *Biochem. J.* 221, 179-188.

Cairns, M.T., Alvarez, J., Panico, M., Gibbs, A.F., Morris, H.R., Chapman, D. & Baldwin, S.A. (1987) "Investigation of the structure and function of the

human erythrocyte glucose transporter by proteolytic dissection". *Biochim. Biophys. Acta* 905, 295-310.

Calderhead, D.M., Kitagawa, K., Tanner, L.I., Holman, G.D. & Lienhard, G.E. (1990) "Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes". *J. Biol. Chem.* 265, 13800-13808.

Camps, M., Castelló, A., Muñoz, P., Monfar, M., Testar, X., Palacín, M. & Zorzano, A. (1992) "Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues". *Biochem. J.* 282, 765-772.

Carruthers, A. & Helgerson, A.L. (1991) "Inhibitors of sugar transport produced by ligands binding at opposite sides of the membrane. Evidence for simultaneous occupation of the carrier by maltose and cytochalasin B". *Biochemistry* 30, 3907-3915.

Carruthers, A. (1986) "ATP regulation of the human red cell sugar transporter". *J. Biol. Chem.* 261, 11028-11037.

Castelló, A., Cadefau, J., Cussó, R., Testar, X., Hesketh, J.E., Palacín, M. & Zorzano, A. (1993) "GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporter expression is differentially regulated by contractile activity in skeletal muscle". *J. Biol. Chem.* 268, 14998-15003.

Clancy, B.M., Harrison, S.A., Buxton, J.M. & Czech, M.P. (1991) "Protein synthesis inhibitors activate glucose transport without increasing plasma membrane glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes". *J. Biol. Chem.* 266, 10122-10130.

Clark, A.E. & Holman, G.D. (1990) "Exofacial photolabelling of the human erythrocyte glucose transporter with an azitrifluoroethylbenzoyl-substituted bismannose". *Biochem. J.* 269, 615-622.

Clarke, J.F., Young, P.W., Yonezawa, K., Kasuga, M. & Holman, G.D. (1994) "Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin". *Biochem. J.* 300, 631-635.

Clarke, J.F., Young, P.W., Yonezawa, K., Kasuga, M. & Holman, F.D. (1994) "Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the

phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin". *Biochem. J.* 300, 631-635.

Coderre,L., Monfar,M.M., Chen,K.S., Heydrick,S.J., Kurowski,T.G., Ruderman,N.B. & Pilch,P.F. (1992) "Alteration in the expression of GLUT-1 and GLUT-4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscles". *Endocrinol.* 131, 1821-1825.

Cope,D.L., Holman,G.D., Baldwin,S.A. & Wolstenholme,A.J. (1994) "Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter". *Biochem. J.* 300, 291-294.

Cornelius,P., Marlowe,M., Lee,M.D. & Pekala,P.H. (1990) "The growth factor-like effects of tumor necrosis factor- α . Stimulation of glucose transport activity and induction of glucose transporter and immediate early gene expression in 3T3-L1 preadipocytes". *J. Biol. Chem.* 265, 20506-20516.

Cornelius,P., Marlowe,M., Call,K. & Pekala,P.H. (1991) "Regulation of glucose transport as well as glucose transporter and immediate early gene expression in 3T3-L1 preadipocytes by 8-Bromo-cAMP". *J. Cell. Physiol.* 146, 298-308.

Czech,M.P., Clancy,B.M., Pessino,A., Woon,C.W. & Harrison,S.A. (1992) "Complex regulation of simple sugar transport in insulin-responsive cells". *Trends Biochem. Sci.* 17, 197-201.

Challier,J., Hauguel,S. & Desmaizieres,V. (1986) "Effect of insulin on glucose uptake and metabolism in the human placenta". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, 803-807.

Cheatham,B., Vlahos,C.J., Cheatham,L., Wang,L., Blenis,J. & Kahn,C.R. (1994). "Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation". *Mol. Cell. Biol.* 14, 4902-4911.

Chen,L.I., Nishinaka,T., Kwan,K., Kitabayashi,I., Yokoyama,K., Fu,Y.F., Grunwald,S. & Chiu,R. (1994) "The retinoblastoma gene product RB stimulates Sp1-mediated transcription by liberating Sp1 from a negative regulator". *Mol. Cell. Biol.* 14, 4380-4389.

Chin,J.J., Jung,E.K.Y., Chen,V. & Jung,C.Y. (1987) "Structural basis of

human erythrocyte glucose transporter function in proteoliposome vesicles: Circular dichroism measurements". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4113-4116.

Chin, J.J., Jhun, B.H. & Jung, C.Y. (1992) "Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function: pH effects on intrinsic fluorescence". *Biochemistry* 31, 1945-1951.

Chin, J.J., Jung, E.K.Y. & Jung, C.Y. (1986) "Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in reconstituted vesicles". *J. Biol. Chem.* 261, 7107-7104.

Christoffels, V.M., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M. & Lamers, W.H. (1995) "The far-upstream enhancer of the carbamoyl-phosphate synthetase I gene is responsible for the tissue specificity and hormone inducibility of its expression". *J. Biol. Chem.* 270, 24932-24940.

Datta, P.K., Raychaudhuri, P. & Bagchi, S. (1995) "Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription". *Mol. Cell. Biol.* 15, 5444-5452.

Davidson, H.W. (1995) "Wotmannin causes mistargeting of procathepsin D. Evidence for the involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase in vesicular transport to lysosomes". *J. Cell Biol.* 130, 797-805.

Davies, A., Meeran, K., Cairns, M.T. & Baldwin, S.A. (1987) "Peptide-specific antibodies as probes of the orientation of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane". *J. Biol. Chem.* 262, 9347-9352.

Davis, R.L., Weintraub, H. & Lassar, A.B. (1987) "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts". *Cell* 51, 987-1000.

De Vivo, D.C., Trifiletti, R.R., Jacobson, R.I., Ronen, G.M., Behmand, R.A. & Harik, S.I. (1991) "Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay". *New England J. Med.* 325, 703-709.

Devaskar, S., Zahm, D.S., Holtzclaw, L., Chundu, K. & Wadzinski, B.E. (1991) "Developmental regulation of the distribution of rat brain insulin-insensitive (Glut 1) glucose transporter". *Endocrinology* 129, 1530-1540.

Dimitrakoudis, D., Vranic, M. & Klip, A. (1992) "Effects of hyperglycemia on

glucose transporters of the muscle: Use of the renal glucose reabsorption inhibitor phlorizin to control glycemia". *J. Am. Soc. Nephrol.* 3, 1078-1091.

Dimitrakoudis,D., Ramlal,T., Rastogi,S., Vranic,M. & Klip,A. (1992) "Glycaemia regulates the glucose transporter number in the plasma membrane of rat skeletal muscle". *Biochem. J.* 284, 341-348.

Ebert,B.L., Firth,J.D. & Ratcliffe,P.J. (1995) "Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences". *J. Biol. Chem.* 270, 29083-29089.

Ebert,S.N. & Wong,D.L. (1995) "Differential activation of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene by Sp1 and Egr-1". *J. Biol. Chem.* 270, 17299-17305.

Edwards,P.A.W. (1973) "The inactivation by fluorodinitrobenzene of glucose transport across th human erythrocyte membrane. The effect of glucose inside or outside the cell". *Biochim. Biophys. Acta* 307, 415-418.

Fischbarg,J., Kuang,K., Vera,J.C., Arant,S., Silverstein,S.C., Loike,J. & Rosen,O.M. (1990) "Glucose transporters serve as water channels". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3244-3247.

Flier,J.S., Mueckler,M.M., Usher,P. & Lodish,H.F. (1987) "Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras and src oncogenes". *Science* 235, 1492-1495.

Friendlander,M., Brooks,P.C., Shaffer,R.W., Kincaid,C.M., Varner,J.A. & Cheresch,D.A. (1995) "Definition of two angiogenic pathways by distinct α V integrins". *Science* 270, 1500-1502.

Fukumoto,H., Seino,S., Imura,H., Seino,Y. & Bell,G.I. (1988) "Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene". *Diabetes* 37, 657-661.

Fukumoto,H., Kayano,T., Buse,J.B., Edwards,Y., Pilch,P.F., Bell,G.I. & Seino,S. (1989) "Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-reponsive tissues". *J. Biol. Chem.* 264, 7776-7779.

García de Herreros,A. & Birnbaum,M.J. (1989) "The regulation by insulin of

glucose transporter gene expression in 3T3 adipocytes". *J. Biol. Chem.* 264, 9885-9890.

Garcia, J.C., Strube, M., Leingang, K., Keller, K. & Mueckler, M.M. (1992) "Amino acid substitutions at tryptophan 388 and tryptophan 412 of the HepG2 (GLUT1) glucose transporter inhibit transport activity and targeting to the plasma membrane in *Xenopus* oocytes". *J. Biol. Chem.* 267, 7770-7776.

Gibbs, A.F., Chapman, D. & Baldwin, S.A. (1988) "Proteolytic dissection as a probe of conformational changes in the human erythrocyte glucose transport protein". *Biochem. J.* 256, 421-427.

Gibbs, E.M., Allard, W.J. & Lienhard, G.E. (1986) "The glucose transporter in 3T3-L1 adipocytes is phosphorylated in response to phorbol ester but not in response to insulin". *J. Biol. Chem.* 261, 16597-16603.

Gorga, F.R. & Lienhard, G.E. (1982) "Changes in the intrinsic fluorescence of the human erythrocyte monosaccharide transporter upon ligand binding". *Biochem.* 21, 1905-1908.

Gould, G.W. & Holman, G.D. (1993) "The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression". *Biochem. J.* 295, 329-341.

Gould, G.W., Derechin, V., James, D.E., Tordjman, K., Ahern, S., Gibbs, E.M., Lienhard, G.E. & Mueckler, M. (1989) "Insulin-stimulated translocation of the HepG2/Erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes". *J. Biol. Chem.* 264, 2180-2184.

Greco-Perotto, R., Wertheimer, E., Jeanrenaud, B., Cerasi, E. & Sasson, S. (1992) "Glucose regulates its transport in L8 myocytes by modulating cellular trafficking of the transporter GLUT-1". *Biochem. J.* 286, 157-163.

Guillet-Deniau, I., Leturque, A. & Girard, J. (1994) "Expression and cellular localization of glucose transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT4) during differentiation of myogenic cells isolated from rat fetuses". *J. Cell Science* 107, 487-496.

Gustafson, T.A. & Kedes, L. (1989) "Identification of multiple proteins that interact with functional regions of the human cardiac α -actin promoter". *Mol. Cell. Biol.* 9, 3269-3283.

Hajduch,E.J., Guerre-Millo,M.C., Hainault,I.A., Guichard,C.M. & Lavau,M.M. (1992) "Expression of glucose transporters (GLUT1 and GLUT4) in primary cultured rat adipocytes: differential evolution with time and chronic insulin effect". *J. Cell. Biochem.* 49, 251-258.

Hakimian,J. & Ismail-Beigi,F. (1991) "Enhancement of glucose transport in Clone 9 cells by exposure to alkaline pH: Studies on potential mechanisms". *J. Mem. Biol.* 120, 29-39.

Haney,P.M., Levy,M.A., Strube,M.S. & Mueckler,M. (1995) "Insulin-sensitive targeting of the GLUT4 glucose transporter in L6 myoblasts is conferred by its COOH-terminal cytoplasmic tail". *J. Cell Biol.* 129, 641-658.

Haney,P.M., Slot,J.W., Piper,R.C., James,D.E. & Mueckler,M. (1991) "Intracellular targeting of the insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) is isoform specific and independent of cell type". *J. Cell Biol.* 114, 689-699.

Hara,K., Yonezawa,K., Sakaue,H., Ando,A., Kotani,K., Kitamura,T., Kitamura,Y., Ueda,H., Stephens,L., Jackson,T.R., Hawkins,P.T., Dhand,R., Clark,A.E., Holman,G.D., Waterfield,M.D. & Kasuga,M. (1994) "1-phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for ras activation in CHO cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7415-7419.

Harik,S.I., Kalaria,R.N., Andersson,L., Lundahl,P. & Perry,G. (1990) "Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: Abundance in tissues with barrier functions". *J. Neurosci.* 10, 3862-3872.

Harrison,S.A., Buxton,J.M., Clancy,B.M. & Czech,M.P. (1991) "Evidence that erythroid-type glucose transporter intrinsic activity is modulated by cadmium treatment of mouse 3T3-L1 cells". *J. Biol. Chem.* 266, 19438-19449.

Harrison,S.A., Buxton,J.M., Clancy,B.M. & Czech,M.P. (1990) "Insulin regulation of hexose transport in mouse 3T3-L1 cells expressing the human HepG2 glucose transporter". *J. Biol. Chem.* 265, 20206-20116.

Hashiramoto,M., Kadowaki,T., Clark,A.E., Muraoka,A., Momomura,K., Sakura,H., Tobe,K., Akanuma,Y., Yazaki,Y., Holman,G.D. & Kasuga,M. (1992) "Site-directed mutagenesis of GLUT1 in helix 7 residue 282 results in perturbation of exofacial ligand binding". *J. Biol. Chem.* 267, 17502-17507.

Haspel,H.C., Wilk,E.W., Birnbaum,M.J., Cushman,S.W. & Rosen,O.M. (1986) "Glucose deprivation and hexose transporter polypeptides of murine fibroblasts". *J. Biol. Chem.* 261, 6778-6789.

Haspel,H.C., Mynarcik,D.C., Ortiz,P.A., Honkanen,R.A. & Rosenfeld,M.G. (1991) "Glucose deprivation induces the selective accumulation of hexose transporter protein GLUT-1 in the plasma membrane of normal rat kidney cells". *Mol. Endocrinol.* 5, 61-72.

Haspel,H.C., Birnbaum,M.J., Wilk,E.W. & Rosen,O.M. (1985) "Biosynthetic precursors and in vitro translation products of the glucose transporter of human hepatocarcinoma cells, human fibroblasts, and murine preadipocytes". *J. Biol. Chem.* 260, 7219-7225.

Haspel,H.C., Rosenfeld,M.G. & Rosen,O.M. (1988) "Characterization of antisera to a synthetic carboxyl-terminal peptide of the glucose transporter protein". *J. Biol. Chem.* 263, 398-403.

Hebert,D.N. & Carruthers,A. (1991) "Cholate-solubilized erythrocyte glucose transporters exist as a mixture of homodimers and homotetramers". *Biochemistry* 30, 4654-4658.

Hebert,D.N. & Carruthers,A. (1992) "Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function". *J. Biol. Chem.* 267, 23829-23838.

Hediger,M.A. & Rhoads,D.B. (1994) "Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters". *Physiol. Rev.* 74, 993-1026.

Herbst,J.J., Andrews,G.C., Contillo,L.G., Singleton,D.H., Genereux,P.E., Gibbs,E.M. & Lienhard,G.E. (1995) "Effect of the activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a thiophosphotyrosine peptide on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes". *J. Biol. Chem.* 270, 26000-26005.

Hiraki,Y., Rosen,O.M. & Birnbaum,M.J. (1988) "Growth factors rapidly induce expression of the glucose transporter gene". *J. Biol. Chem.* 263, 13655-13662.

Holman,G.D., Kozka,I.J., Clark,A.E., Flower,C.J., Saltis,J., Habberfield,A.D., Simpson,I.A. & Cushman,S.W. (1990) "Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel". *J. Biol. Chem.* 265, 18172-18179.

Horner,H.C., Munck,A. & Lienhard,G.E. (1987) "Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts". *J. Biol. Chem.* 262, 17696-17702.

Hresko,R.C., Murata,H., Marshall,B.A. & Mueckler,M. (1994) "Discrete structural domains determine differential endoplasmic reticulum to Golgi transit times for glucose transporter isoforms". *J. Biol. Chem.* 269, 32110-32119.

Hresko,R.C., Kruse,M., Strube,M. & Mueckler,M. (1994) "Topology of the GLUT1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis". *J. Biol. Chem.* 269, 20482-20488.

Hudson,A.W., Ruiz,M.L. & Birnbaum,M.J. (1992) "Isoform-specific subcellular targeting of glucose transporters in mouse fibroblasts". *J. Cell Biol.* 116, 785-797.

Inukai,K., Asano,T., Katagiri,H., Anai,M., Funaki,M., Ishihara,H., Tsukuda,K., Kikuchi,M., Yazaki,Y. & Oka,Y. (1994) "Replacement of both tryptophan residues at 388 and 412 completely abolished cytochalasin B photolabelling of the GLUT1 glucose transporter". *Biochem. J.* 302, 355-361.

Isakoff,S.J., Taha,C., Rose,E., Marcusohn,J., Klip,A. & Skolnik,E.Y. (1995) "The inability of phosphatidylinositol 3-kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10247-10251.

Jackson,S.P., MacDonald,J.J., Lees-Miller,S. & Tjian,R. (1990) "GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase". *Cell* 63, 155-165.

James,D.E., Strube,M. & Mueckler,M. (1989) "Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter". *Nature* 338, 83-87.

James,D.E., Piper,R.C. & Slot,J.W. (1994) "Insulin stimulation of GLUT-4 translocation: A model for regulated recycling". *Trends Cell Biol.* 4, 120-126.

Jensen,D.E., Rich,C.B., Terpstra,A.J., Farmer,S.R. & Foster,J.A. (1995) "Transcriptional regulation of the elastin gene by insulin-like growth factor I involves disruption of Sp1 binding". *J. Biol. Chem.* 270, 6555-6563.

Joly,M., Kazlauskas,A. & Corvera,S. (1995) "Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required at a postendocytic step in platelet-derived growth factor receptor trafficking". *J. Biol. Chem.* 270, 13225-13230.

Joost,H.G., Weber,T.M., Cushman,S.W. & Simpson,I.A. (1987) "Activity and phosphorylation state of glucose transporters in plasma membranes from insulin-, isoproterenol-, and phorbol ester-treated rat adipose cells". *J. Biol. Chem.* 262, 11261-11267.

Jung,C.Y., Hsu,T.L., Hah,J.S., Cha,C. & Haas,M.N. (1980) "Glucose transport carrier of human erythrocytes". *J. Biol. Chem.* 255, 361-364.

Jung,E.K.Y., Chin,J.J. & Jung,C.Y. (1986) "Structural basis of human erythrocyte glucose transporter function in reconstituted system". *J. Biol. Chem.* 261, 9155-9160.

Kadonaga,J.T., Jones,K.A. & Tjian,R. (1986) "Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by SP1". *TIBS* 11, 20-23.

Kaestner,K.H., Christy,R.J., McLenithan,J.C., Braiterman,L.T., Cornelius,P., Pekala,P.H. & Lane,M.D. (1989) "Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3150-3154.

Kakuda,D.K. & MacLeod,C.L. (1994) "Na⁺-independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells". *J. Exp. Biol.* 196, 93-108.

Kasahara,M. & Hinkle,P.C. (1977) "Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes". *J. Biol. Chem.* 252, 7384-7390.

Katagiri,H., Asano,T., Shibasaki,Y., Lin,J.L., Tsukuda,K., Ishihara,H., Akanuma,Y., Takaku,F. & Oka,Y. (1991) "Substitution of leucine for tryptophan 412 does not abolish cytochalasin B labeling but markedly decreases the intrinsic activity of GLUT1 glucose transporter". *J. Biol. Chem.* 266, 7769-7773.

Kayano,T., Fukumoto,H., Eddy,R.L., Fan,Y.S., Byers,M.G., Shows,T.B. & Bell,G.I. (1988) "Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins". *J. Biol. Chem.* 263, 15245-15248.

Kayano,T., Burant,C.F., Fukumoto,H., Gould,G.W., Fan,Y.S., Eddy,R.L., Byers,M.G., Shows,T.B., Seino,S. & Bell,G.I. (1990) "Human facilitative glucose transporters". *J. Biol. Chem.* 265, 13276-13282.

King,A.P.J., Tai,P.K.K. & Carter-Su,C. (1991) "Cytochalasin B interferes with conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter induced by internal and external sugar binding". *Biochemistry* 30, 11546-11553.

Kitzman,H.H., McMahan,R.J., Williams,M.G. & Frost,S.C. (1993) "Effect of glucose deprivation on GLUT1 expression in 3T3-L1 adipocytes". *J. Biol. Chem.* 268, 1320-1325.

Knott,R.M. & Forrester,J.V. (1995) "Role fo glucose regulatory mechanisms in diabetic retinopathy". *British J. Ophthalmol.* 79, 1046-1049.

Koivisto,U.M., Martinez-Valdez,H, Bilan,P.J., Burdett,E., Ramlal,T. & Klip,A. (1991) "Differential regulation of the GLUT-1 and GLUT-4 glucose transport systems by glucose and insulin in L6 muscle cells in culture". *J. Biol. Chem.* 266, 2615-2621.

Kotani,K., Carozzi,A.J., Sakaue,H., Hara,K., Robinson,L.J., Clark,S.F., Yonezawa,K., James,D.E. & Kasuga,M. (1995) "Requirement for phosphoinositide 3-kinase in insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 343-348.

Krupka,R.M. (1971) "Evidence for a carrier conformational change associated with sugar transport in erythrocytes". *Biochemistry* 10, 1143-1148.

Kumagai,A.K., Dwyer,K.J. & Pardridge,W.M. (1994) "Differential glycosylation of the GLUT1 glucose transporter in brain capillaries and choroid plexus". *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 24-30.

Lachaal,M., Berenski,C.J., Kim,J. & Chung,C.Y. (1990) "An ATP-modulated specific association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte glucose transporter". *J. Biol: Chem.* 265, 15449-15454.

Laemmli,U.K. (1970) "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227, 680-685.

Larkins,R.G. & Dunlop,M.E. (1992) "The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy". *Diabetologia* 35, 499-504.

Lee,A.S. (1987) "Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells". Trends Biochem. Sci. 12, 20-23.

Leggett,R.W., Armstrong,S.A., Barry,D. & Mueller,C.R. (1995) "Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver". J. Biol. Chem. 270, 25879-25884.

Liu,H., Xiong,S., Shi,Y., Samuel,S.J., Lachaal,M. & Jung,C.Y. (1995) "ATP-sensitive binding of a 70-kDa cytosolic protein to the glucose transporter in rat adipocytes". J. Biol. Chem. 270, 7869-7875.

Liu,M.L., Olson,A.L., Moye-Rowley,W.S., Buse,J.B., Bell,G.I. & Pessin,J.E. (1992) "Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice". J. Biol. Chem. 267, 11673-11676.

Lorenzi,M. & Cagliero,E. (1991) "Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus". Diabetes 40, 653-659.

Lorenzi,M., Cagliero,E. & Toledo,S. (1985) "Glucose toxicity for human endothelial cells in culture". Diabetes 34, 621-627.

Maher,F. & Harrison,L.C. (1990) "Hexose specificity for downregulation of HepG2/brain-type glucose transporter gene expression in L6 myocytes". Diabetologia 33, 641-648.

Maher,F., Vannucci,S.J. & Simpson,I.A. (1994) "Glucose transporter proteins in brain". FASEB J. 8, 1003-1011.

Maher,F., Vannucci,S.J. & Simpson,I.A. (1994) "Glucose transporter proteins in brain". FASEB J. 8, 1003-1011.

Maher,F. & Harrison,L.C. (1991) "Stimulation of glucose transporter (GLUT1) mRNA and protein expression by inhibitors of glycosylation". Biochim. Biophys. Acta 1089, 27-32.

Maher,F. & Harrison,L.C. (1990) "Stabilization of glucose transporter mRNA by insulin/IGF-1 and glucose deprivation". Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 210-215.

Mandarino,L.J. (1992) "Current hypotheses for the biochemical basis of diabetic retinopathy". Diabetes Care 15, 1892-1901.

Marshall,B.A., Ren,J.M., Johnson,D.W., Gibbs,E.M., Lillquist,J.S., Soeller,W.C., Holloszy,J.O. & Mueckler,M. (1993) "Germline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle". *J. Biol. Chem.* 268, 18442-18445.

Marshall,J.F., Nesbitt,S.A., Helfrich,M.H., Horton,M.A., Polakova,K. & Hart,I.R. (1991) "Integrin expression in human melanoma cell lines: heterogeneity of vitronectin receptor composition and function". *Int. J. Cancer* 49, 924-931.

Marshall,S., Bacote,V. & Traxinger,R.R. (1991) "Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system". *J. Biol. Chem.* 266, 4706-4712.

Marsh,B.J., Alm,R.A., McIntosh,S.R. & James,D.E. (1995) "Molecular regulation of GLUT-4 targeting in 3T3-L1 adipocytes". *J. Cell Biol.* 130, 1081-1091.

Masumi,A., Akamatsu,Y. & Kitagawa,T. (1994) "Alteration by transforming growth factor- β 1 of asparagine-linked sugar chains in glucose transporter protein in Swiss 3T3 cells". *Biochim. Biophys. Acta* 1221, 330-338.

May,J.M., Buchs,A. & Carter-Su,C. (1990) "Localization of a reactive exofacial sulfhydryl on the glucose carrier of human erythrocytes". *Biochemistry* 29, 10393-10398.

Mayor,P., Maianu,L. & Garvey,W.T. (1992) "Glucose and insulin chronically regulate insulin action via different mechanisms in BC3H1 myocytes". *Diabetes* 41, 274-285.

McMahon,R.J. & Frost,S.C. (1995) "Nutrient control of GLUT1 processing and turnover in 3T3-L1 adipocytes". *J. Biol. Chem.* 270, 12094-12099.

Mitsumoto,Y., Burdett,E., Grant,A. & Klip,A. (1991) "Differential expression of the GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during differentiation of L6 muscle cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 652-659.

Mori,H., Hashiramoto,M., Clark,A.E., Yang,J., Muraoka,A., Tamori,Y., Kasuga,M. & Holman,G.D. (1994) "Substitution of tyrosine 293 of GLUT1 locks the transporter into an outward facing conformation". *J. Biol. Chem.* 269, 11578-11583.

Mueckler,M., Caruso,C., Baldwin,S.A., Panico,M., Blench,I., Morris,H.R., Allard,W.J., Lienhard,G.E. & Lodish,H.F. (1985) "Sequence and structure of a human glucose transporter". *Science* 229, 941-945.

Mueckler,M., Weng,W. & Kruse,M. (1994) "Glutamine 161 of GLUT1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding". *J. Biol. Chem.* 269, 20533-20538.

Mulle,C., Benoit,P., Pinset,C., Roa,M. & Changeux,J.P. (1988) "Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5728-5732.

Murakami,T., Nishiyama,T., Shirotani,T., Shinohara,Y., Kan,M., Ishii,K., Kanai,F., Nakazuru,S. & Ebina,Y. (1992) "Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes". *J. Biol. Chem.* 267, 9300-9306.

Nadal-Ginard,B. (1978) "Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis". *Cell* 15, 855-864.

Namba,H., Lucignani,G., Nehlig,A., Patlak,C., Pettigrew,K., Kennedy,C. & Sokoloff,L. (1987) "Effects of insulin on hexose transport across blood-brain barrier in normoglycemia". *Am. J. Physiol.* 252, E299-E303.

Nishimura,H., Kuzuya,H., Kosaki,A., Okamoto,M., Okamoto,M., Kono,S., Inoue,G., Maeda,I. & Imura,H. (1992) "Monoclonal antibodies possibly recognize conformational changes in the human erythrocyte glucose transporter". *Biochem. J.* 281, 103-106.

Olson,A.L., Liu,M.L., Moye-Rowley,W.S., Buse,J.B., Bell,G.I. & Pessin,J.E. (1993) "Hormonal/metabolic regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice". *J. Biol. Chem.* 268, 9839-9846.

Olson,A.L. & Pessin,J.E. (1995) "Transcriptional regulation of the human GLUT4 gene promoter in diabetic transgenic mice". *J. Biol. Chem.* 270, 23491-23495.

Olson,E.N. & Klein,W.H. (1994) "bHLH factors in muscle development: dead

lines and commitments, what to leave in and what to leave out". *Genes & Development* 8, 1-8.

Ortiz,P.A., Honkanen,R.A., Klingman,D.E. & Haspel,H.C. (1992) "Regulation of the functional expression of hexose transporter GLUT-1 by glucose in murine fibroblasts: Role of lysosomal degradation". *Biochem.* 31, 5386-5393.

Pessino,A., Hebert,D.N., Woon,C.W., Harrison,S.A., Clancy,B.M., Buxton,J.M., Carruthers,A. & Czech,M.P. (1991) "Evidence that functional erythrocyte-type glucose transporters are oligomers". *J. Biol. Chem.* 266, 20213-20217.

Piette,J., Klarsfeld,A. & Changeux,J.P. (1989) "Interaction of nuclear factors with the upstream region of the α -subunit gene of chicken muscle acetylcholine receptor: variations with muscle differentiation and denervation". *EMBO J.* 8, 687-694.

Pratt,S.E. & Germinario,R.J. (1994) "Differential glycosylation of the glucose transporter coincides with enhanced sugar transport in respiration deficient cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1313-1320.

Preston,R.A.J. & Baldwin,S.A. (1993) "GLUT1: Identification of exofacial lysine-residues". *Biochem. Soc. Transactions* 21, 309-312.

Reed,B.C., Shade,D., Alperovich,F. & Vang,M. (1990) "3T3-L1 adipocyte glucose transporter (HepG2 class): Sequence and regulation of protein and mRNA expression by insulin, differentiation, and glucose starvation". *Archiv. Biochem. Biophys.* 279, 261-274.

Ren,J.M., Marshall,B.A., Gulve,E.A., Gao,J., Johnson,D.W., Holloszy,J.O. & Mueckler,M. (1993) "Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle". *J. Biol. Chem.* 268, 16113-16115.

Reusch,J.E.B., Sussman,K.E. & Draznin,B. (1993) "Inverse relationship between GLUT-4 phosphorylation and its intrinsic activity". *J. Biol. Chem.* 268, 3348-3351.

Robidoux,S., Gosselin,P., Harvey,M., Leclerc,S. & Guerin,S.L. (1992) "Transcription of the mouse secretory protease inhibitor p12 gene is activated

by the developmentally regulated positive transcription factor Sp1". *Mol. Cell. Biol.* 12, 3796-3806.

Robinson, K.A., Sens, D.A. & Buse, M.G. (1993) "Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles". *Diabetes* 42, 1333-1346.

Robinson, R., Robinson, L.J., James, D.E. & Lawrence, J.C. (1993) "Glucose transport in L6 myoblasts overexpressing GLUT1 and GLUT4". *J. Biol. Chem.* 268, 22119-22126.

Ruderman, N.B., Williamson, J.R. & Brownlee, M. (1992) "Glucose and diabetic vascular disease". *FASEB J.* 6, 2905-2914.

Sadler, J.E. (1991) "Von Willebrand factor". *J. Biol. Chem.* 266, 22777-22780.

Saffer, J.D., Jackson, S.P. & Annarella, M.B. (1991) "Developmental expression of Sp1 in the mouse". *Mol. Cell. Biol.* 11, 2189-2199.

Saltis, J., Habberfield, A.D., Egan, J.J., Londos, C., Simpson, I.A. & Cushman, S.W. (1991) "Role of protein kinase C in the regulation of glucose transport in the rat adipose cell". *J. Biol. Chem.* 266, 261-267.

Santalucía, T., Camps, M., Castelló, A., Muñoz, P., Nuel, A., Testar, X., Palacín, M. & Zorzano, A. (1992) "Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/HepG2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue". *Endocrinol.* 130, 837-846.

Sargeant, R., Mitsumoto, Y., Sarabia, V., Shillabeer, G. & Klip, A. (1993) "Hormonal regulation of glucose transporters in muscle cells in culture". *J. Endocrinol. Invest.* 16, 147-162.

Sargeant, R.J. & Pâquet, M.R. (1993) "Effect of insulin on the rates of synthesis and degradation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes". *Biochem. J.* 290, 913-919.

Sasson, S., Ashhab, Y., Melloul, D. & Cerasi, E. (1993) "Autoregulation of glucose transport: Effects of glucose on glucose transporter expression and cellular location in muscle". *New Concepts in the Pathogenesis of NIDDM* (Ed. Plenum Press), 113-127.

Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D. & Emr, S.D. (1993) "Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting". *Science* 260, 88-91.

Shanahan, M.F. & D'Artel-Ellis, J. (1984) "Orientation of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane". *J. Biol. Chem.* 259, 13878-13884.

Shawver, L.K., Olson, S.A., White, M.K. & Weber, M.J. (1987) "Degradation and biosynthesis of the glucose transporter protein in chicken embryo fibroblasts transformed by the src oncogene". *Mol. Cell. Biol.* 7, 2112-2118.

Shepherd, P.R., Soos, M.A. & Siddle, K. (1995) "Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase block exocytosis but not endocytosis of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 535-539.

Shi, Y., Liu, H., Vanderburg, G., Samuel, S.J., Ismail-Beigi, F. & Jung, C.Y. (1995) "Modulation of GLUT1 intrinsic activity in Clone 9 cells by inhibition of oxidative phosphorylation". *J. Biol. Chem.* 270, 21772-21778.

Sofue, M., Yoshimura, Y., Nishida, M. & Kawada, J. (1992) "Possible multifunction of glucose transporter". *Biochem. J.* 288, 669-674.

Stephens, J.M., Carter, B.Z., Pekala, P.H. & Malter, J.S. (1992) "Tumor necrosis factor α -induced glucose transporter (GLUT-1) mRNA stabilization in 3T3-L1 preadipocytes". *J. Biol. Chem.* 267, 8336-8341.

Suzuki, M., Kuroda, C., Oda, E., Tsunoda, S., Nakamura, T., Nakajima, T. & Oda, K. (1995) "G10BP, an E1A-inducible negative regulator of Sp1, represses transcription of the rat fibronectin gene". *Mol. Cell. Biol.* 15, 5423-5433.

Takahashi, K. & Sawasaki, Y. (1991) "Human endothelial cell line, ECV304, produces pro-urokinase". *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27A, 766-768.

Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J.I., Mukai, K. & Goto, T. (1990) "Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells". *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25, 265-274.

Takata, K. (1994) "Structural basis of glucose transport in the placental barrier: Role of GLUT1 and the gap junction". *Endocrine J.* 41 (Sup.), S3-S8.

Takata,K., Kasahara,M., Oka,Y. & Hirano,H. (1993) "Mammalian sugar transporters: Their localization and link to cellular functions". *Acta Histochem. Cytochem.* 26, 165-178.

Tamori,Y., Hashiramoto,M., Clark,A.E., Mori,H., Muraoka,A., Kadowaki,T., Holman,G.D. & Kasuga,M. (1994) "Substitution at Pro³⁸⁵ of GLUT1 perturbs the glucose transport function by reducing conformational flexibility". *J. Biol. Chem.* 269, 2982-2986.

Thorens,B., Sarkar,H.K., Kaback,H.R. & Lodish,H.F. (1988) "Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β -pancreatic islet cells". *Cell* 55, 281-290.

Thorens,B. (1993) "Facilitated glucose transporters in epithelial cells". *Annu. Rev. Physiol.* 55, 591-608.

Threadgold,L.C. & Kuhn,N.J. (1984) "Monosaccharide transport in the mammary gland of the intact lactating rat". *Biochem. J.* 218, 213-219.

Todaka,M., Nishiyama,T., Murakami,T., Saito,S., Ito,K., Kanai,F., Kan,M., Ishii,K., Hayashi,H., Shichiri,M. & Ebina,Y. (1994) "The role fo insulin in activation of two enhancers in the mouse GLUT1 gene". *J. Biol. Chem.* 269, 29265-29270.

Tordjman,K.M., Leingang,K.A. & Mueckler,M. (1990) "Differential regulation of the HepG2 and adipocyte/muscle glucose transporters in 3T3L1 adipocytes". *Biochem. J.* 271, 201-207.

Tordjman,K.M., Leingang,K.A., James,D.E. & Mueckler,M.M. (1989) "Differential regulation of two distinct glucose transporters species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7761-7765.

Tsakiridis,T., McDowell,H.E., Walker,T., Downes,C.P., Hundal,H.S., Vranic,M. & Klip,A. (1995) "Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells". *Endocrinology* 136, 4315-4322.

Ui,M., Okada,T., Hazeki,K. & Hazeki,O. (1995) "Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase". *TIBS*

20, 303-307.

Vera, J.C., Rivas, C.I., Fischbarg, J. & Golde, D.W. (1993) "Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid". *Nature* 364, 79-82.

Verhey, K.J., Yeh, J.I. & Birnbaum, M.J. (1995) "Distinct signals in the GLUT4 glucose transporter for internalization and for targeting to an insulin-responsive compartment". *J. Cell Biol.* 130, 1071-1079.

Wadzinski, B.E., Shanahan, M.F., Ruoho, A.E. (1987) "Derivatization of the human erythrocyte glucose transporter using a novel forskolin photoaffinity label". *J. Biol. Chem.* 262, 17683-17689.

Walker, P.S., Ramlal, T., Donovan, J.A., Doering, T.P., Sandra, A., Klip, A. & Pessin, J.E. (1989) "Insulin and glucose-dependent regulation of the glucose transport system in the rat L6 skeletal muscle cell line". *J. Biol. Chem.* 264, 6587-6595.

Walker, P.S., Ramlal, T., Sarabia, V., Koivisto, U.M., Bilan, P.J., Pessin, J.E. & Klip, A. (1990) "Glucose transport activity in L6 muscle cells is regulated by the coordinate control of subcellular glucose transporter distribution, biosynthesis, and mRNA transcription". *J. Biol. Chem.* 265, 1516-1523.

Walker, P.S., Donovan, J.A., Van Ness, B.G., Fellows, R.E. & Pessin, J.E. (1988) "Glucose-dependent regulation of glucose transport activity, protein, and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells". *J. Biol. Chem.* 263, 15594-15601.

Wang, P.H., Moller, D., Flier, J.S., Nayak, R.C. & Smith, R.J. (1989) "Coordinate regulation of glucose transporter function, number, and gene expression by insulin and sulfonylureas in L6 rat skeletal muscle cells". *J. Clin. Invest.* 84, 62-67.

Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B. & Miller, A.D. (1989) "Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5434-5438.

Wertheimer, E., Sasson, S., Cerasi, E. & Ben-Neriah, Y. (1991) "The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of

stress-inducible proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2525-2529.

Wheeler, T.J. & Hinkle, P.C. (1981) "Kinetic properties of the reconstituted glucose transporter from human erythrocytes". *J. Biol. Chem.* 256, 8907-8914.

White, M.K. & Weber, M.J. (1990) "The src oncogene can regulate a human glucose transporter expressed in chicken embryo fibroblasts". *Mol. Cell. Biol.* 10, 1301-1306.

White, M.K. & Weber, M.J. (1988) "Transformation by the src oncogene alters glucose transport into rat and chicken cell by different mechanisms". *Mol. Cell. Biol.* 8, 138-144.

White, M.K., Rall, T.B. & Weber, M.J. (1991) "Differential regulation of glucose transporter isoforms by the src oncogene in chicken embryo fibroblasts". *Mol. Cell. Biol.* 11, 4448-4454.

White, M.K. & McCubrey, J.A. (1995) "Changes in glucose transport associated with malignant transformation". *Int. J. Oncol.* 7, 701-712.

Widnell, C.C., Baldwin, S.A., Davies, A., Martin, S. & Pasternak, C.A. (1990) "Cellular stress induces a redistribution of the glucose transporter". *FASEB J.* 4, 1634-1637.

Williams, S.A. & Birnbaum, M.J. (1988) "The rat facilitated glucose transporter gene". *J. Biol. Chem.* 263, 19513-19518.

Witters, L.A., Vater, C.A. & Lienhard, G.E. (1985) "Phosphorylation of the glucose transporter in vitro and in vivo by protein kinase C". *Nature* 315, 777-778.

Xia, L., Lu, Z. & Lo, T.C.Y. (1993) "Transcripts for the high and low affinity hexose transporters in rat myoblasts". *J. Biol. Chem.* 268, 23258-23266.

Yaffe, D. (1968) "Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61, 477-483.

Yamada, K., Tillotson, L.G. & Isselbacher, K.J. (1983) "Regulation of hexose carriers in chicken embryo fibroblasts". *J. Biol. Chem.* 258, 9786-9792.

Yang, J., Clarke, J.F., Ester, C.J., Young, P.W., Kasuga, M. & Holman, G.D.

(1996) "Phosphatidylinositol 3-kinase acts at an intracellular membrane site to enhance GLUT4 exocytosis in 3T3-L1 cells". *Biochem. J.* 313, 125-131.

Yuan,L., Barriocanal,J.G., Bonifacio,J.S. & Sandoval,I.V. (1987) "Two integral membrane proteins located in the cis-middle and trans-part of the Golgi system acquire sialylated N-linked carbohydrates and display different turnovers and sensitivity to cAMP-dependent phosphorylation". *J. Cell Biol.* 105, 215-227.

Zottola,R.J., Cloherty,E.K., Coderre,P.E., Hansen,A., Hebert,D.N. & Carruthers,A. (1995) "Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization". *Biochemistry* 34, 9734-9747.

Castelló,A., Rodríguez-Manzaneque,J.C., Camps,M., Pérez-Castillo,A., Testar,X., Palacín,M., Santos,A. & Zorzano,A. (1994) "Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue". *J. Biol. Chem.* 269, 5905-5912.