



# Universidad Pablo de Olavide - Sevilla 2015

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

Tesis doctoral para optar al grado de doctor titulada

## “EMPLEO DE MUTACIONES ACTIVADORAS DE LA PROTEÍNA GLUCOQUINASA EN LA TERAPIA GÉNICA/CELULAR DE LA DIABETES MELLITUS”

Presentada por:  
Raquel Araujo Legido

Dirigida por:  
Francisco Martín Bermudo  
Antonio L. Cuesta Muñoz



**Universidad Pablo de Olavide – Sevilla 2015.**  
**Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica.**

**Tesis doctoral para optar al grado de doctor titulada:**

**“EMPLEO DE MUTACIONES ACTIVADORAS DE  
LA PROTEÍNA GLUCOQUINASA EN LA TERAPIA  
GÉNICA/CELULAR DE LA DIABETES  
MELLITUS”**

Presentada por:  
Raquel Araujo Legido.

Dirigida por:  
Francisco Martín Bermudo.  
Antonio L. Cuesta Muñoz.



El **Dr. Francisco Martín Bermudo**, catedrático de Nutrición de la Universidad Pablo de Olavide y el **Dr. Antonio L. Cuesta Muñoz**, como co-directores,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo de investigación presentado por **Dña. Raquel Araujo Legido** titulado “**Empleo de mutaciones activadoras de la proteína Glucoquinasa en la terapia génica/celular de la Diabetes Mellitus**” ha sido realizado íntegramente por ella, bajo nuestra dirección y supervisión, y reúne las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste y a efectos oportunos, firmo el presente informe.

Sevilla, a 10 de Noviembre de 2015.





A las que se fueron y a las que vinieron.

Va por vosotras. Os quiero.



## AGRADECIMIENTOS

Hace más de diez años que entré por primera vez en un laboratorio, es mucho lo que tengo que agradecer a jefes y compañeros/amigos desde entonces. En primer lugar, a mis directores de tesis, Francisco Martín Bermudo y Antonio L. Cuesta Muñoz, por depositar su confianza en mí para la realización de este trabajo, gracias por su apoyo y dedicación.

Quiero también agradecer sinceramente, al Dr. Jose Antonio Pintor Toro, por darme la oportunidad de recibir una excelente formación. A la profesora Mary Collins de UCL, y a David, que me enseñaron todo lo que se sabe sobre lentivirus.

A mi gente del IRNAS. Pili, gracias por cuidarme tanto desde el principio, Jose, M<sup>a</sup> del Mar, Cristi, que siempre estáis ahí y a Merche, mi gorda, que te quiero con locura. Gracias a todos por seguir conmigo todos estos años.

Gracias de corazón a Ángeles, siempre has sido mi ángel de la guarda desde que entré por la puerta de CT-2, te quiero y te admiro profundamente.

Gracias a todos mis compañeros pasados y presentes de CT-2: Anabel, Antonio, Irene, Manu, Laura, Lourdes, Andrea, Sole, Marichu, Eva. Gracias también todo el personal de CABIMER y a Gemma de la UPO, que con su eficacia hace que todo sea más fácil.

Gracias a mi madre, que siempre me empujó para que diera lo mejor de mí. A mi Tai y mi Yeya, os recuerdo cada día de mi vida, por vosotras soy lo que soy y por eso, esto es más vuestro que mío.

Francisco, Marina y Valeria, sois la mejor parte de mi vida. Francisco, no me imagino sin ti, gracias por estar a mi lado, por no dejar que derrumbe nuestra montaña con mi estupidez. Marina, Valeria, gracias por existir y darme la oportunidad de aprender de vosotras, porque sois mis grandes maestras de la vida, esto también es vuestro.



## ABREVIATURAS

**6PF2K/6P2asa:** 6-Fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** ADN complementario.

**ADP:** Adenosín Difosfato.

**Amp:** Amperaje.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ATP:** Adenosín Trifosfato.

**BrdU:** 5-bromo-2'deoxyuridina.

**BSA:** Albumina de Suero Bovino.

**C:** Citosina.

**CMRL:** *Connaught Medical Research Laboratories.*

**CMV:** Citomegalovirus.

**Da:** Dalton.

**DAPI:** 4',6 diamino-2-fenilindol.

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium.*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**DNP:** Diabetes Neonatal Permanente.

**dUTP:** 2'-Deoxyuridina, 5'-Trifosfato.

**ECIT:** *European Consortium for Islet Transplantation.*

**ECL:** *Enhanced chemiluminescence.*

**EDTA:** Ácido Etildiaminotetraacético.

**eGFP:** *Enhanced Green Fluorescent Protein.*

**ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzima.

**ESM:** Error Estándar de la Media.

**FACS:** *Fluorescence-Activated Cell Sorting.*

**FBS:** Suero Fetal Bovino.

**Fig:** Figura.

**FL:** Fluorescencia.

**FSC:** *Forward Scatter* o detector de Dispersión Frontal.

**FW:** *Forward.*

**G:** Guanina.

**g**: Unidad de fuerza centrífuga.

**G6P**: glucose-6-fosfato.

**GCK**: Gen de la Glucoquinasa humana.

**GK**: Proteína Glucoquinasa humana.

**GKA**: Proteína Activadora de la Glucoquinasa.

**GKRP**: Proteína Reguladora de la Glucoquinasa.

**HEPES**: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

**HI**: Hiperinsulinemia.

**IAPP**: Polipéptido Amieloide del Islote.

**IgG**: Inmunoglobulina G.

**IRES**: *Internal Ribosome Entry Site*.

**Kb**: Kilobase.

**KDa**: Kilodalton.

**Kg**: Kilogramo.

**L**: Litro.

**LB**: *Lysogeny Broth*.

**Lin**: Lineal.

**Log**: Logarítmico.

**M**: Molar.

**MODY**: *Maturity Onset Diabetes of the Young*.

**N**: Normal.

**NCBI**: *National Center for Biotechnology Information*.

**°C**: Grados centígrados.

**OMS**: Organización Mundial de la Salud.

**P**: Probabilidad estadística.

**Pb**: Pares bases.

**PBS**: Tampón Fosfato Salino.

**PFA**: Paraformaldehido.

**PMSF**: *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*.

**PP**: Polipéptido Pancreático.

**REV**: *Reverse*.

**RIPA**: *Radioimmunoprecipitation assay buffer*.

**RPMI**: *Roswell Park Memorial Institute medium*.



**SDS:** Dodecilsulfato Sódico.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico.

**SIEG:** Secreción de Insulina estimulada por Glucosa.

**SSC:** *Side Scatter*, o detectores de Dispersión Lateral.

**Tm:** *Melting Temperature*.

**TUNEL:** *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*.

**UI:** Unidades Infecciosas.

**U-SIEG:** Umbral de la Secreción de Insulina estimulada por Glucosa.

**V:** Voltios.



# ÍNDICE



## **I. Introducción.**

### **1. La diabetes.**

- 1.1. Diabetes tipo I.
- 1.2. Diabetes tipo II.

### **2. El páncreas.**

### **3. El islote de Langerhans.**

### **4. La célula beta.**

### **5. La glucoquinasa.**

- 5.1. Cinética de la glucoquinasa.
- 5.2. Estructura de la molécula de glucoquinasa e importancia para su funcionamiento.
- 5.3. Regulación de la glucoquinasa: un gen, dos promotores.
- 5.4. Regulación post-transcripcional de la glucoquinasa.

### **6. Mutaciones de la glucoquinasa y su efecto en el metabolismo de la glucosa.**

- 6.1. Mutación activadora de *GCK*, *V91L* (*GCK-V91L*).  
Localización y efecto sobre el metabolismo de la glucosa.

### **7. Efectos fisiológicos en mutantes de V91L. Hipoglucemia neonatal e infantil severa.**

### **8. Terapia génica/celular.**

## **II. Objetivos.**

### **III. Materiales y métodos.**

1. **Animales de experimentación.**
2. **Aislamiento de islotes de Langerhans por el método de la colagenasa.**
3. **Islotes humanos.**
4. **Lentivirus: construcciones utilizadas.**
5. **Transformación de bacterias DH5 $\alpha$  con las distintas construcciones.**
6. **Secuenciación de los vectores de expresión. Diseño de los primers o cebadores.**
7. **Transfección simple de los vectores pRRL-sinIRES-eGFP, pRRL-GCK-eGFP y pRRL-V91L-eGFP.**
8. **Extracción de proteínas en células A293T.**
9. **Extracción de proteínas en islotes de ratón y humanos.**
10. **Comprobación de la expresión de GK y V91L. Western Blot.**
11. **Comprobación de la expresión de GK y V91L. Inmunofluorescencia.**
12. **Obtención de lentivirus.**
13. **Cuantificación de lentivirus.**
14. **Infección de los islotes de Langerhans.**
15. **Detección y cuantificación de proliferación y apoptosis en islotes infectados.**
  - 15.1. **Cuantificación de la proliferación en islotes infectados. Detección de incorporación de BrdU en inmunofluorescencia.**
  - 15.2. **Cuantificación de la proliferación en islotes infectados. Inmunofluorescencia frente a Ki67.**
  - 15.3. **Cuantificación de la apoptosis en islotes infectados.**
16. **Medida de la secreción de insulina de islotes de Langerhans.**

## **IV. Resultados.**

### **1. Análisis de las secuencias y expresión de los vectores lentivirales.**

- 1.1. Análisis de las secuencias de los vectores.
- 1.2. Expresión de las proteínas GK y V91L en transfección simple.

### **2. Obtención de los lentivirus.**

- 2.1. Formación de los lentivirus.
- 2.2. Cuantificación de los lentivirus.
- 2.3. Expresión de las proteínas GK y V91L en células infectadas.

### **3. Infección y análisis de islotes de Langerhans de ratón con lentivirus.**

- 3.1. Tamaño de los islotes.
- 3.2. Secreción estática de insulina.
- 3.3. Apoptosis.
- 3.4. Proliferación.

### **4. Infección y análisis de islotes de Langerhans de humanos con lentivirus.**

- 4.1. Tamaño de los islotes.
- 4.2. Secreción estática de insulina.
- 4.3. Apoptosis.
- 4.4. Proliferación.



## **V. Discusión.**

- 1. Análisis de la secuencia y expresión de los vectores lentivirales.**
- 2. Obtención de lentivirus.**
- 3. Infección y análisis de islotes de Langerhans de ratón y humanos con lentivirus.**
  - 3.1. Tamaño de los islotes.
  - 3.2. Secreción estática de insulina.
  - 3.3. Apoptosis.
  - 3.4. Proliferación.

## **VI. Conclusiones.**

## **VII. Bibliografía.**

# **I. INTRODUCCIÓN**



El 14 de Septiembre de 2011, la Federación Internacional de Diabetes hizo público un comunicado en el que se anunciaba que en torno a 347 millones de personas en el mundo padecían diabetes y que dicha enfermedad era responsable de 4.6 millones de muertes al año, o lo que es lo mismo una persona muere de diabetes tipo II cada 7 segundos. En nuestro país un estudio reciente ([Soriguer et al., 2012](#)) desvela que el 30% de la población española padece algún tipo de desorden relacionado con la regulación de la glucosa. Un 13.8% de los participantes en este estudio sufrían diabetes y la mitad de ellos lo desconocían hasta la realización del mismo.

Se trata además de un problema mayor de salud ya que conlleva otras complicaciones asociadas tales como el aumento del riesgo de padecer fallo cardiaco, apoplejía, complicaciones microvasculares como la ceguera, fallo renal, neuropatías y amputaciones de miembros inferiores.

La diabetes se caracteriza básicamente por la presencia de altos niveles de glucosa en sangre, debido a una insuficiencia de secreción de insulina o a una carencia de la misma. Actualmente se reconocen cuatro tipos de diabetes. Según sus etiologías y orígenes distintos, nos encontramos con la diabetes tipo I, la diabetes tipo II, la diabetes gestacional que se desarrolla durante el embarazo y por último aquella diabetes causada por mutaciones, enfermedades del páncreas exocrino o derivadas de tratamientos farmacológicos. (Diabetes Care ([2015](#)))

La diabetes tipo I, se manifiesta generalmente durante la infancia y representa entre el 5% y el 10% del total de enfermos diabéticos, tiene su causa en un defecto en el sistema inmune, el cual genera anticuerpos que acaban destruyendo la célula  $\beta$ , dando como consecuencia una pérdida en la masa total de célula  $\beta$ .

La diabetes tipo II, es la forma más frecuente de la enfermedad, entre sus causas hay factores medioambientales, como la edad y el estilo de vida y

recientemente se han descrito algunos genes relacionados con un aumento en el riesgo de padecerla. ([Ashcroft and Rorsman, 2012](#)).

El trabajo que se presenta a continuación, se engloba dentro del campo de la terapia génica/celular, como herramienta para acercarnos a la cura de la diabetes y/o la mejora de la calidad de vida de los enfermos que la padecen, para los cuales su curación pasa por la restauración de un número mínimo de células  $\beta$  funcionales en su organismo.

En el año 2000, se desarrolló con éxito el protocolo de Edmonton ([Shapiro et al., 2000](#)). Esta técnica permite el trasplante exitoso a enfermos de diabetes de islotes pancreáticos procedentes de donantes cadavéricos. Esto ha supuesto un gran avance en la cura de la enfermedad, pero todavía resulta insuficiente, debido al número creciente de enfermos y la baja disponibilidad de tejido trasplantable. ([Burke and Ciancio, 2002](#))

Por todo esto se hace indispensable otra aproximación y la terapia génica/celular se presenta como la más acertada, hacia ella se han centrado los esfuerzos de muchos investigadores. Para ello es preciso conocer el origen y desarrollo de los dos tipos de diabetes, así como la estructura del páncreas, su función y su fisiología, el islote pancreático y la célula  $\beta$ , objetivo final de la terapia. Sobre estos puntos vamos a tratar en la primera parte la introducción.

A continuación nos centraremos en el efecto de mutaciones activadoras del gen de la glucoquinasa (*GCK*), asociadas al síndrome de “Hipoglucemia Neonatal e Infantil Severa”, y cuyo fenotipo a nivel celular resulta muy interesante para una posible aplicación en la terapia génica contra la diabetes.

Y por último revisaremos las distintas terapias génicas/celulares sobre las que se trabaja en la actualidad para terminar abordando el objetivo final de este trabajo, que es la mejora de los islotes obtenidos de los donantes cadavéricos, como paso previo a su trasplante mediante la infección con lentivirus que expresan la versión modificada de la proteína glucoquinasa.

## 1. LA DIABETES.

La Organización Mundial de la Salud, define la diabetes como una enfermedad crónica, que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce.

Actualmente en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes, y se calcula que en 2004 murieron 3,4 millones de personas por esta enfermedad, de las cuales el 80% se produjeron en países con ingresos medios y bajos. Casi la mitad de las muertes se dan en personas de menos de 70 años y el 55% son mujeres.

La OMS prevé que entre 2005 y 2030, se dupliquen las muertes debidas a diabetes, pasando a ser la séptima causa de mortalidad a nivel mundial y que el mayor incremento de enfermos se produzca en China y la India (fig. 1).

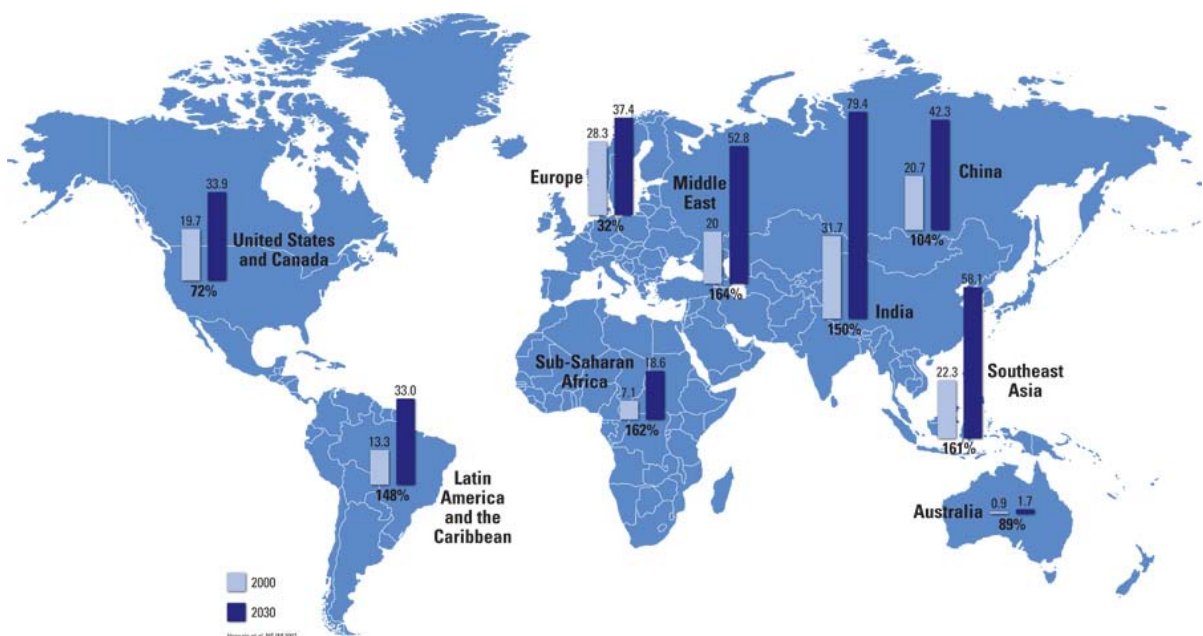


Fig. 1. Millones de casos de diabetes en el año 2000 y su proyección para el 2030 ([Hossain et al., 2007](#))

Todo esto supone un gasto altísimo para los distintos gobiernos en materia de sanidad. Solamente en Estados Unidos la diabetes y sus complicaciones derivadas, suponen un gasto de 612 millones de dólares al año.

Esta enfermedad, tal como apuntamos al inicio de la introducción, tiene varias vertientes, según su origen y etiología: diabetes tipo I, tipo II, gestacional y aquellos tipos de diabetes ocasionados por distintos factores, que de forma menos directa derivan en un mal funcionamiento de la célula beta, como mutaciones, tratamientos con fármacos etc.

### **1.1. Diabetes tipo I.**

La diabetes tipo I, es una enfermedad de carácter autoinmune que se caracteriza por una insuficiencia absoluta de insulina, causada por una destrucción progresiva de las células productoras de esta hormona, debido a un ataque autoinmune de los linfocitos T, que deriva en un estado de hiperglucemia en el enfermo. Una alta proporción de los pacientes con diabetes tipo I desarrolla además otras patologías crónicas y degenerativas como nefropatías, retinopatías y enfermedades cardiovasculares asociadas. ([Athyros and Mikhailidis, 2015](#); [Kekalainen et al., 2000](#); [Peters, 2000](#))

Algunos de sus síntomas son, una excreción excesiva de orina (poliuria), sed, hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Estos síntomas, pueden aparecer de forma súbita.

La diabetes tipo I afecta al 10% de la población mundial y se ha descrito que tiene un factor geográfico importante ([Karvonen et al., 2000](#)), esto puede deberse a las variaciones genéticas entre las poblaciones, así como a la susceptibilidad o resistencia de los individuos a la exposición de determinados factores medioambientales.

En la actualidad, según la “Federación Internacional de Diabetes”, hay una tendencia al incremento de la enfermedad de un 3% por año, esto hace pensar



que los factores ambientales están actuando sobre ciertos genes susceptibles y contribuyendo a este aumento en el número de enfermos.

Los enfermos de diabetes tipo I, dependen totalmente del suministro exógeno de insulina, bien inyectada o suministrada por una bomba. Aún así, este tratamiento no asegura un perfecto control del nivel de glucosa en sangre y el enfermo puede sufrir episodios de hipoglucemia.

### **1.2. Diabetes tipo II.**

Suele desarrollarse en la edad adulta, aunque en los últimos años y debido a un estilo de vida más sedentario el índice de este tipo de diabetes en los niños está aumentando. ([Sabin et al., 2015](#))

Representa el 90% de los casos de enfermos de diabetes y sus causas principales son la obesidad y una falta de actividad física. Los síntomas aunque similares a los que presentan los enfermos de diabetes tipo I, suelen detectarse cuando el enfermo lleva ya varios años padeciendo la enfermedad y comienza a presentar complicaciones asociadas. ([Athyros and Mikhailidis, 2015](#); [MacKinnon, 1999](#); [Ndisang et al., 2015](#))

Su etiología es más compleja que en el caso de la diabetes tipo I, la causa principal es una utilización ineficaz en el organismo de la insulina producida por el páncreas, se genera una resistencia en el músculo esquelético y tejido adiposo de los transportadores de glucosa. Esto genera progresivamente la necesidad de una producción extra de insulina por parte del páncreas, para compensar la resistencia de los órganos periféricos, debido a esta hipersecreción, la célula  $\beta$  va perdiendo su función y finalmente el páncreas termina fallando. ([Alejandro et al., 2015](#); [Janikiewicz et al., 2015](#); [Nakayama et al., 2015](#))

Los islotes pancreáticos de los enfermos de diabetes tipo II se caracterizan por presentar depósitos del péptido amiloide, derivado del polipéptido amiloide del islote (IAPP) también conocido como amilina. Se ha visto que este péptido es responsable de la apoptosis de la célula  $\beta$  del islote, especialmente en su forma de pequeños oligopéptidos de IAPP. ([Butler et al., 2003](#))

Las consecuencias más frecuentes derivadas de la diabetes son las siguientes:

- Un aumento en el riesgo de sufrir cardiopatía y accidente vascular cerebral.
- Retinopatía diabética. Tras 15 años de diabetes, el 2% de los enfermos sufren ceguera y un 10% un grave deterioro de la visión.
- Aumento del riesgo de sufrir úlceras en los pies y como consecuencia más grave, la amputación.
- Entre un 10% y un 20% de enfermos de diabetes fallece por insuficiencia renal.
- Un 50% de los pacientes sufre neuropatías, que se manifiestan con hormigueo debilidad, dolor o entumecimiento en manos y pies.

El resultado final de todas estas complicaciones asociadas a la enfermedad, es que los pacientes de diabetes tienen incrementado en dos veces el riesgo de muerte frente a las personas sanas. Y el impacto económico sobre los enfermos, familiares y sistemas de salud es muy elevado. La OMS calcula que en el periodo entre 2006 y 2015, China dejará de ingresar 558.000 millones de dólares americanos a causa de la diabetes y las enfermedades asociadas a esta.

Por todo esto se hace imprescindible la prevención de la enfermedad. Factores como tener una dieta saludable rica en frutas y hortalizas y baja en azúcares y grasas saturadas, una actividad física regular, mantener un peso corporal adecuado y evitar el consumo de tabaco son cruciales para prevenir o retrasar la aparición de la diabetes tipo II.

El tratamiento ideal para el enfermo, tanto de diabetes tipo I como II, pasa por la recuperación de una masa de célula productora de insulina suficiente para restablecer el equilibrio metabólico del organismo, y para ello actualmente se dispone de dos opciones, bien recurrimos al trasplante de páncreas completo procedente de un donante único, o al trasplante de islotes de Langerhans, para lo que son necesarios, en la actualidad, varios donantes cadavéricos. Este último método es el más seguro, ya que es menos invasivo y elimina riesgos como la trombosis, la pancreatitis y la peritonitis que existen en el caso de un trasplante del órgano completo. ([Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert et al., 2013](#); [Meirelles Junior et al., 2015](#)).

El mayor inconveniente del trasplante de islotes a día de hoy es el ratio donantes/enfermos, así mismo, hay que añadir, que una vez realizado el trasplante, la independencia del enfermo del suministro de insulina es inferior a 5 años, lo que obliga a un nuevos trasplantes sucesivos para mantener el control de los niveles de glucosa. ([Bassi and Fiorina, 2011](#))

Los avances en las técnicas de obtención y trasplante de islotes, la mejora de los mismos, así como los tratamientos que deben seguir los pacientes trasplantados, son claves para alargar la vida del trasplante. ([Chou et al., 2012](#)).

## **2. EL PÁNCREAS.**

El páncreas es un órgano retroperitoneal mixto, de unos 12 a 15 cm de longitud, en el que se reconocen tres zonas, denominadas cabeza, cuerpo y cola (fig. 2). Está envuelto en tejido conectivo y se divide en lóbulos separados a su vez por tejido reticular, tiene un conducto principal, el colédoco, que lo recorre y desemboca en la parte superior del duodeno junto con los ductos procedentes del hígado y la vesícula biliar, en dicho conducto se verterán las hormonas y secreciones producidas por las células que componen el órgano.

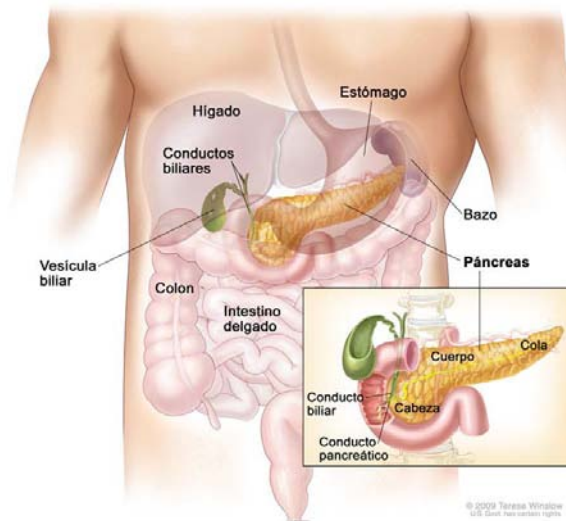


Fig. 2. Localización del páncreas en el cuerpo humano.

Como describíamos inicialmente, el páncreas en mamíferos adultos es un órgano heterogéneo que se compone principalmente de tres tipos celulares: células exocrinas, ductales y endocrinas (fig. 3).

Las células exocrinas, producen enzimas digestivas tales como tripsina y amilasa. Este tejido exocrino se organiza en acinos y compone el 95% del páncreas. Por otro lado están las células ductales, que forman los conductos a los que van a ser vertidas las enzimas digestivas producidas por las células exocrinas. La mayoría de estas enzimas van a ser secretadas como precursores inactivos, para proteger al propio páncreas, y serán activadas una vez estén en el intestino delgado por las enteropeptidasas intestinales.

Las células secretoras de los acinos responden a hormonas gastrointestinales, y su secreción es inhibida por polipéptido pancreático.

Por último las células endocrinas, componen entre el 1% y el 2% de la masa total del páncreas y se agrupan en los llamados islotes de Langerhans, agrupaciones celulares encargadas del metabolismo de la glucosa.

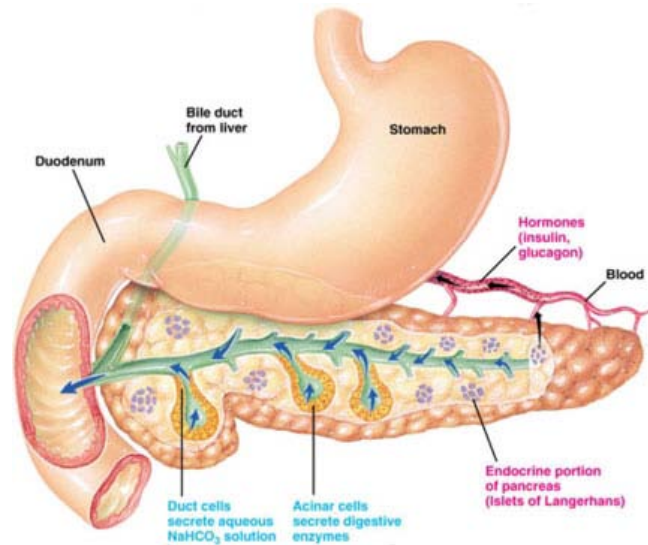


Fig. 3. Esquema del páncreas humano y los tipos celulares que lo componen.

### 3. EL ISLOTE DE LANGERHANS.

El islote de Langerhans fue descrito por primera vez por Paul Langerhans en 1869. El páncreas humano contiene aproximadamente dos millones de islotes, y se localizan principalmente en la cola del páncreas. ([Kulkarni, 2004](#))

El islote se caracteriza por ser una masa celular, con forma oval, embebida en el tejido exocrino. Los islotes varían tanto en su tamaño como en el número de células que lo componen, oscilando desde un diámetro de 40  $\mu\text{m}$  y unas pocas células a 400  $\mu\text{m}$  y 5000 células. Los islotes están ricamente vascularizados, esto permite un alto grado de regulación autocrina del órgano cuya secreción está regulada por hormonas intestinales y directamente por los niveles de glucosa en sangre.

Cada islote se compone de un núcleo de células beta rodeado de otros tipos celulares, y todo ello queda cubierto por una envuelta formada por fibroblastos y fibras de colágeno.

Las proporciones y el posicionamiento de los distintos tipos de células dentro del islote, varían entre las distintas especies y está regulado en el desarrollo. (fig. 4).

- Célula  $\alpha$ : aproximadamente el 20% del islote, secretan la hormona glucagón que va a subir los niveles de azúcar en sangre. Esta célula responde a cambios hormonales y agentes paracrinos tales como la somatostatina.
- Célula  $\beta$ : 75% del islote lo constituye estas células, forman el corazón del islote pancreático. Secretan la hormona insulina, que regula los niveles de glucosa en sangre bajándolos, y también secretan amilina, modulador de la acción de la insulina. La célula  $\beta$  responde a los niveles de azúcar en sangre y a estímulos neuronales.
- Célula  $\delta$ : representan un 5% de las células del islote. Son células neurosecretoras y producen somatostatina, un inhibidor paracrino de la secreción de insulina.
- Células PP: son el 1% del total del islote, secretan polipéptido pancreático, un inhibidor paracrino de la secreción de los acinos.
- Células  $\epsilon$ : descritas recientemente ([Prado et al., 2004](#)), secretan grelina. La grelina es una hormona que es secretada también en el estómago, que aumenta la secreción de hormona del crecimiento y regula el apetito. Su función en el islote es la de regular de forma paracrina la secreción de insulina. ([Dezaki and Yada, 2012](#))

En el caso de los humanos, los distintos tipos celulares que componen el islote se distribuyen en torno a los vasos sanguíneos, pero sin un orden específico, al contrario que en el caso del ratón donde se observa que las células  $\beta$  forman el corazón del islote situándose el resto de tipos celulares en la periferia. ([Cabrera et al., 2006](#))

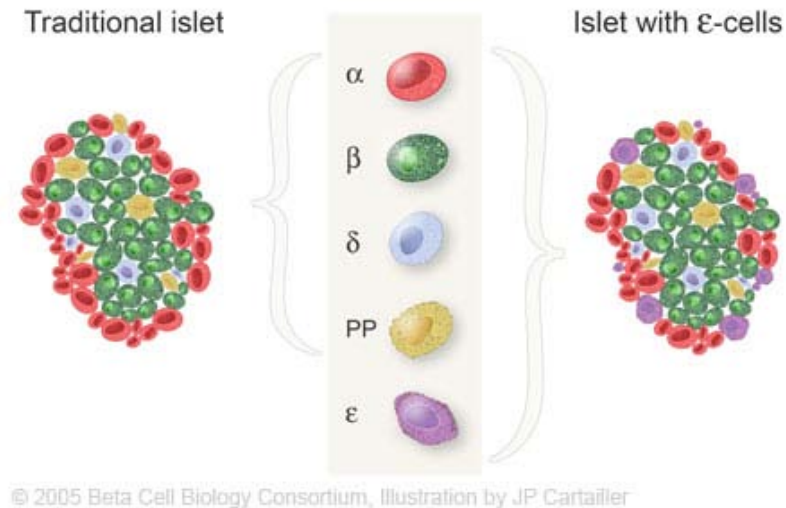


Fig. 4: Tipos celulares del islote de Langerhans.

Tanto las células  $\alpha$  como las  $\beta$  no son exclusiva de los islotes, localizándose también en otros tejidos exocrinos, como células sueltas en el epitelio y pequeños grupos de células asociadas a los ductos.

#### 4. LA CÉLULA BETA.

La célula  $\beta$ , representa entre un 70% y un 80% de la masa de células total del islote.

La función principal de la célula  $\beta$  es la secreción de la insulina, en respuesta a nutrientes, hormonas y estímulos nerviosos, para el mantenimiento de los niveles de glucosa en plasma dentro de un rango fisiológico óptimo para el funcionamiento de todos los tejidos.

Además, por la propia estructura del islote, la célula beta ejerce un papel importante en la regulación paracrina y autocrina de las células que lo componen.

La glucosa es el regulador principal de la síntesis y secreción de la insulina. Cuando aumenta el nivel de glucosa en sangre, se establece un sistema de



acoplamiento estímulo-secreción, de manera que la glucosa entra en la célula beta a través de los transportadores de glucosa (Glut-2), esta glucosa, pasa a glucosa-6-fosfato (G6P) por la acción de la enzima glucoquinasa (GK) que fosforila a la glucosa, incorporándose ésta en la glucólisis o vía de las pentosas fosfato, y dando como resultado piruvato, que va a entrar en la mitocondria para continuar con el ciclo de Krebs. Esto a su vez aumenta el ratio de ATP/ADP intracelular que dará lugar a un bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP, generando una despolarización de la membrana plasmática de la célula beta pancreática que ocasionará una apertura de los canales voltaje-dependientes de calcio, permitiendo la entrada de calcio al citoplasma de la célula beta, lo cual, va a tener dos consecuencias, por una parte, da lugar a la liberación de los gránulos de insulina que estaban acumulados en el citoplasma, y por otra a la activación de la síntesis de insulina a nivel transcripcional (fig. 5).

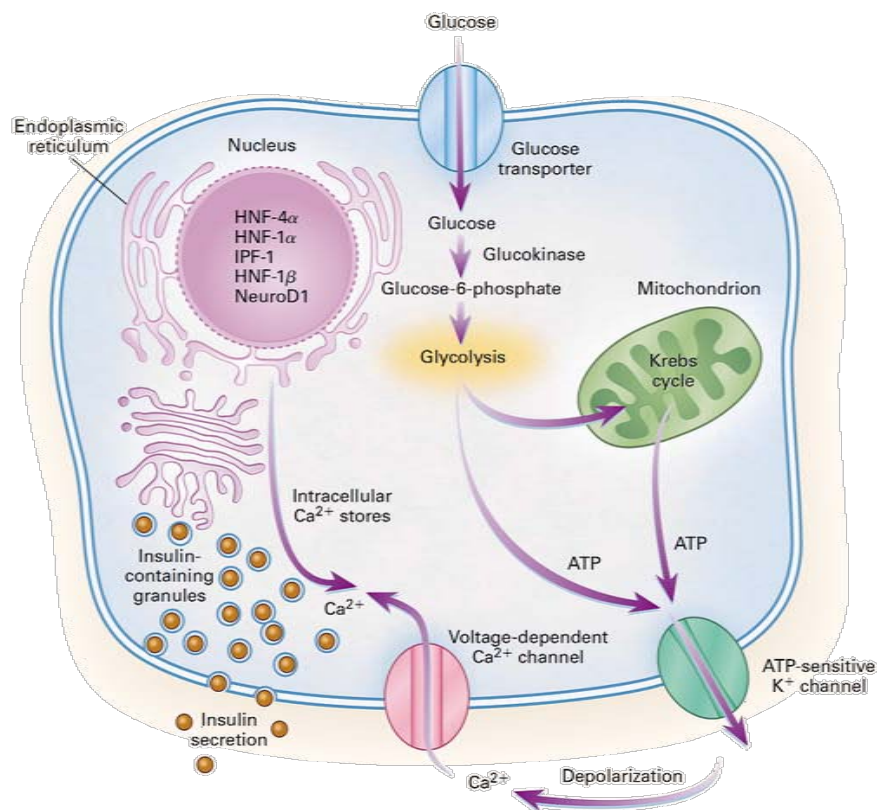


Fig. 5. Esquema del acoplamiento estímulo-secreción de la célula beta. (Fajans et al., 2001)

## 5. LA GLUCOQUINASA.

La enzima glucoquinasa (GK) de mamíferos, es una proteína quinasa que pertenece a la familia de las hexoquinasas (tabla 1), proteínas que van a fosforilar a hexosas tales como la manosa, fructosa o glucosa.

Dicha familia se integra por distintos miembros nombrados desde I-IV o A-D. ([Printz et al., 1993](#)) La expresión de las hexoquinasas I, II y III, se localiza en el cerebro, músculo y eritrocitos, siendo la glucoquinasa de mamíferos la que nombramos como hexoquinasa IV o D, y su función en el metabolismo celular es la de fosforilar la glucosa a glucosa-6-fosfato (fig. 6), que posteriormente se integrará en distintos procesos celulares: glucólisis, ruta de las pentosas-fosfato o síntesis de glucógeno, según los requerimientos y tipos celulares. El nombre de glucoquinasa viene dado por el hecho de que la glucosa es el único sustrato fisiológico relevante. ([Mahalingam et al., 1999](#))

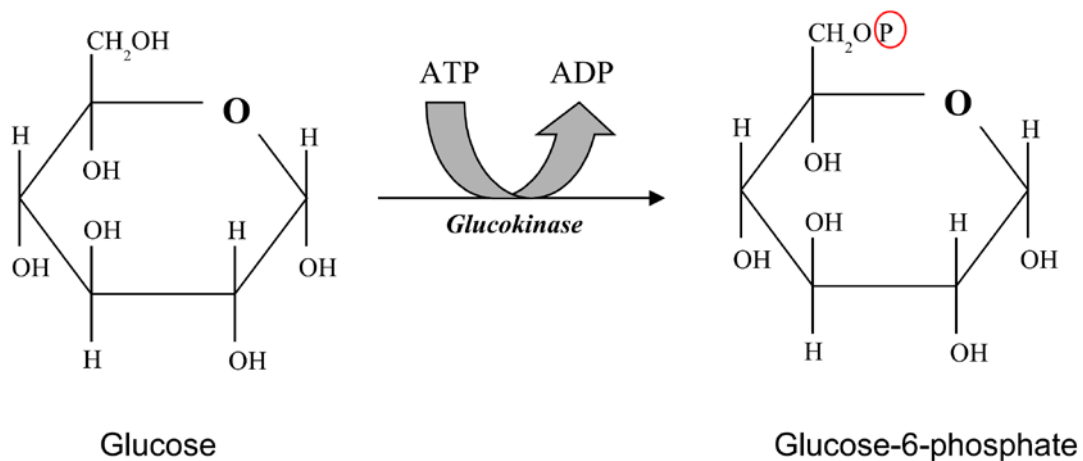


Fig. 6. Reacción de la enzima glucoquinasa. ([Hussain, 2010](#))

La célula  $\beta$  dentro del páncreas y las células del parénquima hepático en el hígado son los máximos responsables del mantenimiento de los niveles de glucosa del organismo (fig. 7). ([Postic et al., 1999](#))

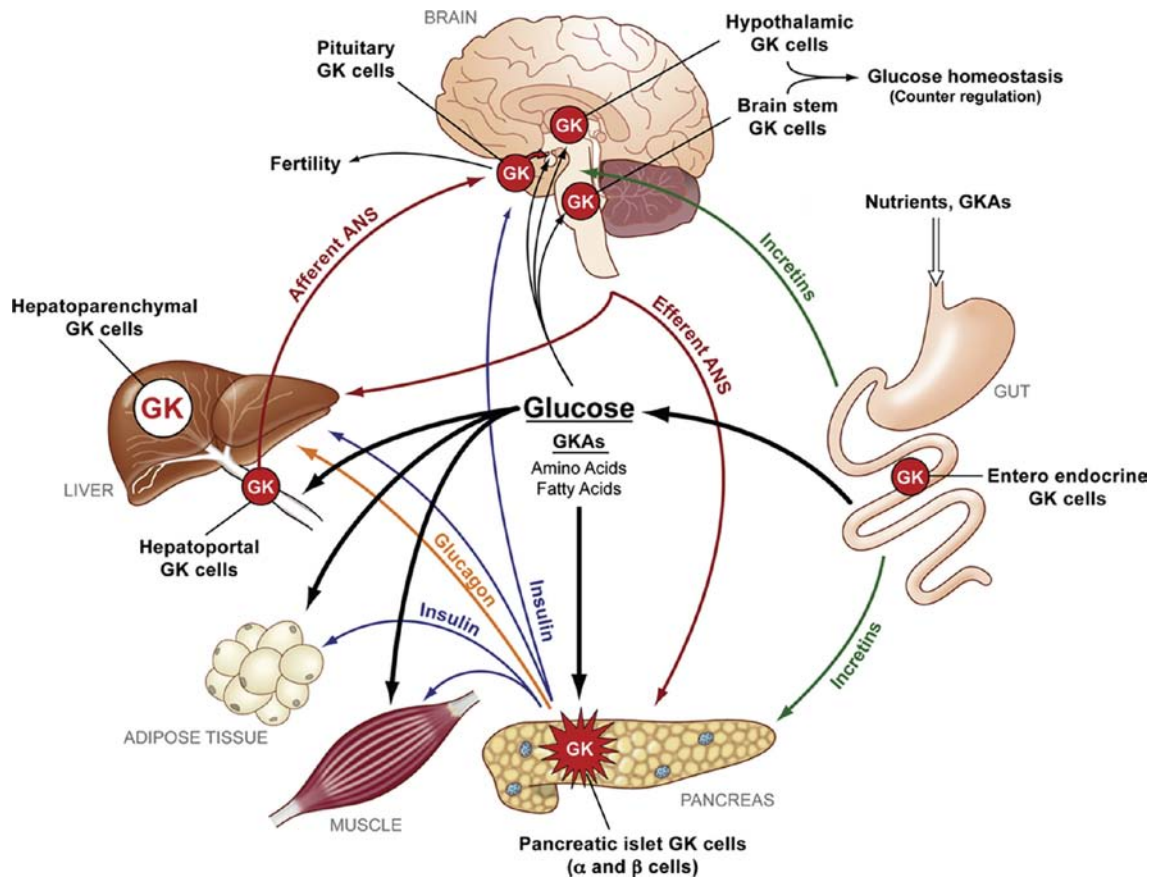


Fig. 7. Esquema de las interacciones entre tejidos productores de glucoquinasa con el resto del organismo. ([Matschinsky and Porte, 2010](#))

Es en el hígado donde se produce la mayoría de la proteína glucoquinasa del organismo un 99.9%, el resto, un 0.1%, lo producen el páncreas, en las células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  ([Heimberg et al., 1996](#); [Toyoda et al., 1997](#)), así como en células endocrinas (pituitaria), vasos sanguíneos y sistema nervioso central (hipotálamo y cerebro) ([Ogunnowo-Bada et al., 2014](#); [Osundiji et al., 2012](#)).



### 5.1. Cinética de la Glucoquinasa.

La proteína glucoquinasa se caracteriza por tener una cinética sigmoideal (lo cual indica un efecto cooperativo positivo) ([lynedjian, 2009](#); [Printz et al., 1993](#)), así como una baja afinidad por su sustrato. Como indica la figura 8 el valor de  $K_{0.5}$  en la cinética de la glucoquinasa (valor medio de saturación) es de aproximadamente 8 mM, este valor coincide con la concentración normal de glucosa en sangre, que oscila entre 5 mM y 8 mM. Esto sumado a otras características estructurales que describiremos a continuación y una carencia de inhibición por su sustrato, la definen como un excelente sensor de glucosa.

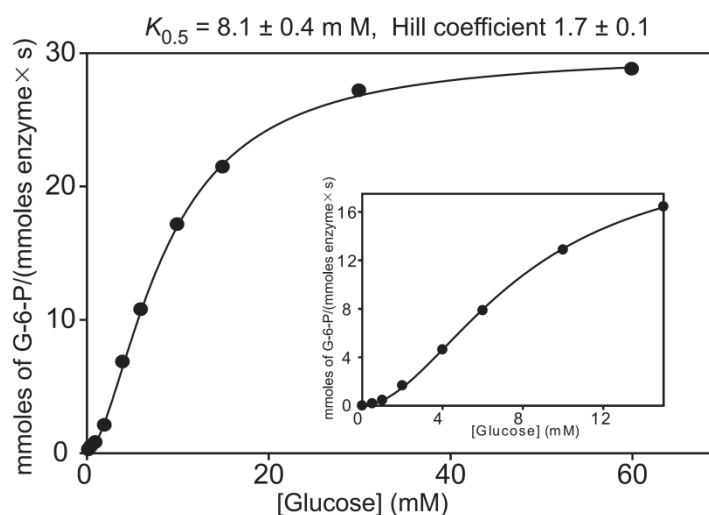


Fig. 8. Cinética de la proteína glucoquinasa humana. ([Larion and Miller, 2012](#))

### 5.2. Estructura de la molécula de Glucoquinasa e importancia para su funcionamiento.

La glucoquinasa, en su forma monomérica resulta catalíticamente activa y posee un único sitio de unión a la glucosa (sitio activo), lo cual contrasta con el hecho de que posea una cinética sigmoideal, que indicaría la existencia de una interacción alostérica de distintas subunidades y/o de múltiples sitios activos dentro de la misma molécula actuando de manera cooperativa.



En la estructura de la glucoquinasa (fig. 9) podemos diferenciar dos dominios globulares, uno mayor que otro, unidos por tres lazos flexibles que forman un “bolsillo” donde se va a unir la glucosa. Además posee un sitio de unión a un activador (GKA). Y su función, en hígado, va a estar inhibida por la proteína reguladora de la glucoquinasa (GKRP).

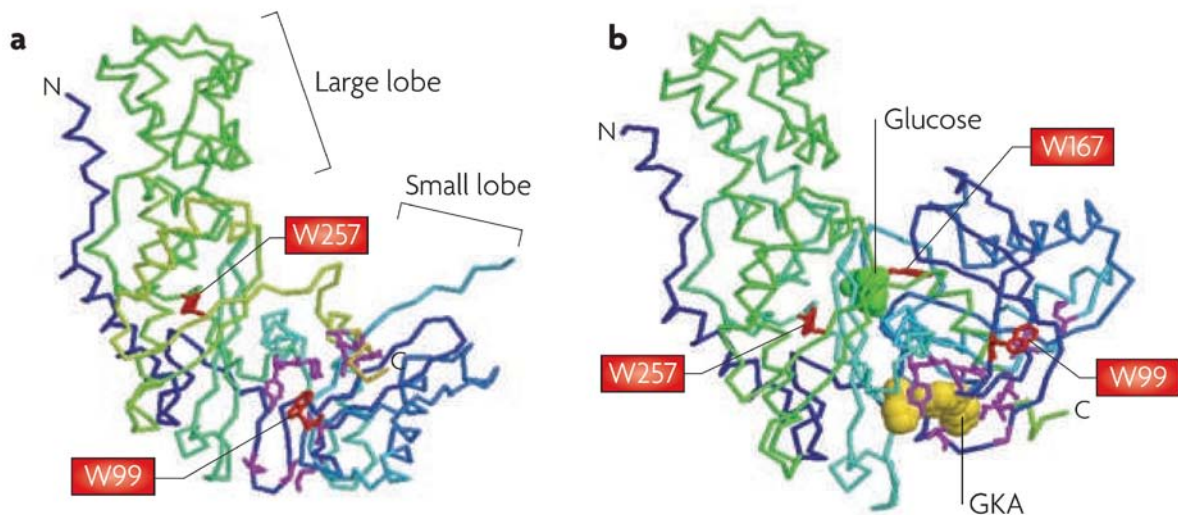


Fig. 9. Estructura de la glucoquinasa. **a.** conformación abierta o inactiva. **b.** conformación cerrada o activa, se indican los sitios de interacción de la glucosa y el activador de la glucoquinasa. ([Matschinsky, 2009](#))

Estudios de cristalización de la glucoquinasa ([Huang et al., 2013](#); [Kamata et al., 2004](#)), revelan la existencia de tres conformaciones diferentes de dicha enzima que van a condicionar su afinidad por el sustrato y dar como resultado una cinética cooperativa, de esta manera se puede comprender el mecanismo alostérico de la glucoquinasa y explicar la cinética sigmoideal que presenta.

Por un lado tenemos una forma súper-abierta o inactiva. Esta configuración se da en ausencia de ligandos y se caracteriza por presentar una baja afinidad por la glucosa. Del otro lado está la conformación cerrada o activa, caracterizada por una alta afinidad por la glucosa. La transición entre ambos estadios conformacionales, se da por una rotación e inclinación del dominio globular más pequeño, así como un cambio del mismo en su estructura secundaria.

Entre ambas conformaciones se da una situación intermedia y muy inestable denominada conformación o estructura abierta que es también activa y que se da a altas concentraciones de glucosa.

De este modo la proteína glucoquinasa presentaría tres estadios conformacionales y dos ciclos catalíticos que explican su cinética sigmoideal (fig.10).

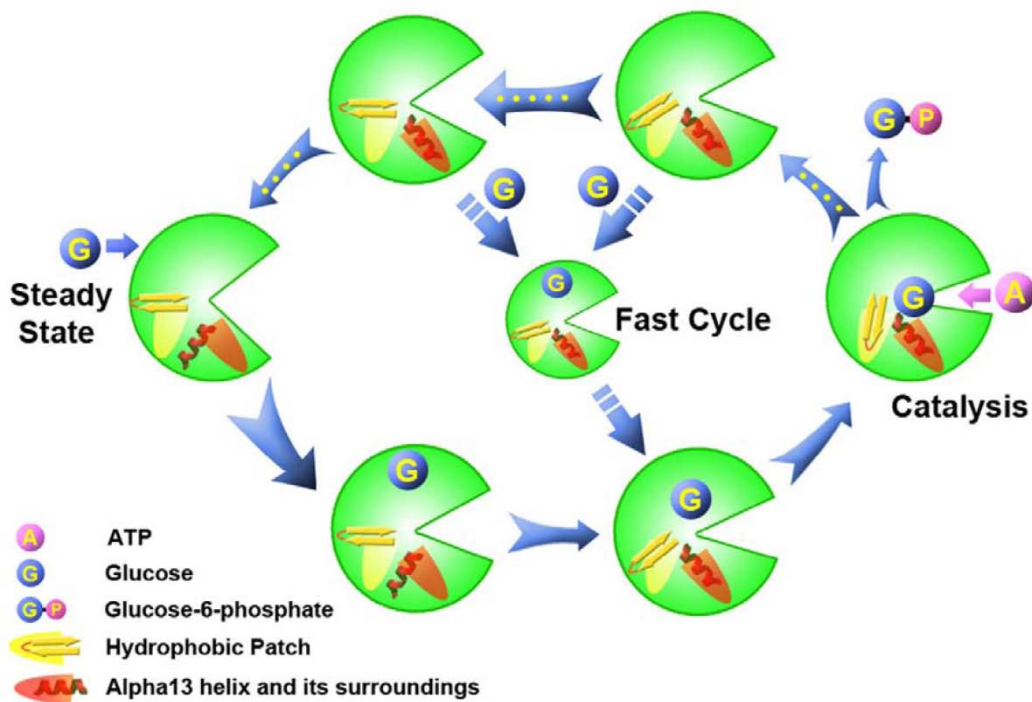


Fig. 10. Modelo cinético de la glucoquinasa ([Huang et al., 2013](#))

El cambio de configuración de la forma súper-abierta a la cerrada es más lento que el ciclo catalítico de la enzima, lo cual le confiere parte de su idoneidad como sensor de glucosa.

Con estos datos estructurales y cinéticos, a esta proteína se le aplica un modelo usado para proteínas monoméricas con cinéticas cooperativas positivas, denominado “mnemonic model” o “modelo mnemotécnico”, en el que la proteína una vez en su forma activa, “recuerda” su interacción con el ligando

y esto retrasa su vuelta a la conformación inactiva. Dicho modelo tiene las siguientes características:

- El establecimiento de un equilibrio entre los distintos estadios conformacionales, entre los cuales existe una gran diferencia de afinidad por el ligando, que en nuestro caso es la glucosa.
- Predominio de la conformación inactiva o de baja afinidad en ausencia del ligando.
- Cambio entre las conformaciones lento, en ausencia de glucosa.
- Cambio del estadio de baja afinidad al del alta afinidad altamente acelerado por la unión del ligando a la proteína.
- Únicamente la forma de alta afinidad es catalíticamente activa, y esta actividad es muy rápida comparada con la velocidad de transición entre las dos conformaciones.

Las mutaciones en esta proteína, de las que hablaremos en apartados posteriores, se podrían clasificar dentro de dos grupos. Por un lado, aquellas que conllevan una inactivación de la proteína y que van a dar lugar a hiperglucemia ([Grupe et al., 1995](#)), y por otro lado, mutaciones activadoras que producen (entre otras alteraciones) una situación de hipoglucemia en el organismo, es en este último tipo de mutaciones y sus consecuencias en la que nos centraremos en el presente trabajo.

### **5.3. Regulación de la Glucoquinasa: un gen, dos promotores.**

El gen de la glucoquinasa (*GCK*) fue identificado por primera vez en hígado de rata en 1962. En 1992 dos trabajos ([Froquel et al., 1992](#); [Hattersley et al., 1992](#)), relacionaron por primera vez este gen con el desarrollo de un tipo de diabetes (MODY 2) y el metabolismo de la glucosa.

En humanos la localización citogenética de este gen es: 7p15.3-p15.1, es decir en el brazo corto del cromosoma 7, entre las posiciones 15.3 y 15.1 y se



extiende desde el par de bases 44144271 al 44189423. (fig. 11), codificando una proteína de 465 amino-ácidos, con peso molecular de 52,191 Da.

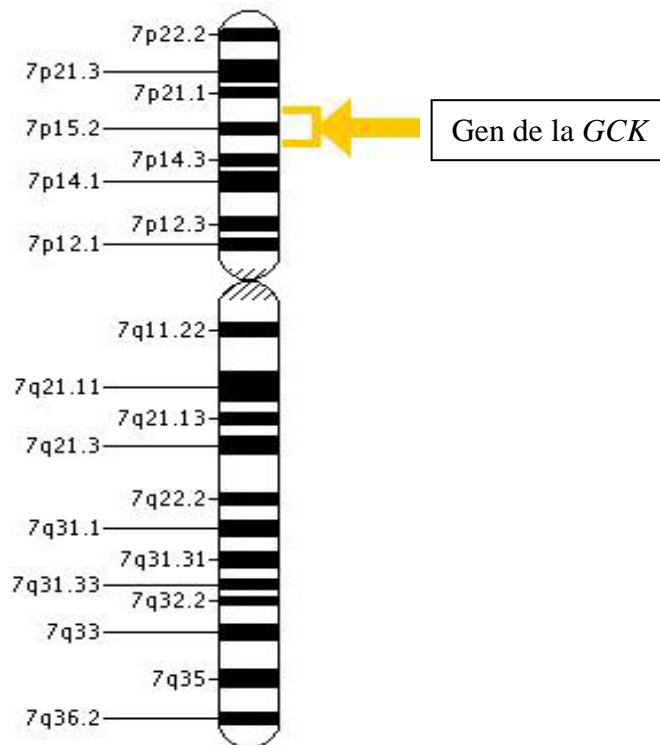


Fig. 11. Cromosoma 7 donde se localiza el gen de la Glucoquinasa.  
(ref. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/GCK>)

Como ya hemos dicho, la glucoquinasa se expresa en diferentes tejidos encargados de sensor y mantener la homeostasis de la glucosa en el organismo. ([Postic et al., 1999](#))

Esta proteína se caracteriza por tener un sistema dual de regulación, dependiente de glucosa en el páncreas y de insulina en el hígado. Este tipo de regulación tiene su origen en tres isoformas distintas de la proteína cuya expresión viene regulada a su vez por dos promotores diferentes, uno aguas arriba y un segundo aguas abajo del gen de la glucoquinasa.

El gen de la glucoquinasa humana al igual que el de rata consta de 10 exones, 9 de los cuales son comunes a las tres isoformas y siendo el primero el que determina la expresión dependiente de tejido (fig. 12).

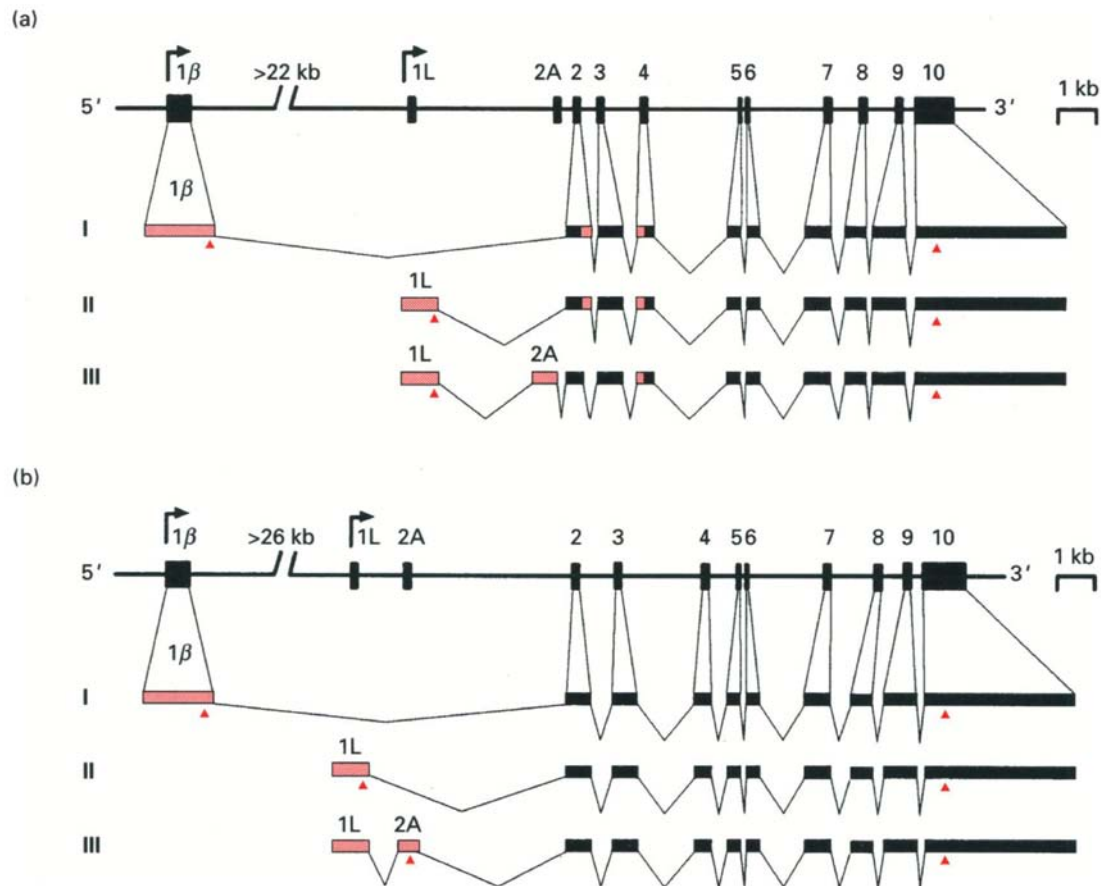


Fig. 12. Glucoquinasas de rata (a) y humana (b). Organización exón-intrón del gen. Los exones comunes están representados con cajas negras y en rosa las distintas alternativas de procesado, según la isoforma que se exprese. Las flechas indican el inicio de la transcripción según los distintos promotores. I. Transcripción resultante de la activación del promotor endocrino en células  $\beta$  del islote de Langerhans. II y III. Transcripción correspondiente al promotor hepático. ([lynedjian, 1993](#))

La expresión de la isoforma pancreática (isoforma 1) de la glucoquinasa, que se da en las células sensoras de glucosa situadas principalmente en páncreas, pero también en la pituitaria, en algunas neuronas del cerebro y en células enteroendocrinas del intestino, es constitutiva y depende del promotor situado aguas arriba del gen glucoquinasa, denominado “promotor endocrino” y cuya regulación está directamente relacionada con los niveles de glucosa en sangre ([lynedjian, 1993](#)).

Del mismo modo en el tejido hepático, la expresión de la proteína (isoformas 2 y 3), viene regulada positivamente por la insulina e inhibida por el glucagón y es dependiente del promotor situado aguas abajo, denominado “promotor hepático” ([lynedjian, 1993, 2009](#)).

#### **5.4. Regulación post-transcripcional de la Glucoquinasa.**

Son distintas las proteínas y orgánulos celulares que interaccionan con la glucoquinasa, y que regulan su función, tanto por un cambio en su localización dentro de la célula como en su estabilidad, ejerciendo un papel importante en su regulación post-transcripcional. ([Postic et al., 2001](#))

Entre estas proteínas se encuentra la proteína reguladora de la glucoquinasa (GKRP) ([Bourbonais et al., 2012](#)), que regula la función de la glucoquinasa en el hígado, por un cambio de localización de esta, que viene determinado por las concentraciones de glucosa y fructosa.

En presencia de fructosa-6-P la GKRP se une a la glucoquinasa secuestrándola dentro del núcleo de las células hepáticas y disminuyendo por tanto su actividad. Cuando aumenta la concentración de fructosa-1-P, la afinidad de la GKRP por la glucoquinasa baja, y esta es liberada al citoplasma para poder así ejercer su función celular. Este cambio en la localización de la proteína hace posible una respuesta por parte de la célula mucho más rápida y eficiente que la síntesis *de novo* de glucoquinasa en respuesta a insulina ([Kaminski et al., 2014](#)).

La proteína 6-Fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa (6PF2K/F2,6P2ase), también regula la actividad de la glucoquinasa de dos formas, por un lado es la encargada de translocar la GK desde el núcleo al citoplasma en las células del hígado, y por otra parte su unión favorece una estabilización de la proteína tanto en células del hígado como en las células  $\beta$  del páncreas aumentando su actividad catalítica. ([Baltrusch et al., 2001](#); [Cullen et al., 2014](#)).

## 6. MUTACIONES DE LA GLUCOQUINASA Y SU EFECTO EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.

Como ya hemos introducido en apartados anteriores son numerosas las mutaciones que se han descrito en esta proteína y que afectan a su función. Hasta el año 2003 se habían descrito 195 mutaciones (fig. 13), localizadas a lo largo de los 10 exones expresados en la isoforma pancreática de la proteína glucoquinasa ([Gloyn, 2003](#)). Ha día de hoy la cifra de mutaciones conocidas asciende a 250.

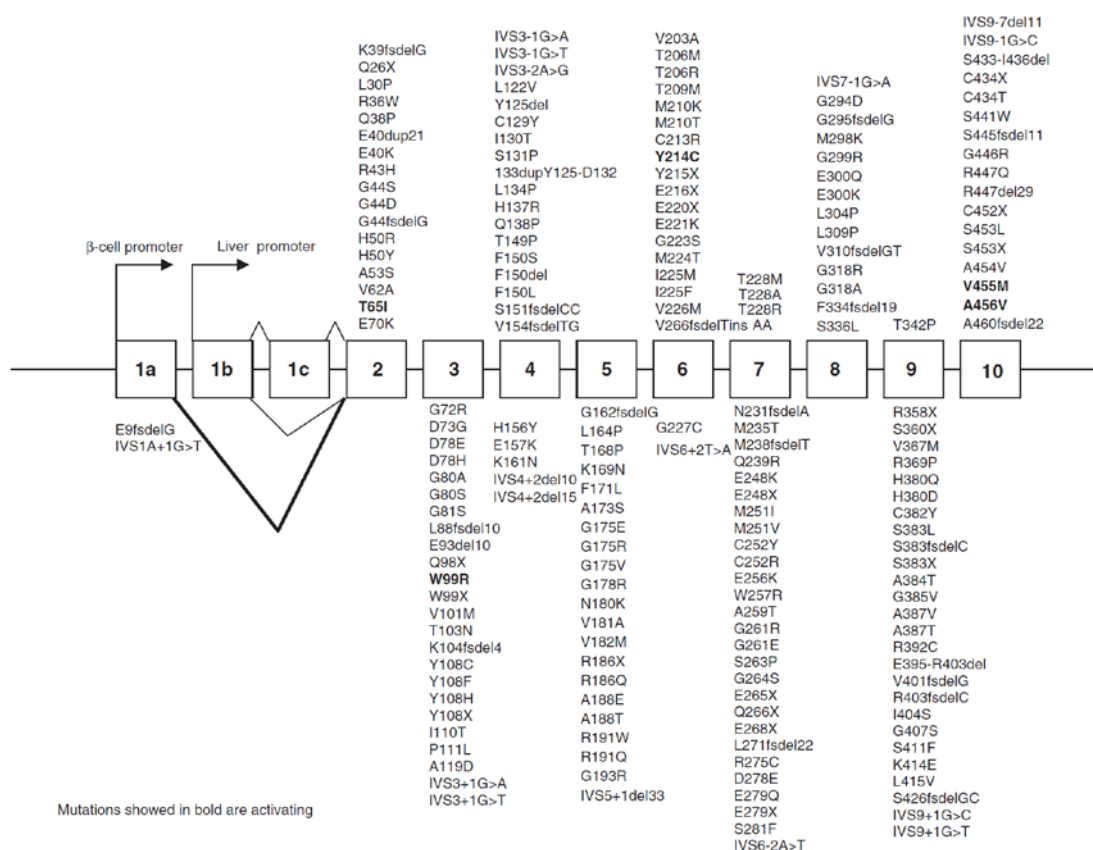


Fig. 13. Esquema de las mutaciones identificadas hasta 2003. En negrita se indican aquellas que son activadoras de función. ([Gloyn, 2003](#))

Como hemos comentado anteriormente, la glucoquinasa ejerce un extraordinario control sobre la secreción de insulina y por lo tanto en la homeostasis de la glucosa en el humano. En efecto, mutaciones en su gen (*GCK*) que inactivan la proteína glucoquinasa dan lugar a diabetes en humanos ([Kesavan et al., 1997](#); [Njolstad et al., 2001](#)) y, por el contrario, mutaciones en *GCK* que aumentan la actividad de la glucoquinasa por encima de su nivel fisiológico, dan lugar, también en humanos, a cuadros de hipoglucemias sintomáticas.

La razón por la cual la alteración en la funcionalidad de la glucoquinasa puede causar dos patologías opuestas, se basa en que esta proteína es considerada como el “sensor de la glucosa sanguínea” de la célula  $\beta$  pancreática ([Matschinsky et al., 1993](#)), gobernando el metabolismo de la secreción de insulina estimulada por la glucosa (SIEG) en dicha célula y definiendo el umbral fisiológico de dicha secreción (U-SIEG), que en el humano es de 5 mM. De manera que una disminución en la actividad de la glucoquinasa causará un aumento en el U-SIEG (>5 mM) (Fig. 14), dando lugar a un comienzo tardío de la secreción de insulina que se traducirá en el paciente como cuadros de hiperglucemia que, dependiendo del tipo de mutación, pueden ser tanto de carácter leve como es el caso de la *GCK*-Hiperglucemia, como severo como es el caso de la diabetes neonatal por mutaciones homocigotas en *GCK* (*GCK*-DNP).

De forma opuesta, un aumento suprafisiológico en la actividad de la glucoquinasa causará una disminución en el U-SIEG (<5 mM) (Fig. 14), dando lugar a un defecto en la supresión de insulina que hace que esta continúe aún con niveles de glucosa inferiores a 5 mM, dando, por lo tanto, lugar a la aparición de hipoglucemias (*GCK*-Hipoglucemia), las cuales pueden ser tanto leves como severas e incompatibles con la vida.

Estos tres síndromes causados por mutaciones en *GCK* (*GCK*-Hiperglucemia, *GCK*-DNP y *GCK*-Hipoglucemia) forman parte de los que hoy conocemos como “*enfermedad de la glucoquinasa*”. ([Osbak et al., 2009](#))

Mutaciones en *GCK* darán lugar a la creación de una proteína con características estructurales, cinéticas y funcionales alteradas que no sólo afectarán al adecuado mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, sino que afectará también a diferentes procesos de la célula beta pancreática ([Andrikopoulos et al., 2000](#); [Heredia et al., 2006](#); [Mahalingam et al., 1999](#); [Pedelini et al., 2005](#)).

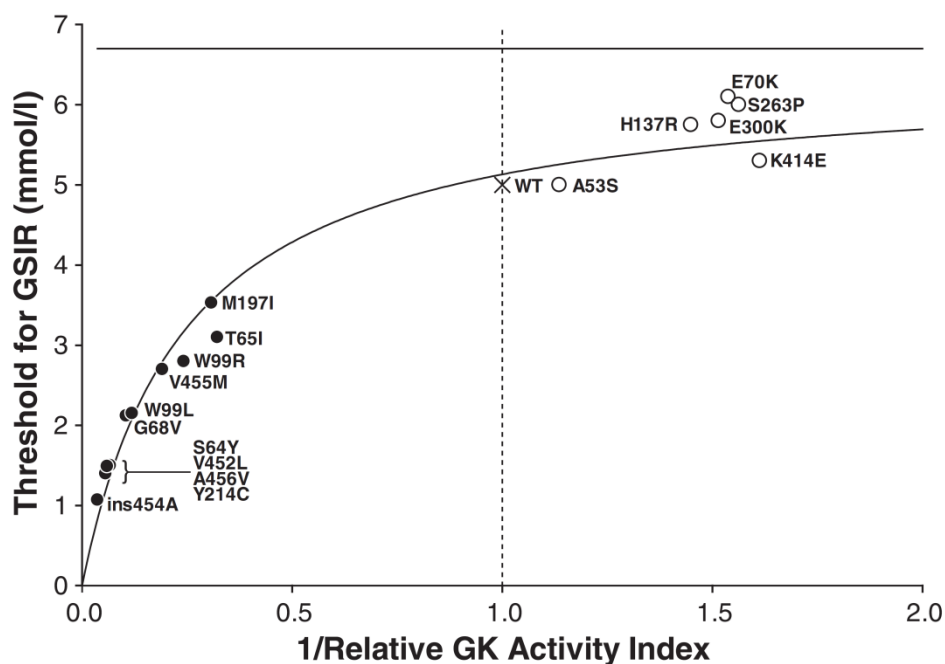


Fig. 14. Umbrales relativos para la secreción de insulina dependiente de glucosa, de distintos mutantes de glucoquinasa, tanto activadores como represores. ([Sayed et al., 2009](#))

### 6.1. Mutación activadora de *GCK*, *V91L* (*GCK-V91L*). Localización y efecto sobre el metabolismo de la glucosa.

La glucoquinasa es una proteína con un total de 465 aminoácidos y aproximadamente 56 kDa. La mutación *GCK-V91L* situada en el exón 3 de su secuencia, consiste en el cambio de una guanina a una timidina, que a su vez

implica un cambio de aminoácidos en la proteína de una valina en la posición 91 a una leucina (fig. 15).

```

GCK Silvestre: ctg gtg aag gtg gga gaa ggt gag gag ggg cag
GCK V91L:      ctg gtg aag ttg gga gaa ggt gag gag ggg cag

MLDDRAMEA AKKEKVEQIL AEFQLQEEDL KKVMRRMQKE MDRGLRLETH EEASVKMLPT
YVRSTPEGSE VGDFLSLDLG GTNFRVMLVK VGEGEEGQWS VKTKHQMYSI PEDAMTGTAE
MLFDYISECI SDFLDKHQMK HKKLPLGFTF SFPVRHEDID KGILLNWTKG FKASGAEGNN
VVGLLRDAIK RRGDFEMDVV AMVNDTVATM ISCYEDHQC EVGMIVGTGC NACYMEEMQN
VELVEGDEGR MCVNTEWGAF GDSGELDEFL LEYDRLVDES SANPGQQLYE KLIGGKYMGE
LVRLVLLRLV DENLLFHGEA SEQLRTRGAF ETRFVSQVES DTGDRKQIYN ILSTLGLRPS
TTDCDIVRRA CESVSTRAAH MCSAGLAGVI NRMRESRSED VMRITVGVDG SVYKLLHPSFK
ERFHASVRRL TPSCEITFIE SEEGSGRGAA LVSAVACKKA CMLGQ
    
```

Fig. 15. Fragmento de la secuencia del ADNc de la glucoquinasa donde se indica en rojo el codón afectado por la mutación V91L. Secuencia de aminoácidos de la glucoquinasa, en rojo la valina 91 que cambia a leucina en la proteína mutada.

Si estudiamos la configuración de la glucoquinasa (fig. 16), veremos como esa posición se encuentra en el sitio alostérico de la enzima, afectando a su afinidad por su sustrato.

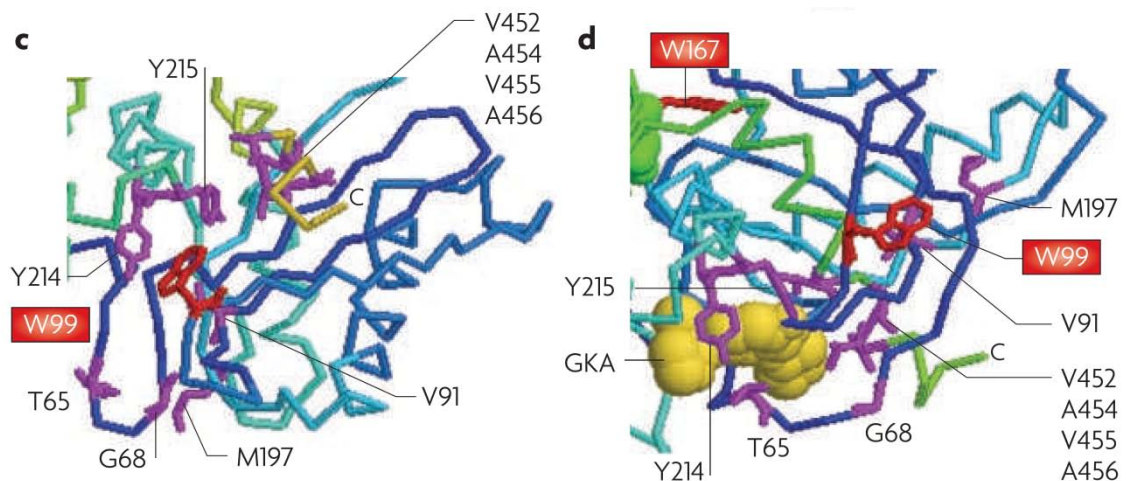


Fig. 16. Situación de distintas mutaciones activadoras de glucoquinasa, incluida la V91L, en el sitio alostérico de la proteína, en la conformación súper-abierta (c) y cerrada (d). ([Matschinsky, 2009](#))



Esta alteración del sitio activo de la proteína va a tener distintas consecuencias en su interacción con la glucosa y las proteínas activadoras de la glucoquinasa. ([Zelent et al., 2011](#)).

En la siguiente tabla vemos algunas de las características cinéticas principales de las 13 mutaciones activadoras de función conocidas hasta el momento, incluida la V91L, con respecto a la proteína silvestre. (Tabla 2)

Glucokinase mutant	Type of glucokinase	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	Glucose $S_{0.5}$ (mM)	ATP $K_m$ (mM)	$n_H$	%AI	GSIR threshold (mM)
Wild type*	Glucokinase	62.8	7.45	0.46	1.77	1.00	5.00
M197I <sup>†</sup>	Glucokinase	58.1	2.49	1.39	1.80	4.35	2.70
V455M*	Glucokinase	61.8	3.24	0.38	1.62	4.82	2.80
W99R*	Glucokinase	43.1	2.25	0.81	1.55	5.56	2.80
T65I*	Glucokinase	22.6	1.69	0.57	1.30	5.60	3.10
V452L <sup>142</sup>	GST–glucokinase	41.7	2.57	0.58	1.34	5.75	3.00
W99L <sup>†</sup>	Glucokinase	85.6	2.86	0.42	1.63	7.97	2.20
W99C <sup>§</sup>	Glucokinase	72.3	2.37	0.37	1.66	9.57	2.00
S64Y <sup>143</sup>	GST–glucokinase	54.0	1.49	1.07	1.33	13.4	1.75
A456V <sup>†</sup>	Glucokinase	65.6	1.91	0.35	1.37	14.3	1.65
V91L <sup>§</sup>	Glucokinase	60.6	1.66	0.48	1.42	14.9	1.55
G68V <sup>144</sup>	GST–glucokinase	68.0	1.94	0.28	1.25	16.1	1.45
454A insert <sup>†</sup>	Glucokinase	52.2	1.38	0.31	1.62	16.6	1.43
Y214C <sup>§</sup>	Glucokinase	65.3	1.35	1.08	1.55	17.3	1.40

Tabla 2. ([Matschinsky, 2009](#))

Como se muestra en la figura 17, destaca, el valor del umbral de concentración de glucosa al que se activa la secreción de insulina dependiente de glucosa, que en el caso de la proteína glucoquinasa silvestre, se ajusta a los valores fisiológicos de glucosa de 5 mM, y la glucoquinasa mutante V91L se activa con un nivel de 1.55 mM, sensiblemente inferior al nivel normal en sangre.

También se ve alterado, el valor medio de respuesta de la enzima ( $S_{0.5}$ ), que baja considerablemente de 7.45 mM a 1.66 mM, lo que nos indica un incremento muy significativo en la afinidad de glucoquinasa por la glucosa y una cinética de activación alterada.



Todas estas alteraciones en el funcionamiento de la glucoquinasa van a tener unas consecuencias fisiológicas muy importantes en los pacientes que la sufren y que veremos en el próximo apartado de la introducción.

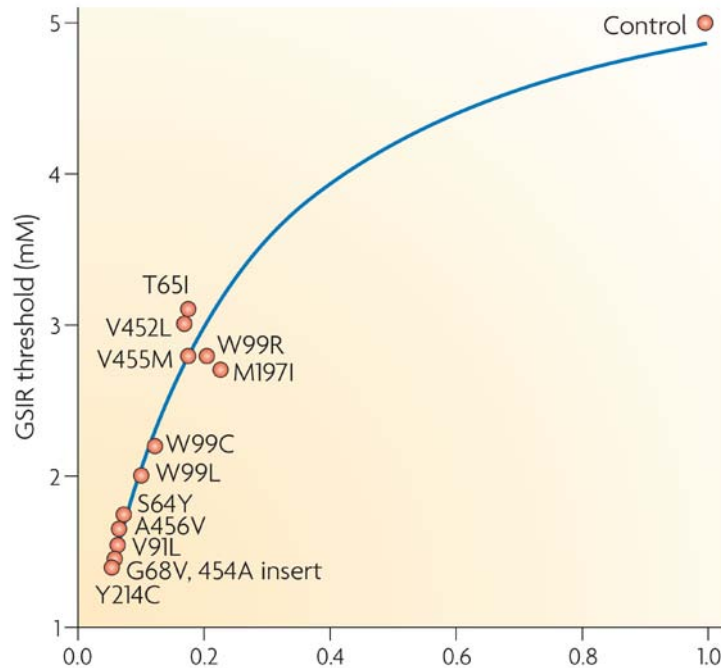


Fig. 17. Comparación de los umbrales para la secreción de insulina dependiente de glucosa y del índice de actividad enzimática relativa, en distintos mutantes y la proteína glucoquinasa silvestre. ([Matschinsky, 2009](#))

## 7. EFECTOS FISIOLÓGICOS EN MUTANTES DE V91L. HIPOGLUCEMIA NEONATAL E INFANTIL SEVERA.

La proteína glucoquinasa resultante de mutaciones activadoras de GCK, presenta un aumento en su afinidad por la glucosa y una mayor eficacia catalítica, dando lugar a que el U-SIEG disminuya por debajo del nivel fisiológico de 5 mM, haciendo, por lo tanto, que la secreción de insulina continúe hasta que la célula pancreática alcance su “umbral patológico” de SIEG, siempre menor de 5 mM. Este retraso en la supresión de la SIEG dará lugar a la aparición de hipoglucemia.

*GCK*-Hipoglucemia es una entidad clínica diferente al hiperinsulinismo causado por mutaciones en genes diferentes (*SUR*-HI, *Kir6.2*-HI, etc.). En efecto, aunque el fenotipo clínico es en muchos casos idénticos, *GCK*-Hipoglucemia es, tanto desde un punto de vista histológico como patofisiológico, diferente al hiperinsulinismo clásico. En *GCK*-Hipoglucemia los islotes pancreáticos presentan una cito-arquitectura completamente normal, con una secreción de insulina totalmente acoplada al metabolismo de la célula  $\beta$ , y por lo tanto “regulada”. De hecho, los pacientes con *GCK*-Hipoglucemia presentan supresión de la secreción de insulina durante el test de ayuno una vez que alcanzan su propio U-SIEG. Al contrario, en *SUR*-HI y *Kir6.2*-HI, los islotes pancreáticos se encuentran desestructurados y de tamaño muy reducido, y la secreción de insulina es totalmente independiente del metabolismo de la célula  $\beta$ , y por lo tanto “no regulada”. En efecto, los pacientes con este tipo de Hiperinsulinismo presentan una gran secreción de insulina aún con niveles de glucemia extremadamente bajos.

La presentación clínica así como la edad de diagnóstico de la hipoglucemia debido a mutaciones activadoras en *GCK* varía incluso entre personas portadoras de la misma mutación y pertenecientes a la misma familia, de manera que un paciente puede presentar la enfermedad en el momento del nacimiento como una hipoglucemia neonatal, mientras que otros miembros de la misma familia, pudiendo ser incluso uno de los progenitores, pueden no haber presentado síntomas de hipoglucemia hasta la adolescencia o hasta entrada la edad adulta. Igualmente el peso al nacer de los pacientes también carece de homogeneidad, ya que las personas portadoras de mutaciones activadoras en *GCK* pueden presentar un peso al nacer tanto elevado como disminuido e incluso normal.

La forma más severa *GCK*-Hipoglucemia es conocida como Hipoglucemia Severa Neonatal, y en todos los casos descritos hasta el momento, la hipoglucemia no puede ser tratada con medicación alguna, por lo que los pacientes necesitan de una pancreatectomía subtotal para controlar dicha hipoglucemia.

En 1998 se describió por primera vez un caso de hiperinsulinemia hipoglucemia relacionada con una mutación activadora de función en el gen de la glucoquinasa humana ([Glaser et al., 1998](#)). La hipoglucemia asociada a glucoquinasa se describió inicialmente como una bajada leve pero rápida en los niveles de glucosa de forma regular y de carácter moderado tras la ingesta de alimentos. El primer caso de hipoglucemia neonatal severa asociada a glucoquinasa que no respondía a tratamiento farmacológico ni quirúrgico, fue descrito en 2004 ([Cuesta-Munoz et al., 2004](#)).

Posteriormente se describieron más casos, que respondían de forma heterogénea al tratamiento, según el tipo de mutación que los produjera.

Centrándonos en la mutación V91L, objeto de este estudio, hasta el momento la casuística asociada a ella es muy escasa. En 2010 ([Kassem et al., 2010](#)) se describe el primer caso de hipoglucemia asociada a glucoquinasa por esta mutación (*GCK-V91L*). La paciente presentaba una hipoglucemia neonatal severa, y tras diferentes tratamientos farmacológicos a altas dosis, la paciente tuvo que ser sometida a una pancreatectomía subtotal, extirpándosele un 80% de páncreas, para poder controlar su hipoglucemia. Es importante resaltar, que siete años después de la pancreatectomía subtotal y con tan sólo 20.000 islotes (un páncreas completo y sano presenta entre 1.000.000-1.200.000 islotes), la paciente lleva una vida normal, manteniendo niveles adecuados de glucemia sin tratamiento alguno.

El estudio histológico del tejido pancreático de pacientes con hipoglucemias severas causadas por mutaciones activadoras de *GCK*, reveló diversas anomalías. En primer lugar el tamaño de los islotes de Langerhans era sensiblemente mayor (2.5 veces) que los correspondientes a un individuo sano de las mismas características sin mutación en *GCK* y sin patología pancreática. Superaban también el tamaño de los islotes de pacientes que sufrían hipoglucemias asociadas a mutaciones en canales de  $K_{ATP}$ . Así mismo también se observó que la masa de células era mayor en esta paciente que en el control y en pacientes con hipoglucemia asociada a canales de  $K_{ATP}$ .

Se realizaron también estudios de proliferación y apoptosis, en los que se vio que había un incremento de ambas, posiblemente debido al aumento de flujo intracelular de glucosa, esto concuerda con los estudios realizados en ratón.

Como se mencionó anteriormente, esta mutación afecta tanto a la isoforma pancreática como a la hepática, por tanto, surge la pregunta de cómo puede verse afectada la función de la glucoquinasa en el hígado. Dada la escasez de pacientes y el fuerte efecto sobre la función pancreática, esta duda permanece a día de hoy poco resuelta. Es posible, que el aumento de la afinidad por la glucosa que presenta esta forma mutada de la enzima, pueda repercutir en un aumento de la síntesis de glucógeno, así como una bajada en la eficacia de la gluconeogénesis en el hígado ([Guo et al., 2012](#)). Aparentemente, los pacientes hasta ahora diagnosticados no presentan ninguna patología a nivel hepático asociada, salvo un caso en el que se observó un mayor tamaño del hígado, aunque se desconoce si está relacionado con la mutación en la proteína.

## **8. TERAPIA GÉNICA/CELULAR.**

En la actualidad, las terapias que se aplican a los enfermos de diabetes, van encaminadas al control de la glucemia mediante el suministro exógeno de insulina, pero como ya comentábamos al inicio de la introducción, este control no es estable y preciso, lo que lleva al paciente a sufrir trastornos de salud a largo plazo.

La mejor opción para el enfermo pasa por la recuperación de una masa de célula  $\beta$ , suficiente para mantener la homeostasis del organismo ([Weir et al., 2011](#)). Son dos las líneas de investigación que se siguen en la actualidad en la terapia celular.

Por una parte, la regeneración “*in vivo*” de la célula  $\beta$ , mediante la estimulación de la proliferación. Dada la plasticidad de la célula  $\beta$ , conocida en determinadas situaciones no patológicas del organismo como embarazos o cambios en la

resistencia a insulina, se postula como opción terapéutica, el desarrollo de herramientas farmacológicas que reproduzcan estas situaciones y aumenten la masa de célula  $\beta$  en el enfermo de diabetes. ([Khalailah et al., 2008](#); [Terauchi et al., 2007](#))

Por otro lado, la obtención de células productoras de insulina a partir de diversas fuentes: células embrionarias, células adultas progenitoras, células genéticamente modificadas, xenotrasplantes, etc. ([Hebrok, 2012](#))

El trabajo que estamos presentando tiene su marco en la terapia génica combinada con la terapia celular, la cual, a pesar de que aún tiene un largo camino por recorrer, se presenta como una buena alternativa a las terapias convencionales. De esta forma con distintos protocolos se pretende mejorar al paciente de diabetes tipo 1 ó 2, restaurando niveles óptimos de insulina producida por el organismo, regulando así la concentración de glucosa en sangre.

Con la terapia génica/celular se pretende modificar genéticamente la célula productora de insulina y restablecer su función reguladora de la glucosa. Estas modificaciones, se realizan con la ayuda de vectores, generalmente virus (adenovirus, retrovirus, lentivirus), y pueden llevarse a cabo “*in vivo*” o “*in vitro*”.

Cuando se trata de modificaciones “*in vivo*”, la modificación se realiza directamente introduciendo el vector en las células defectuosas. Esto hoy día presenta serias dificultades técnicas.

Es la terapia génica “*in vitro*” la que en la actualidad se presenta como una buena alternativa y es a la que encaminamos nuestro trabajo. Dentro de la terapia génica “*in vitro*”, tenemos varias alternativas, podemos extraer células enfermas del paciente y sustituir el gen defectuoso por uno funcional, restableciendo de esta manera la capacidad de la célula de funcionar correctamente.

Otra opción es modificar células seleccionadas por su alto potencial terapéutico y que pueden ser cultivadas en un laboratorio, y una vez realizada la modificación pertinente trasplantarla al paciente para su curación.

En el caso de la diabetes la mejor opción es la de conseguir células, que produzcan insulina en respuesta a glucosa y que puedan ser trasplantadas a los pacientes sin necesidad de suministrar inmunosupresores al individuo ([Berna et al., 2001](#)).

A día de hoy, y a la espera de avances decisivos en la terapia con células madres, la restauración de la masa de célula  $\beta$ , se consigue por dos vías, el trasplante total del páncreas, o bien la obtención de islotes de Langerhans procedentes de donantes cadavéricos, y su posterior trasplante en pacientes diabéticos. En ambos casos, el mayor inconveniente a largo plazo es la supervivencia del trasplante, que pasa por el control del sistema inmune del receptor.

Por lo tanto la terapia génica se desarrolla en dos vertientes, por un lado tratando de evitar el rechazo del trasplante, bien intentando modular al sistema inmune para evitar el ataque al islote pancreático, bien modificando las moléculas que intervienen en la respuesta autoinmune o intentando evitar el proceso inflamatorio previo a la destrucción de la célula  $\beta$ . Además de intentar producir células  $\beta$  modificadas para que no produzcan la activación de los linfocitos T, que son los responsables del rechazo inmunitario.

Por otra parte, otro objetivo de la terapia génica en estos pacientes consiste en, incrementar la captación de glucosa de la sangre a los tejidos muscular y adiposo y disminuir la liberación de glucosa desde el hígado.

En nuestro caso, se pretende aprovechar una mutación espontánea de la proteína glucoquinasa en humanos (V91L), que produce la enfermedad anteriormente descrita, para mediante el uso de vectores virales, introducirla en islotes pancreáticos de donantes cadavéricos, y de esta forma aumentar la

proliferación de las células  $\beta$  en estos y la secreción de insulina, de manera que al ser trasplantados al enfermo, puedan restituir los niveles de glucosa y el control de la glucemia sin necesidad de un suministro externo de insulina. La mejora de estos islotes podría significar una disminución en el ratio donante/diabético, que actualmente supone la gran limitación de los trasplantes de islotes, como vía de curación para los enfermos.

## **II. OBJETIVOS**





El objetivo principal de este proyecto es la mejora a nivel genético, de la funcionalidad de los islotes obtenidos de donantes cadavéricos, para un mejor aprovechamiento de estos islotes en el trasplante al paciente diabético.

Para ello, nuestro objetivo principal será la conseguir expresión de la glucoquinasa mutante V91L, en islotes pancreáticos de ratón y humanos, mediante el uso de lentivirus. Entre las mutaciones activadoras de la glucoquinasa la denominada V91L, resulta ser una de las mejor caracterizadas a nivel clínico en los pacientes ([Kassem et al., 2010](#)).

Esto permitiría usar estos islotes de un modo más eficaz en la terapia celular de la diabetes.

Los objetivos secundarios son:

- a. Producir y emplear vectores lentivirales, que nos permitan inducir la expresión de la glucoquinasa silvestre y mutante (V91L), en los islotes pancreáticos de manera estable y sin comprometer la integridad de los mismos.
- b. Analizar los efectos que la expresión de la mutación activadora de glucoquinasa V91L produce en los islotes pancreáticos. Se estudiará el tamaño de los islotes, la secreción de insulina, la apoptosis y la proliferación celular.
- c. Evaluar si la expresión de versiones de la glucoquinasa con mutaciones activadoras, pueden ser una buena herramienta para la terapia génica/celular de los islotes pancreáticos a trasplantar y reducir el número de estos necesarios por paciente.



# **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

Los animales empleados en este estudio han sido ratones machos de la cepa OF1 de entre 8 y 10 semanas de edad, y entre 40 y 45 gr de peso. Fueron suministrados por Charles River y criados en las instalaciones del animalario de CABIMER en condiciones de ciclos de luz-oscuridad, y alimentados con pienso Harlan referencia T2914.4x4.5R irradiado (4x4 5 Kg). Todos los cuidados y procedimiento de experimentación realizado con los animales se hicieron siguiendo las indicaciones para el cuidado y empleo de animales de laboratorio del CABIMER. Además, los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal y el Órgano Habilitado del CABIMER.

## **2. AISLAMIENTO DE ISLOTES DE LANGERHANS POR EL MÉTODO DE LA COLAGENASA.**

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se desinfectaron con abundante etanol y a continuación, tras fijarlos a una base de corcho para su manipulación, se procedió a la apertura del abdomen permitiendo el acceso a la zona del hígado y duodeno. Desde este momento y hasta el final del proceso se humedecerá eventualmente toda la zona de trabajo con solución salina, para evitar que se reseque la cavidad abdominal del animal.

Para facilitar la manipulación posterior se recorta la quilla del esternón y la parte inferior de las costillas a ambos lados, dejando al descubierto el hígado, el cual y con ayuda de una gasa se retrae, permitiendo la exposición de la vesícula biliar y el colédoco.

Localizamos la ampolla de Vater y colocamos una micropinza en el intestino justo bajo ella, para de esta forma traccionarlo y visualizar mejor el colédoco. A continuación y con ayuda de unas pinzas ultrafinas, pasaremos bajo el

colédoco a la altura de la ampolla de Vater, una sutura de seda, que anudaremos fuertemente, con la intención de que una vez que comencemos a introducir la solución de colagenasa, esta no derive al duodeno. Seguidamente colocaremos un segundo hilo de seda unos milímetros más arriba en el extremo proximal del colédoco, por debajo de la unión de los conductos en forma de Y precedentes del hígado, y realizaremos un segundo nudo, pero en esta ocasión lo dejaremos presentado para un posterior ajuste.

Preparamos en este momento la solución con la colagenasa tipo V (C9263, Sigma con una actividad de 424 unidades/mg), resuspendiendo 8 mg de esta en 8 ml de solución de aislamiento Krebs Ringer bicarbonato ajustada a pH 7.4 y mantenida a 4°C. Cargamos la jeringa con esta solución y eliminamos las posibles burbujas de aire que puedan tener jeringa y aguja.

A continuación y justo por encima del segundo nudo haremos una pequeña incisión en el colédoco con unas microtijeras, por donde introduciremos una aguja previamente preparada para este proceso. La aguja (BD Microlance 3 30G  $1/2$ , 0.3x13) se ha doblado 90° y se ha romizado de forma manual tanto su punta como el biselado, manteniendo parte del mismo, pero evitando que al introducirla en el colédoco este resulte rasgado. Una vez que tenemos la aguja dentro del conducto, fijamos el nudo que previamente preparamos, de esta manera conseguimos dos objetivos, por un lado fijamos la posición de la aguja y además evitamos que la solución que inyectaremos a continuación ascienda hacia el hígado en lugar de penetrar en el páncreas.

Retiramos las pinzas que sujetaban el intestino e inyectamos finalmente la solución de aislamiento reservando 2ml que depositaremos en el tubo de 15 ml donde vamos a realizar la digestión del páncreas. En este punto si todo el proceso anterior se ha llevado a cabo correctamente el páncreas debe hincharse por la entrada del líquido, esto a su vez nos facilitará el siguiente paso. Tras retirar los hilos de sutura, extraemos el páncreas de la cavidad abdominal por disección, teniendo especial cuidado para no romper o rasgar el intestino evitando contaminaciones.

Depositamos el páncreas en el tubo de 15ml que tenemos preparado, lo agitamos y lo incubamos en un baño a 37°C durante 10 minutos agitándolo enérgicamente a la mitad del proceso y al final del mismo, para facilitar el disgregado del tejido. Una vez terminada la incubación, paramos la reacción de digestión de la colagenasa añadiendo solución de aislamiento fría hasta llenar el tubo, se deja este en posición vertical dentro de hielo durante 10 minutos, permitiendo que los islotes decanten y pasado este tiempo se descarta el sobrenadante, realizamos esta misma operación una segunda vez, para eliminar la grasa y limpiar en lo posible la muestra de islotes.

Finalmente, se resuspenden los islotes en solución limpia, siempre a 4°C, y se recuperan los islotes, uno a uno mediante succión con una micropipeta, bajo la lupa estereoscópica, para separarlos y limpiarlos de tejido exocrino.

### **Solución de aislamiento Krebs Ringer bicarbonato**

- Solución A aislamiento (10x)
  - 115 mM NaCl
  - 5 mM KCl
  - 10 mM NaHCO<sub>3</sub>
  - 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 25 mM HEPES
  
- Solución CaCl<sub>2</sub> (10x)
  - 2.56 mM CaCl<sub>2</sub>

Para obtener la solución de aislamiento Krebs Ringer bicarbonato, mezclar ambas soluciones a un concentración 1x y añadir: 5.6 mM de Glucosa y 0.5% BSA.

Ajustar el pH de la solución a 7,4 con NaOH 1M.



### **3. ISLOTES HUMANOS**

Los islotes humanos fueron adquiridos del Hospital de Bellvitge (Dr. Eduard Montanya), del European Consortium for Islet Transplantation (ECIT) y comprados a la empresa Tebu-Bio (Barcelona, España). Los islotes procedían de 16 donantes cadavéricos, de ambos sexos, con una edad media de  $55 \pm 9$  y con un índice de masa corporal de  $26,2 \pm 3,1$ . Los donantes fallecieron de accidentes cardiovasculares y cerebrovasculares y de traumatismos craneoencefálicos. El tiempo que pasó desde su aislamiento hasta la llegada al laboratorio fue de 2-6 días.

### **4. LENTIVIRUS: CONSTRUCCIONES UTILIZADAS.**

Para la producción de lentivirus son necesarios tres plásmidos, dos de ellos comunes y el tercero que difiere según la proteína que se desee expresar, las construcciones utilizadas son las siguientes:

Plásmidos comunes:

- pCMV-dR8.91.
- pCMV-VSV-G.

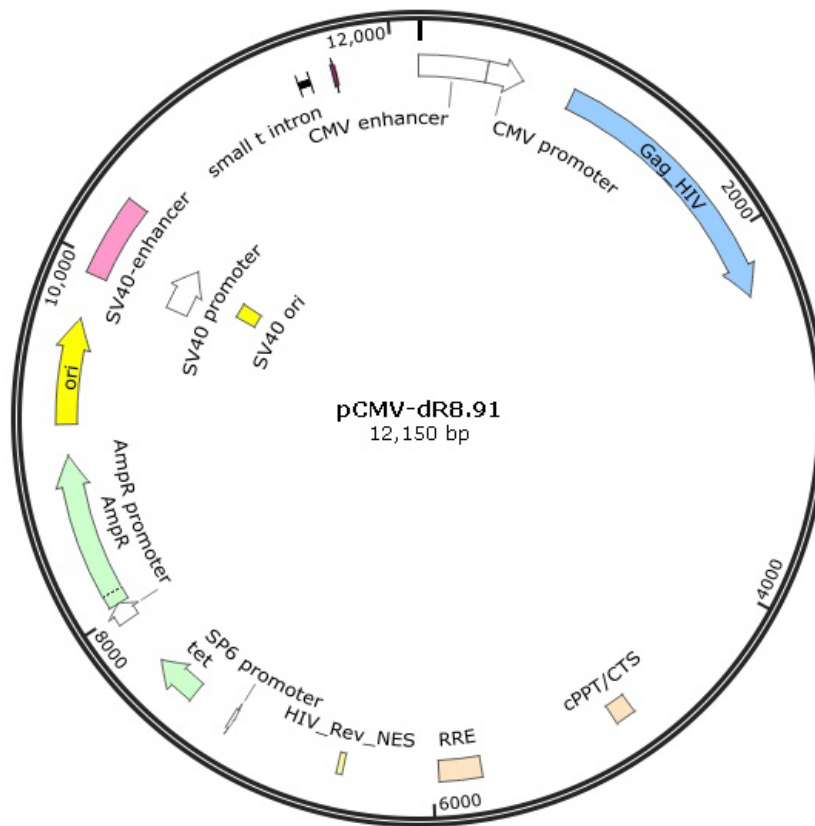
Plásmido control:

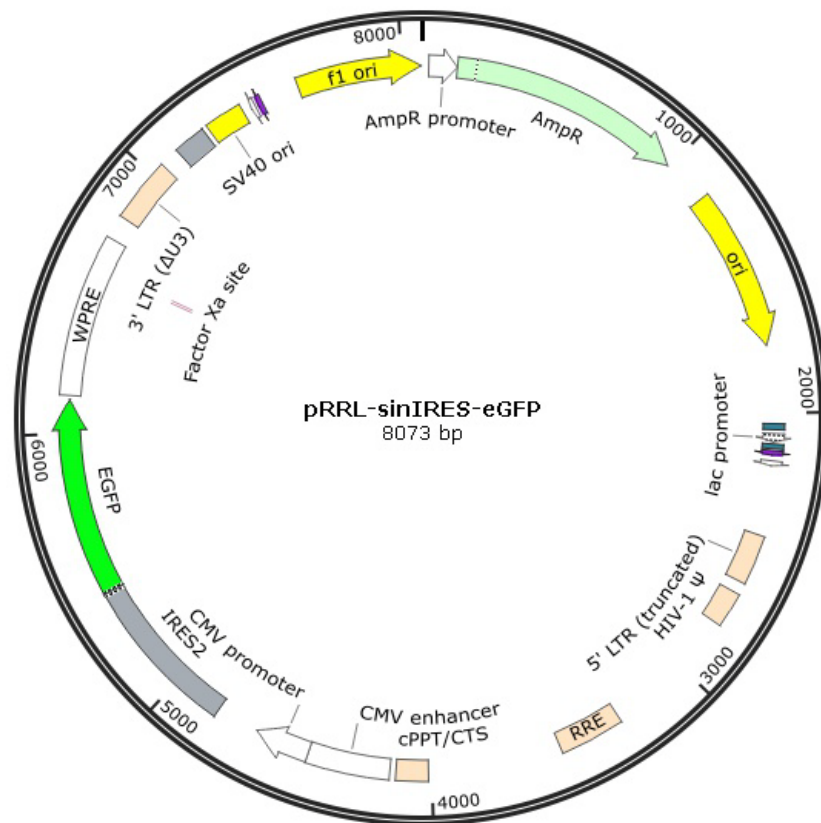
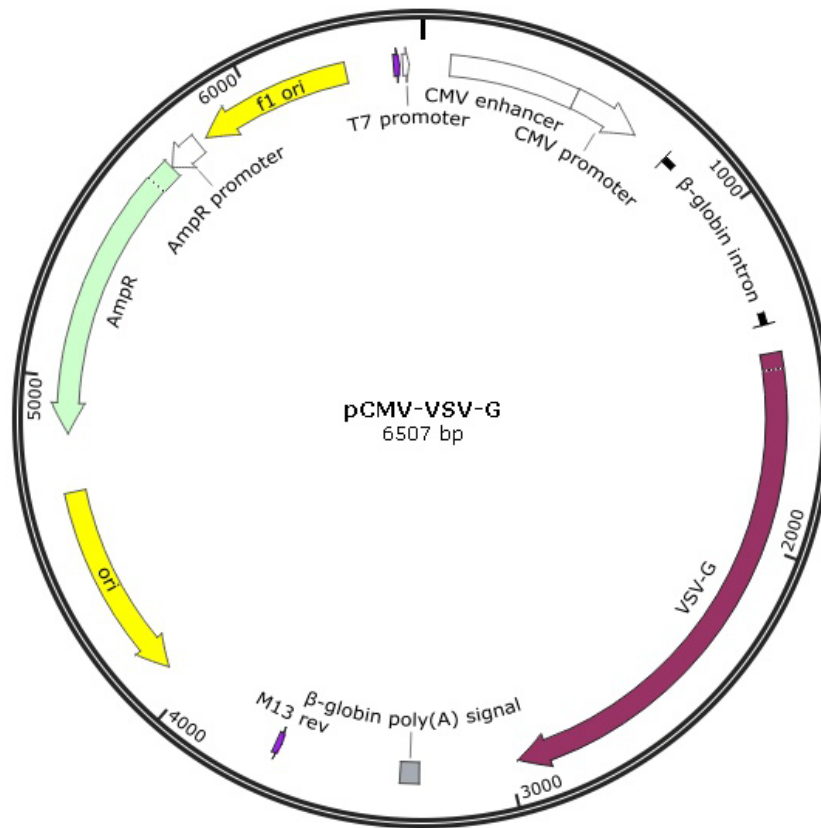
- pRRL-sinIRES-eGFP.

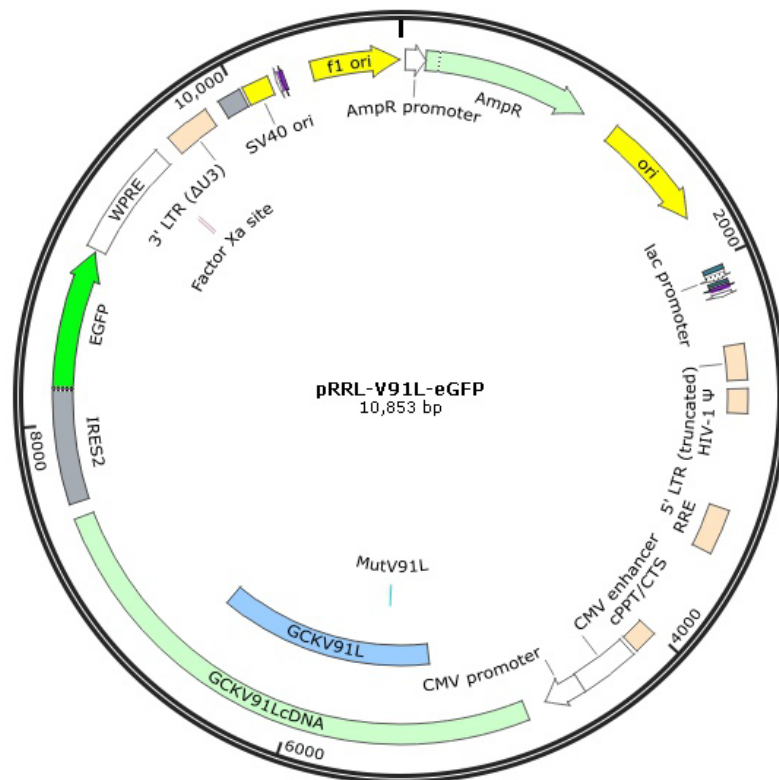
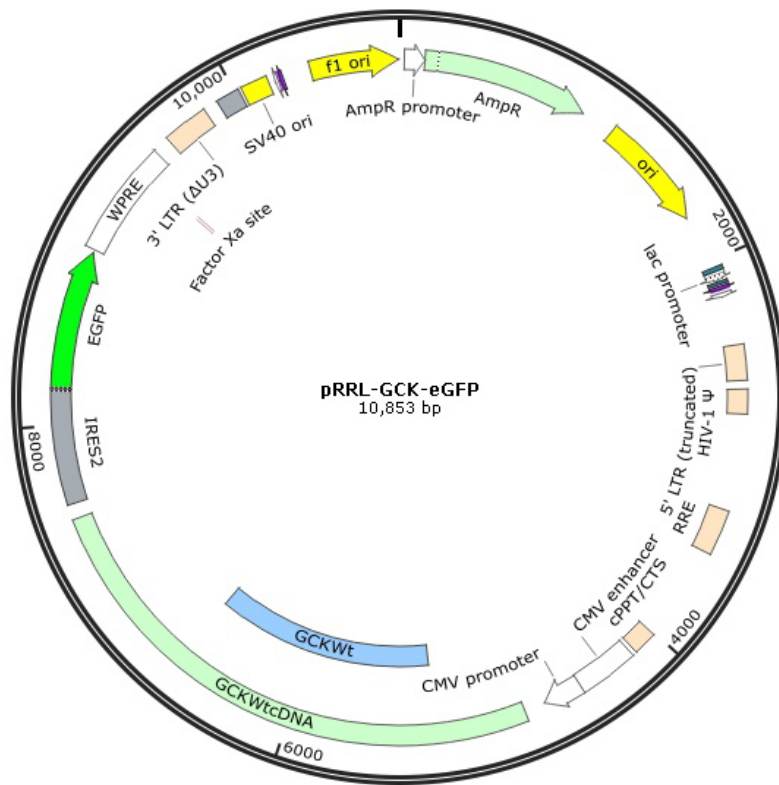
Plásmidos de expresión de GCK y V91L.

- pRRL-GCK-eGFP.
- pRRL-V91L-eGFP.

Todos ellos se amplificaron mediante transformación de bacterias quimiocompetentes DH5 $\alpha$  y se purificaron con el kit de midiprep de Qiagen (Plasmid Plus Midi kit Ref. 12943) según el protocolo indicado por el fabricante.







## 5. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS DH5 $\alpha$ CON LAS DISTINTAS CONSTRUCCIONES.

Para la amplificación de los distintos vectores, se escogieron las bacterias quimiocompetentes DH5 $\alpha$ . Se compraron a la unidad de organismos modelo de CABIMER.

Las bacterias DH5 $\alpha$  se almacenan en alícuotas de 200 $\mu$ l a -80°C. Para su uso, se descongelan dejándolas unos minutos en hielo, a continuación, se mezclan 100 $\mu$ l de bacterias con 500ng de plásmido y se incuba durante cinco minutos en hielo. Para introducir el vector dentro de la bacteria, se somete la mezcla de ambos a un choque térmico de 42°C durante 90 segundos. Posteriormente se vuelven a incubar en hielo durante 10 minutos. Para finalizar se añade 900 $\mu$ l de medio de cultivo de bacterias (LB), quedando un volumen final de 1ml del cual se siembran 100 $\mu$ l en una placa de petri con LB-Agar con 0.1mg/ml del antibiótico de selección, en este caso ampicilina (todos los vectores usados son ampicilina-resistentes), dicha selección con antibiótico se mantendrá durante todo el proceso de cultivo de las bacterias ya sea en medio sólido o líquido.

Incubar las placas en la estufa a 37°C durante la noche y al día siguiente, seleccionar una de las colonias crecidas para su posterior amplificación en cultivo líquido y purificación mediante Midiprep.

Medio de cultivo de Bacterias (LB):

- Triptona 10 gr/l.
- Extracto de Levadura 5 gr/l.
- NaCl 10 gr/l
- En el caso del medio sólido para placas añadir 15 gr/l agar.

## 6. SECUENCIACIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN. DISEÑO DE LOS PRIMERS O CEBADORES.

Los vectores de expresión se mandaron a secuenciar por la empresa STABVIDA, para lo cual fue necesario el diseño de dos parejas de primers o cebadores que nos permitieran la secuenciación de la totalidad del inserto.

Para el diseño de estos primers se tuvieron en cuenta la posición de los mismos dentro del vector, la distancia entre los miembros de cada par, el contenido en CG de cada uno, así como las posibles estructuras secundarias y dímeros que pudieran formarse.

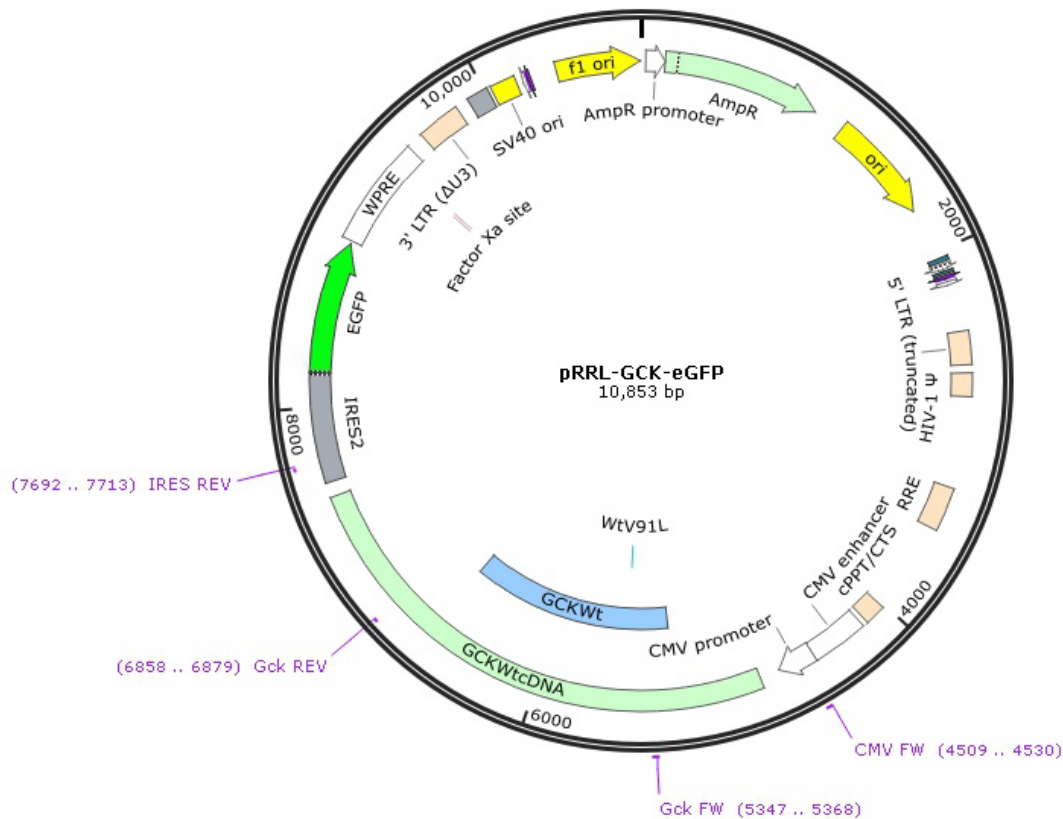
Dada la longitud del inserto que se quería secuenciar, fueron necesarias dos parejas de cebadores, una más exterior (CMV FW + IRES REV) y una segunda situada en la zona interna del inserto para completar la secuencia (Gck FW + Gck REV).

Los primers diseñados fueron los siguientes y con ellos se logró secuenciar la totalidad del inserto que deseábamos comprobar:

- CMV FW: 5'-GGGGATTTC AAGTCTCCACCC-3'
- IRES REV: 5'-CCCTCACATTGCCAAAAGACGG-3'
  
- Gck FW: 5'-GGATGCAGAAGGAGATGGACCG-3'
- Gck REV: 5'-GGGCTTCCAGAGTCTCTGTTCC-3'

Posición de las dos parejas de primers en los vectores pRRL-GCK-eGFP y pRRL-V91L-eGFP. La figura muestra el vector pRRL-GCK-eGFP, la posición de los cebadores es la misma en los dos vectores, ya que ambas

construcciones solo varían en la zona de la mutación, lo que no afecta al diseño de los oligos ni a la secuenciación.



## 7. TRANSFECCIÓN SIMPLE DE LOS VECTORES pRRL-sinIRES-eGFP, pRRL-GCK-eGFP y pRRL-V91L-eGFP.

Se cultivaron células A293T, en medio DMEM (Gibco ref. 41966) suplementado con 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml Penicilina, 100µg/ml Streptomycin y FBS 10% (Lonza ref.14-801F), en placas multipocillo de 6 pocillos. Se sembraron 400.000 células por pocillo, en aquellos pocillos destinados a la inmunofluorescencia las células se sembraron sobre lamelas estériles. Tras 24 horas en cultivo se transfectaron con los distintos vectores.

Para esta transfección se utilizó como vehículo FuGENE (FuGENE HD Transfection Reagent, Roche. Ref. 10928200) según el protocolo recomendado por el fabricante. Se transfectó con ratio ADN:Fugene de 1:3. Se mezcló para cada pocillo, 1µg de plásmido con 125 µl de OPTIMEM (Opti-MEM I Reduced-Serum Medium. Gibco. Ref. 11058021) y añadimos 3µl de FuGENE. Después, mezclamos bien pipeteando 15 veces y lo incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se cambió el medio a las células por medio fresco y añadimos gota a gota la mezcla de ADN con FuGENE al cultivo. Tras 48 horas recogemos las células para su procesamiento, bien Western-Blot o inmunofluorescencia.

## **8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS A293T.**

La expresión de las proteínas se analizó por Western-Blot, en geles SDS-PAGE desnaturalizantes, 10% acrilamida.

En el caso de las células transfectadas, se lavaron las células con PBS y tras despegarlas con tripsina, se recogieron, y lavaron con PBS para eliminar los restos de medio y tripsina. Se congelaron los pellets a -80°C, se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 100µl de tampón RIPA (con inhibidores de proteasas). Se homogeneizaron bien las muestras con repetidos pipeteos, manteniéndolas en hielo durante 20 minutos para permitir la extracción de las proteínas. Se centrifugaron las distintas muestras a 16.000 g a 4°C durante 15 minutos y se recogió en un tubo limpio el sobrenadante, que fue cuantificado mediante NanoDrop (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000).



## **9. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN ISLOTES DE RATÓN Y HUMANOS.**

Con los islotes, tanto de ratón como humanos, el procedimiento fue el siguiente.

Se lavaron igualmente los islotes puestos en cultivo con los virus y se recogieron en un tubo eppendorf. Se resuspendieron en 100µl de tampón RIPA, con inhibidores de proteasas. Las muestras se sometieron a 4 pulsos de 20 segundos de sonicación (con intervalos de 20 segundos entre pulsos), con una potencia de sonicado del 25%, y manteniendo las muestras en frío durante todo el proceso. Una vez sonicadas, se centrifugaron las muestras a 16.000 g a 4°C durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante, que igualmente se cuantificó en NanoDrop.

## **10. COMPROBACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GK Y V91L. WESTERN BLOT.**

Una vez cuantificadas las muestras, se cargó por pocillo 80 µg de proteína total, por muestra, resuspendida en tampón de carga (Laemmli) y calentadas a 95°C durante 5 minutos. Los geles se resolvieron corriendo las muestras a 110 V durante 1h 30 min en tampón de corrida.

Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman Protam nitrocellulose transfer membrane, 0.2 µm ref. 10.401396), en semi-seco (Biorad Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell). Tanto la membrana como el gel se hidrataron previamente con el tampón de transferencia que se usó para la misma. La transferencia se realizó a 16V durante 45 minutos y una vez terminada se tiñeron los filtros con solución rojo Ponceau para confirmar la fijación de las proteínas a la membrana.

Tras retirar el resto de color de Ponceau, se bloquearon las membranas con PBS más 0.1% Tween y 3% de BSA (solución de bloqueo), durante una hora.

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo a 4°C, durante toda la noche y en agitación suave. Tras la incubación se realizaron cuatro lavados de 10 minutos cada uno con solución de lavado (PBS más 0.1% Tween) y agitación suave. Tras los lavados, se incubaron los filtros con los anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente, en solución de bloqueo y en agitación suave. Se volvieron a repetir los lavados y se reveló con ECL (Amersham ECL Western Blotting detection Kit Reagents ref. RPN2209).

Para comprobar el control de carga, una vez comprobada la expresión de Glucoquinasa, las membranas se incubaron durante 30 minutos con solución de deshibridación a 60°C, para retirar el anticuerpo pegado a la Glucoquinasa y poder hibridar la membrana con el anticuerpo para el control de carga  $\beta$ -actina. Proceder con el protocolo anterior comenzando por el bloqueo de la membrana, durante 1 hora en solución de bloqueo.

### **Soluciones y tampones.**

- RIPA:
  - 1% Tritón.
  - 1% Deoxicolato de Na.
  - 0.1% SDS.
  - 0.01 M NaCl.
  - 0.01 M NaPO<sub>4</sub>.
  
- Inhibidores de proteasas:
  - 0.2 mM PMSF.
  - 10  $\mu$ g/ml Leupeptina.
  - 50  $\mu$ g/ml Pepstatina A.
  - 50  $\mu$ g/ml Aprotinina.

- Laemmli 5x (tampón de carga):
  - 300 mM Tris pH 6.8.
  - 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.
  - 7.5% SDS.
  - 10 mM EDTA.
  - 0.25% Azul de bromofenol.
  - 30% Sacarosa.
- Solución Rojo Ponceau:
  - 0.1% Ponceau S.
  - 3% Tricloroacético.
  - 3% Ácido sulfosalicílico.
- Tampón de corrida Western 10x (para 1 litro)
  - 30.2 gr. Tris base.
  - 145.6 gr. Glicina.
  - Diluir a 1x antes del uso y añadir 0.1% SDS.
- Tampón de transferencia semi-seco 10x (para 1 litro)
  - 52.2 gr. Tris base.
  - 29.3 gr. Glicina.
  - Diluir a 1x antes de usar y añadir 0.037% SDS y 20% Metanol.
- Solución de Deshibridación.
  - 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.
  - 2% SDS.
  - 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7.

#### Anticuerpos.

- Primario anti-GK: Santa Cruz, GK(H-88):sc-7908. Dilución 1:500
- Secundario para GK: Amersham ECL anti-rabbit IgG NA934. Dilución 1:5000.

- Primario anti- $\beta$ -actina: Sigma Monoclonal anti- $\beta$ -actin clone AC-15 A1978. Dilución 1:2000.
- Secundario para  $\beta$ -actina: Amersham ECL anti-mouse IgG NA931. Dilución 1:5000.

## **11. COMPROBACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GK Y V91L. INMUNOFLUORESCENCIA.**

Para verificar la correcta expresión, tanto de la proteína glucoquinasa, como de su forma mutante V91L, en las células y como paso previo a la infección de los islotes con los virus, se analizó mediante inmunofluorescencia con anticuerpos frente a glucoquinasa, la expresión de la enzima resultante de la infección viral en células A293T.

Como se ha descrito previamente, se sembraron las células en lamelas y se transfectaron con las distintas construcciones. Pasadas 48 horas se realizó el siguiente protocolo de inmunofluorescencia:

- Retirar el medio.
- Un lavado de cinco minutos con PBS.
- Fijar las células durante diez minutos con paraformaldehído (PFA) al 4%.
- Un lavado de cinco minutos con PBS.
- Permeabilización con tritón 0.1% durante diez minutos.
- Un lavado de cinco minutos con PBS.
- Bloquear durante noventa minutos con solución de bloqueo (PBS+Tween 0.1%+BSA 3%).
- Incubar con el anticuerpo primario en solución de bloqueo toda la noche a 4°C.
- Realizar tres lavados de cinco minutos con solución de bloqueo.
- Añadir el anticuerpo secundario en solución de bloqueo y mantener en oscuridad durante su incubación de una hora a temperatura ambiente.

- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Añadir DAPI a una concentración final de 300nM en PBS e incubar cinco minutos.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Proceder al montaje sobre portas con “Vectashield mounting medium” (Vector Laboratories Ref: H-1000).

#### Anticuerpos.

- Anti-GK<sub>2</sub>: Santa Cruz, GK (H-88) (ref.sc-7908). Dilución 1:300.
- Alexa Fluor 568 (Lifetechnologies ref.A11011). Dilución 1:500.

## **12. OBTENCIÓN DE LENTIVIRUS.**

Tanto la obtención de los lentivirus, como los cultivos celulares necesarios para las titulaciones de los mismos y cualquier tratamiento a células o islotes en los que hayan intervenido lentivirus se realizaron en el área de seguridad biológica dentro de las instalaciones de cultivos de CABIMER, con categoría de seguridad P2. Así mismo, tanto los cultivos celulares como de islotes se realizaron a temperatura constante de 37°C en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> y con humedad saturada.

En la producción de los lentivirus, se utilizó la línea celular A293T. Esta línea se caracteriza por ser células adherentes, epiteliales humanas procedentes de hígado y con una alta capacidad de ser transfectadas.

Se cultivan en medio DMEM (Gibco ref. 41966) suplementado con 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml Penicilina, 100µg/ml Streptomycin y FBS 10% (Lonza ref.14-801F).

Para la obtención de los distintos lentivirus se cultivaron las células A293T en frascos de cultivo de T75 (Rodelab ref.90076), a una confluencia del 80-90%, y se transfectaron con los tres plásmidos necesarios para la realización del virus por parte de la célula, usando como agente de transfección FuGENE.

Para ello se incubaron los vectores necesarios para la formación del virus en las siguientes cantidades, con 200µl de medio Optimem y 27µl de FuGENE mezclando bien mediante pipeteo:

- pCMV-dR8.91: 1.5 µg.
- pCMV-VSV-G: 1.5 µg.
- Vector de expresión: 2.3 µg.

Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Durante este periodo de incubación, retiramos el medio, lavamos el cultivo celular con 10ml de PBS a 37°C, retiramos y despegamos las células con 1ml tripsina. Una vez en suspensión neutralizamos la tripsina con 10ml de medio de cultivo a 37°C y antes de que las células vuelvan a pegarse al frasco añadimos gota a gota la mezcla de transfección previamente incubada.

Dejamos las células transfectadas en cultivo y recogeremos los sobrenadantes a las 24h y 48h post-transfección. Filtramos el sobrenadante para eliminar posibles restos celulares con un filtro de 45µm, le añadimos 5% de DMSO para la crioprotección de los virus y alicuotamos en tubos eppendorf de 1.5 ml para su almacenamiento a -80°C.

En estos sobrenadantes han sido liberados los virus y se usaran añadiéndolos al medio de cultivo de las células o islotes que se desee infectar.

Se produjeron tres virus diferentes: eGFP, GCK-eGFP y V91L-eGFP.

### **13. CUANTIFICACIÓN DE LOS LENTIVIRUS.**

La cuantificación de los virus se hizo mediante citometría de flujo usando como marcador la molécula de GFP expresada en las células infectadas.

Se sembraron en placas de 24 pocillos células A293T (200.000 células/pocillo). Una vez pegadas se infectaron con distintas cantidades de los sobrenadantes que contienen el virus.

Tras 48h post-infección se recogen las células y se resuspenden en PBS. Para asegurarnos de que están bien disgregadas se pasan por un filtro de nylon de 70µm (BD Falcon ref. 352350) y se analizan por citometría de flujo. Se establecieron los siguientes parámetros para la detección de las células infectadas (aquellas que expresan GFP) y su cuantificación.

- FSC: E-1; Amp Gain: 5.08; Lin.
- SSC: 211; Amp Gain: 1.00; Log.
- FL1: 450; Amp Gain 1.00; Log.

Estos valores se establecieron en un citómetro de flujo BD FACS Calibur.

Establecemos la auto-fluorescencia propia de las células usando como control negativo la misma línea celular (A293T) sin infectar.

Una vez conocido el porcentaje de células que expresan GFP, es decir que han sido infectadas, el número total de células que se infectaron y el volumen de medio con virus que se usó para cada infección, es posible calcular la cantidad de virus que se ha generado.

Esta cuantificación se realizó para cada producción viral.

## 14. INFECCIÓN DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS

La infección de los islotes tanto de ratón como de humanos se realizó añadiendo a la placa donde se cultivaban los islotes, en su medio de cultivo correspondiente, 500 UI/islote. Esto se realizó dejando caer el medio con virus gota a gota, consiguiendo así una distribución uniforme por todo el pocillo y por lo tanto una infección homogénea. Posteriormente se mantuvieron los islotes en cultivo en presencia del virus durante un periodo de 6 y 15 días tras el cual se procesaron de distintas formas según los objetivos.

- Medio de cultivo de islotes de ratón:
  - RPMI 1640.
  - 10% FBS (Lonza ref.14-801F).
  - 100 U/ml Penicilina.
  - 100 µg/ml Streptomycin.
  - 2 mM Glutamina.
  - 5 mM Glucosa.
  
- Medio de cultivo de islotes humanos:
  - CMRL 1066.
  - 10% FBS (Lonza ref.14-801F).
  - 100 U/ml Penicilina.
  - 100 µg/ml Streptomycin.
  - 2 mM Glutamina.
  - 0.1% Gentamicina.
  - 5 mM Glucosa.



## **15. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN ISLOTES INFECTADOS.**

Estos datos se obtuvieron mediante técnicas de inmunofluorescencias, detectando mediante anticuerpos específicos ambos fenómenos.

Para realizar las inmunofluorescencias, los islotes, una vez aislados, se sembraron en lamelas, previamente gelatinizadas durante 30 minutos con 0.2% de gelatina a 37°C, se colocaron para cada ensayo, 200 islotes por condición repartidos en 4 pocillos con lamelas (50 islotes por pocillo) y se cultivaron durante 15 días con los distintos vectores virales.

Todos los procesos de lavados y retirada de las distintas soluciones se realizaron bajo una lupa estereoscópica con fuente de luz externa, para evitar la pérdida de islotes en los sucesivos pasos.

### ***15.1 Cuantificación de la proliferación en islotes infectados. Detección de incorporación de BrdU en inmunofluorescencia.***

Para la cuantificación del número de células del islote que habían incorporado BrdU, en primer lugar se cultivaron los islotes, durante las últimas 48 horas antes de ser procesados para la inmunofluorescencia, con 5-Bromo-2´deoxyUridina (Sigma, ref. B-5002) a una concentración final de 10 µM.

Una vez pasado este tiempo, se continúa el siguiente protocolo:

- Retirar el medio.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Fijar las células durante veinte minutos con paraformaldehído (PFA) al 4%.

- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Incubar con HCl 2N durante 30 minutos a temperatura ambiente, para desnaturalizar el ADN.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Dos lavados de cinco minutos con Borato Sódico 0.1 M pH 8.5, para detener la reacción de desnaturalización.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Permeabilización con tritón 0.2% durante cuarenta minutos.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Bloquear durante noventa minutos con solución de bloqueo (PBS+BSA 3%).
- Incubar con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo toda la noche a 4°C.
- Realizar tres lavados de cinco minutos con solución de bloqueo.
- Añadir los anticuerpos secundarios en solución de bloqueo y mantener en oscuridad durante su incubación de una hora a temperatura ambiente.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Añadir DAPI a una concentración final de 300nM en PBS e incubar cinco minutos.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Proceder al montaje sobre portas con “Vectashield mounting medium” (Vector Laboratories Ref: H-1000).

#### Anticuerpos:

- Anti-Insulina (Sigma ref. I2018): dilución 1:400.
- Anti- BrdU conjugado Alexa Fluor 647 (Invitrogen ref. B35133): dilución 1:200.
- Anti-Mouse Cy3 (Invitrogen ref. A10521): dilución 1:500.

### **15.2 Cuantificación de la proliferación de en islotes infectados. Inmunofluorescencia frente a Ki67.**

Para la cuantificación de la proliferación dentro de los islotes infectados, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia frente a Ki67, detectando además insulina, para comprobar cuantas de las células en proliferación eran células  $\beta$ .

Protocolo de inmunofluorescencia en islotes de Langerhans:

- Retirar el medio.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Fijar las células durante veinte minutos con paraformaldehído (PFA) al 4%.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Permeabilización con tritón 0.2% durante cuarenta minutos.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Bloquear durante noventa minutos con solución de bloqueo (PBS+BSA 3%).
- Incubar con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo toda la noche a 4°C.
- Realizar tres lavados de cinco minutos con solución de bloqueo.
- Añadir los anticuerpos secundarios en solución de bloqueo y mantener en oscuridad durante su incubación de una hora a temperatura ambiente.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Añadir DAPI a una concentración final de 300nM en PBS e incubar cinco minutos.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Proceder al montaje sobre portas con "Vectashield mounting medium" (Vector Laboratories Ref: H-1000).

Anticuerpos:

- Anti-Insulina (Sigma ref. I2018): dilución 1:400.
- Anti- Ki67 (Thermo Scientific ref. RM-9106-S0): dilución 1:200.
- Anti-Mouse Cy3 (Invitrogen ref. A10521): dilución 1:500.
- Anti-Rabbit Alexa Fluor 647 (Lifetechnologies ref. A21245): dilución 1:500.

**15.3 Cuantificación de la apoptosis en islotes infectados.**

La apoptosis se detectó con el kit “Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® 647 Imaging Assay” (life technologies ref. C10247), siguiendo el protocolo del fabricante.

Tras el protocolo de detección de apoptosis, se continuó con la detección de las células  $\beta$ , incubando las muestras con anticuerpos frente a insulina con el siguiente procedimiento:

- Bloquear durante noventa minutos con solución de bloqueo (PBS+BSA 3%).
- Incubar con el anticuerpo anti-Insulina en solución de bloqueo toda la noche a 4°C.
- Realizar tres lavados de cinco minutos con solución de bloqueo.
- Añadir el anticuerpo secundario en solución de bloqueo y mantener en oscuridad durante su incubación de una hora a temperatura ambiente.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Añadir DAPI a una concentración final de 300nM en PBS e incubar cinco minutos.
- Tres lavados de cinco minutos con PBS.
- Proceder al montaje sobre portas con “Vectashield mounting medium” (Vector Laboratories Ref: H-1000).

Anticuerpos:

- Anti-Insulina (Sigma ref. I2018): dilución 1:400.
- Anti-Mouse Cy3 (Invitrogen ref. A10521): dilución 1:500.

## **16. MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA DE ISLOTES DE LANGERHANS.**

Se hicieron experimentos de secreción estática de insulina para ver la respuesta de los islotes infectados al suministro de glucosa. Dichos experimentos se llevaron a cabo tanto con islotes de ratón, como humanos.

Para ello se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos, a razón de cinco islotes por pocillo, procurando repartirlos de forma homogénea en tamaño y tras infectarse con los distintos vectores virales, se incubaron durante un periodo de 6 días.

Tras el cual y una vez lavados los islotes con PBS, se incubaron con medio de perfusión durante una hora con el objeto de normalizar las secreciones de todos los pocillos.

Posteriormente se incubaron con las distintas concentraciones de glucosa (en medio de perfusión) durante otra hora, tras la cual se recoge el medio y se mide la cantidad de insulina secretada al mismo mediante la técnica de “Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas” (ELISA), siguiendo el protocolo del kit. (Mercodia Mouse Insulin ELISA, ref. 10-1149-01 y Mercodia Human Insulin ELISA ref. 10-1113-01)

- Medio de Perifusión:
  - 120 mM NaCl.
  - 25 mM NaHCO<sub>3</sub>.
  - 5 mM KCl.
  - 1 mM MgCl<sub>2</sub>.
  - 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>.
  - Ajustar pH a 7.4 y añadir 1% BSA.
  
- Concentraciones de glucosa usadas en la secreción estática de insulina:
  - 1.1 mM glucosa.
  - 2.8 mM glucosa.
  - 5.6 mM glucosa.
  - 8.3 mM glucosa.



## **IV. RESULTADOS**





Como hemos comentado con anterioridad en la introducción, son varias las mutaciones activadoras de la proteína glucoquinasa descritas en humanos. En este trabajo nos centraremos en la mutación V91L, llamada de este modo por el cambio de un aminoácido valina a una leucina en la posición 91, una de las mutaciones activadoras con efectos más graves y cuyo fenotipo principal en humanos ya hemos descrito.

El objetivo del presente trabajo es tratar de inducir la expresión de esta variante de la proteína, en islotes de Langerhans de ratón y humanos, introduciendo el gen de la proteína mutada con un sistema de transducción lentiviral, y analizar el efecto que produce dicha expresión.

Los vectores virales, en general, son una herramienta ampliamente utilizada para la expresión de genes en células, tejidos y organismos que por sus características, o bien no son susceptibles de transfectarse por otros métodos, o la eficiencia de transfección es notablemente superior usando estos vectores.

Cada vez son más los tipos de vectores usados y dentro de cada tipo hay distintas variantes con características que se van adecuando a los requerimientos del investigador.

Principalmente son tres los tipos de vectores virales más usados para la expresión de genes en distintos tipos celulares y organismos modelo: adenovirus, retrovirus y un derivado de estos últimos que son los lentivirus.

En la siguiente tabla se resumen las principales características de estos vectores virales.

VECTOR VIRAL	Genoma del vector	Tamaño del Inserto	Título UI/ml	Inmunogenicidad	Capacidad Infección	Integración en el genoma
Adenovirus	ADN	2-28kb	$10^{10}$ - $10^{12}$	Muy alta	Células en división y quiescentes	No
Retrovirus	ARN	1-7kb	$10^6$ - $10^9$	Baja	Células en división	Si
Lentivirus	ARN	7-18kb	$10^6$ - $10^9$	Baja	Células quiescentes y en división	Si

*Tabla 3: Características generales de los tres tipos de vectores virales más usados para la sobreexpresión de proteínas en células y tejidos.*

Se escogieron los vectores lentivirales por las ventajas que presentan respecto a los adenovirus y retrovirus para los ensayos que se querían realizar, así como por la disponibilidad de los plásmidos necesarios para su formación y por su baja inmunogenicidad de cara a un futuro trabajo en animales vivos.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en este trabajo, partiendo de los plásmidos cedidos por el Dr. Antonio L. Cuesta Muñoz, pasando por la producción de los vectores lentivirales, hasta el análisis de cómo la expresión de proteína GK y su mutante V91L afectan a la función y fisiología del islote de Langerhans.

Dividiremos los resultados en cuatro grupos. En los dos primeros bloques se exponen los resultados correspondientes a la comprobación, formación y optimización de los lentivirus, que son la herramienta que utilizaremos para llevar a cabo los experimentos que se engloban en los dos apartados posteriores.

Previo a estos dos últimos grupos de resultados, incluimos un resumen de los antecedentes clínicos analizamos en pacientes con la mutación V91L y que son los que guiaron la línea de experimentación del presente trabajo.

1. Análisis de la secuencia y expresión de los vectores lentivirales:
  - 1.1. Análisis de las secuencias de los vectores.
  - 1.2. Expresión de la proteína GK y V91L en transfección simple.
  
2. Obtención de los lentivirus:
  - 1.1. Formación de los lentivirus.
  - 1.2. Cuantificación de los lentivirus.
  - 1.3. Expresión de las proteínas GK y V91L en células infectadas.
  
3. Infección y análisis de islotes de Langerhans de ratón con lentivirus:
  - 3.1. Tamaño de los islotes.
  - 3.2. Secreción estática de insulina.
  - 3.3. Apoptosis.
  - 3.4. Proliferación.
  
4. Infección y análisis de islotes de Langerhans humanos con lentivirus:
  - 4.1. Tamaño de los islotes.
  - 4.2. Secreción estática de insulina.
  - 4.3. Apoptosis.
  - 4.4. Proliferación.

# 1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS Y EXPRESIÓN DE LOS VECTORES LENTIVIRALES.

## 1.1. *Análisis de las secuencias de los vectores.*

En primer lugar y como paso previo a la construcción del virus, debemos asegurarnos de que las secuencias clonadas dentro de los vectores de expresión lentivirales, no contienen ninguna mutación, a excepción de la de interés para este estudio.

Para ello se diseñaron dos parejas de oligos, de manera que nos permitieran secuenciar en su totalidad el gen introducido en el vector viral. En primer lugar, obtuvimos la secuencia clonada de la proteína glucoquinasa completa, de la base de datos de PubMed (NCBI Reference Sequence: NC\_000007.14). Con ayuda del programa SnapGeneViewer, recreamos la clonación efectuada de la proteína en el vector viral pRRL-IRES-eGFP.

Trabajando sobre estos vectores virtuales, se localizaron cuatro regiones cuya composición de bases nitrogenadas, longitud y distancia entre ellas fueran compatibles entre sí y apropiadas para la secuenciación completa de la secuencia de la proteína. Además se tuvo en cuenta que sirvieran tanto para secuenciar la proteína silvestre, como la mutante, para ello era fundamental que ninguno de los cebadores se encontrara cercano a la región de la mutación ni demasiado alejado de forma que la lectura de la secuencia en dicho sector fuera óptima y no dejara lugar a dudas (fig. 18).

Todos los oligos candidatos una vez diseñados se analizaron con el programa OligoAnalyzer 3.1. Con esta aplicación se descartan aquellos cebadores que generan estructuras secundarias estables, dímeros consigo mismos, heterodímeros, así como otro tipo de estructuras poco recomendables para su correcto funcionamiento en la secuenciación.

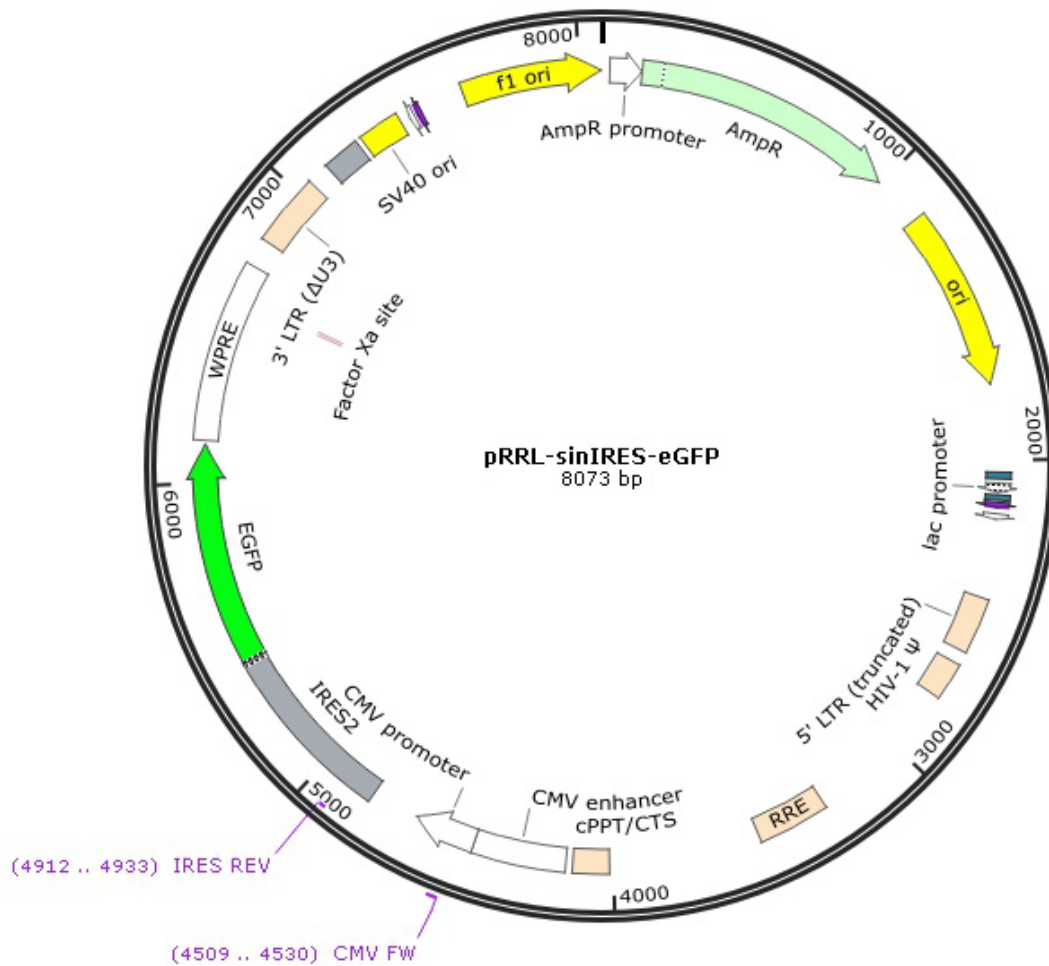
Una vez tenidos en cuenta todos estos parámetros se escogieron estos cuatro oligos, con las siguientes características y posiciones dentro de los vectores a secuenciar. (Tabla 4)

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Nº Bases</b>	<b>% GC</b>	<b>Tm</b>
CMV FW	GGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCC	22	59	60°C
IRES REV	CCCTCACATTGCCAAAAGACGG	22	55	60°C
Gck FW	GGATGCAGAAGGAGATGGACCG	22	59	60°C
Gck REV	GGGCTTCCAGAGTCTCTGTTCC	22	59	60°C

*Tabla 4: Oligos utilizados para la secuenciación de los plásmidos de expresión de glucoquinasa silvestre, glucoquinasa mutante V91L y control. Resumen de las características principales que se tuvieron en cuenta para su diseño.*

En la siguiente figura (fig. 18) presentamos la posición de los cuatro oligos dentro de cada uno de los tres plásmidos secuenciados. En el caso del plásmido control, se presentan solo dos de ellos (IRES REV y CMV FW), aquellos correspondientes a la zona del plásmido externa al sitio de clonaje de ambas versiones de la glucoquinasa, ya que los otros dos oligos (Gck FW y Gck REV) se encuentran dentro de la secuencia que codifica para la proteína y el plásmido control carece de ella.

Escogidos los cebadores, se mandaron junto con los tres plásmidos a secuenciar a la compañía StabVida España (Madrid), y se comprobó que las secuencias eran correctas.



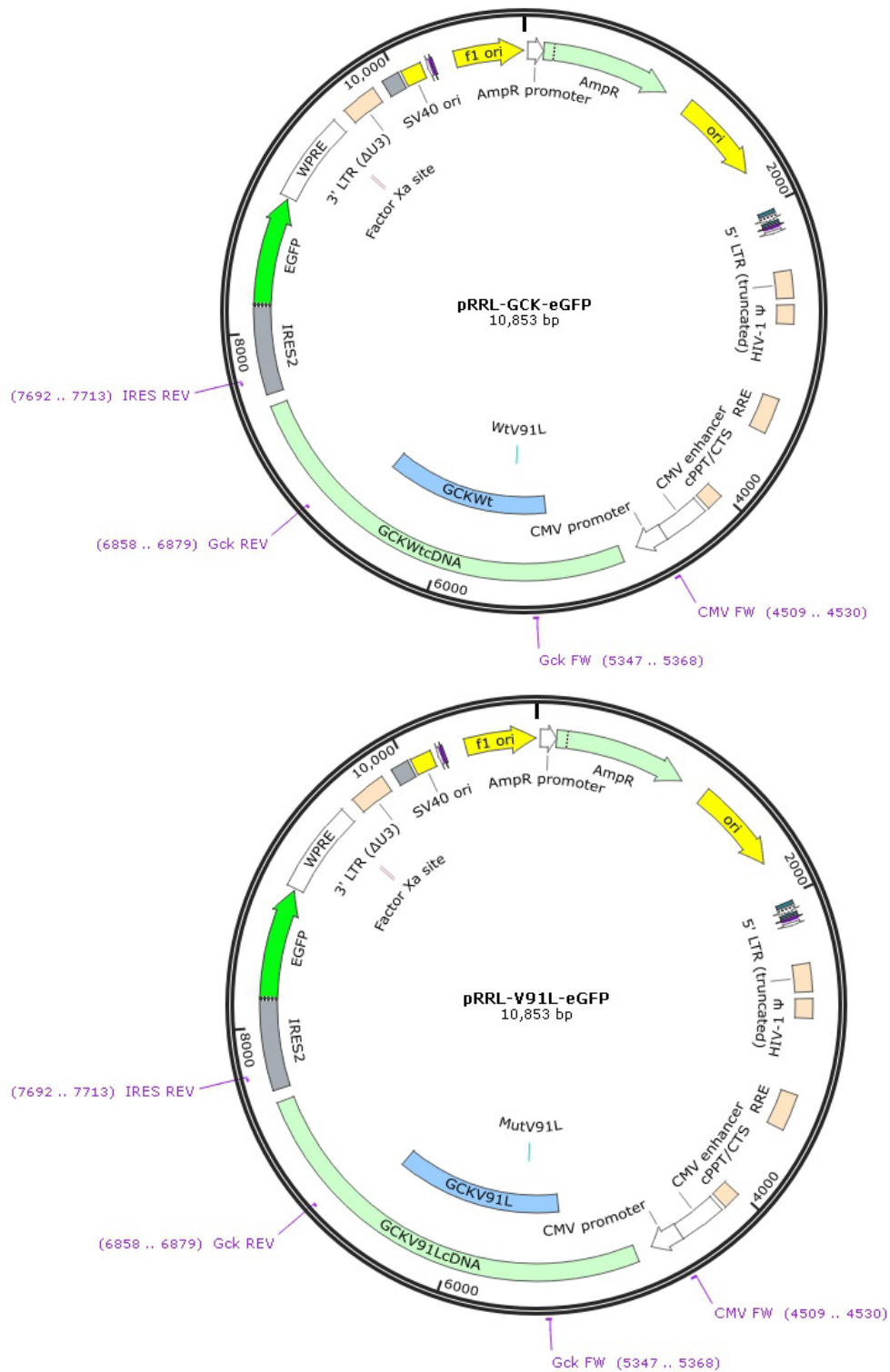


Fig.18: Esquema de los tres plásmidos secuenciados: pRRL-sinIRES-eGFP, pRRL-GCK-eGFP y pRRL-V91L-eGFP con la posición de los cebadores usados para la secuenciación en cada uno de ellos.



## **1.2. Expresión de las proteínas GK y V91L en transfección simple.**

Una vez que sabemos que las secuencias están correctamente clonadas, el siguiente paso antes de realizar los virus, es comprobar que los vectores expresan correctamente tanto la eGFP como la proteína GK y la proteína V91L.

Para ello, se amplificaron los vectores transformando bacterias DH5 $\alpha$  con cada uno de ellos y se purifican los plásmidos por MIDIprep, para obtener la cantidad y calidad suficiente para realizar los distintos ensayos.

A continuación se realizaron transfecciones simples de cada plásmido por separado y se realizaron dos tipos de ensayos, por un lado, inmunofluorescencia y por otro, western-blot con anticuerpos frente a la proteína glucoquinasa.

Tanto los experimentos de inmunofluorescencia, como la detección de la proteína por Western-Blot, se realizaron sobre las células A293T, estas células presentan varias ventajas, entre ellas su fácil manejo y una alta capacidad de transfección, incluso con vectores de gran tamaño, como es nuestro caso. Además, al no expresar glucoquinasa, nos facilita mucho la detección de la proteína transfectada sin riesgo de ser enmascarada por una posible expresión endógena.

Para las inmunofluorescencias se sembraron estas células A293T placas de 24 pocillos, cada uno de ellos con lamelas, de manera que las células crecieran sobre ellas. Una vez que el cultivo se encontraba a un 80% de confluencia aproximadamente, se realizaron las transfecciones con cada uno de los tres vectores: pRRL-sinIRES-eGFP, pRRL-GCK-eGFP, pRRL-V91L-eGFP. Tras 48 horas se fijaron las células y realizaron las inmunofluorescencias usando la eGFP como marcador de las células transfectadas y anticuerpos frente a glucoquinasa, de manera que se comprobó la correcta expresión de la proteína.

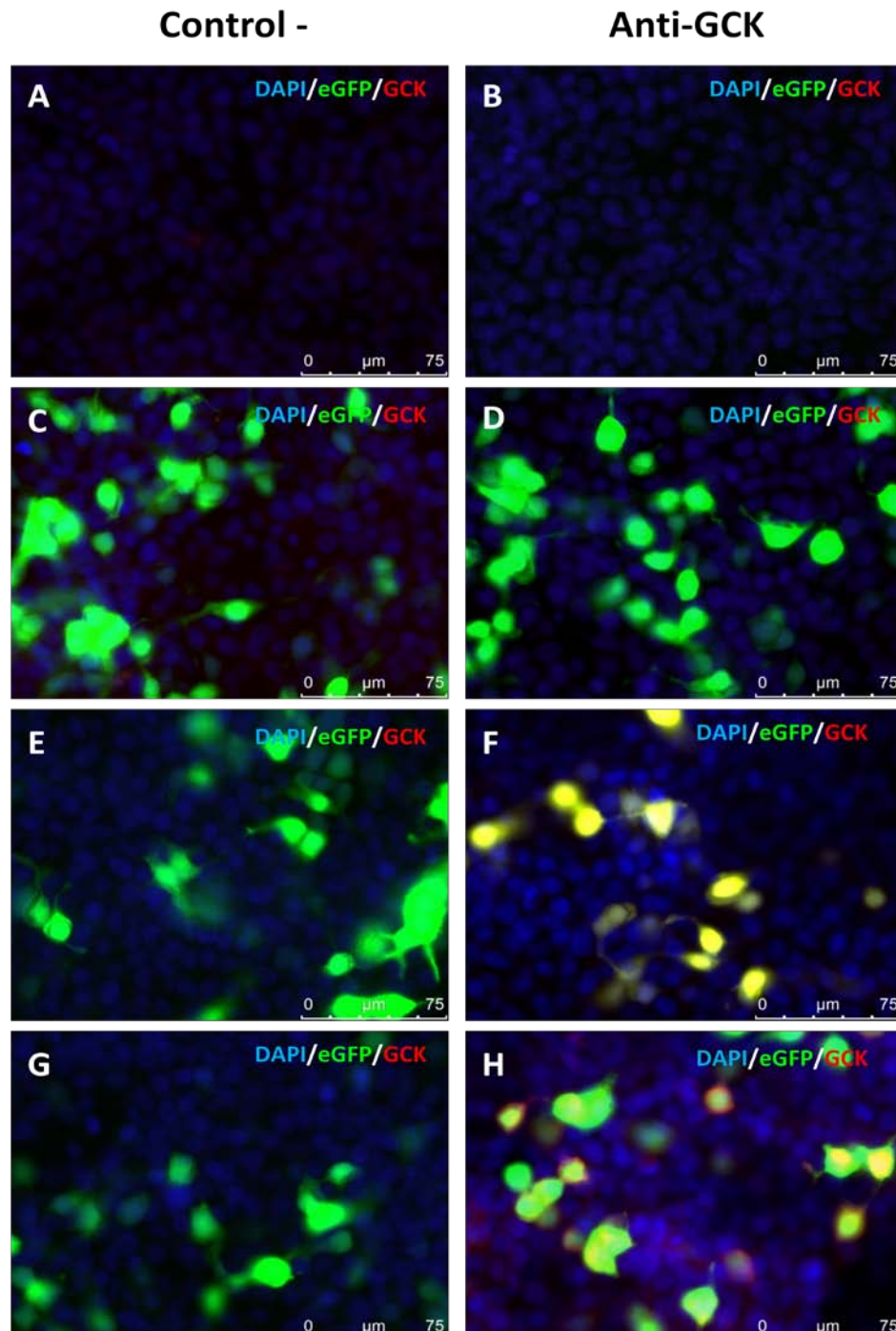


Fig.19: Imagen representativa de las transfecciones realizadas sobre células A293T con los distintos plásmidos de expresión lentiviral, para la comprobación de la expresión de las proteínas glucoquinasa silvestre y mutante ( $n=6$ ).

A, C, E y G controles negativos sin anticuerpo anti-GK.

B, D, F y H con anticuerpo anti-GK.

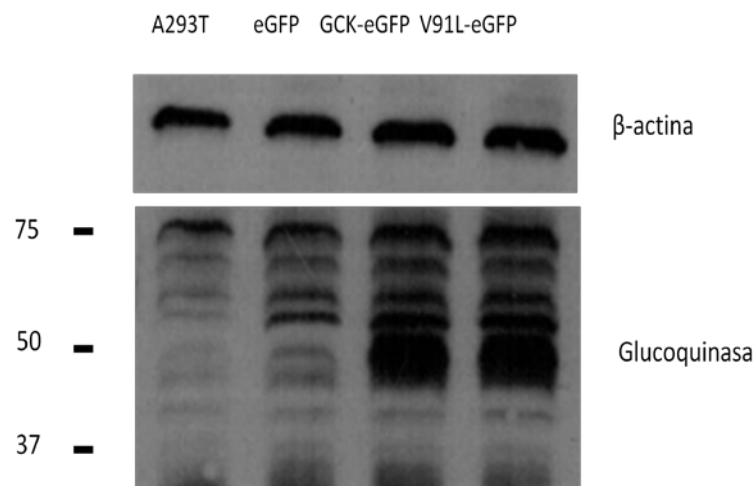
A y B: células A293T sin transfectar.

C y D: A293T transfectadas con pRRL-sinIRES-eGFP.

E y F: A293T transfectadas con pRRL-GCK-eGFP.

G y H: A293T transfectadas con pRRL-V91L-eGFP.

Para asegurarnos que la proteína se expresaba con normalidad, se analizaron también las muestras por Western-Blot. Se repitieron las transfecciones en las mismas condiciones anteriores, salvo que en este caso es innecesario el uso de lamelas para sembrar las células. Tras las 48 horas post-transfección, se recogieron las células y se realizaron extracciones de proteína total, que se corrieron en geles desnaturalizantes y se transfirieron a membranas para incubarlo con anticuerpos frente a glucoquinasa y  $\beta$ -actina, este último como control de carga.



*Fig.20: Western-Blot hecho con los extractos de proteína total obtenidos de células A293T transfectadas con los distintos vectores de expresión de glucoquinasa. (n=3).*

Tanto la proteína GK, como su mutante V91L, tienen un peso molecular aproximado de 50KDa. Como se observa en la figura 20, podemos comprobar que no solo existe expresión por parte de las células transfectadas de la proteína GK y su versión mutante, sino que además, dicha expresión es alta y específica de aquellas transfecciones con vectores que contienen las secuencias correspondientes.

La carga homogénea de la  $\beta$ -actina, nos indica que todos los carriles contienen la misma cantidad de proteína total, y por tanto el aumento de la banda de la glucoquinasa, se debe a su expresión y no a un incremento en la cantidad total de proteína.

## **2. OBTENCIÓN DE LOS LENTIVIRUS.**

### **2.1. Formación de los lentivirus.**

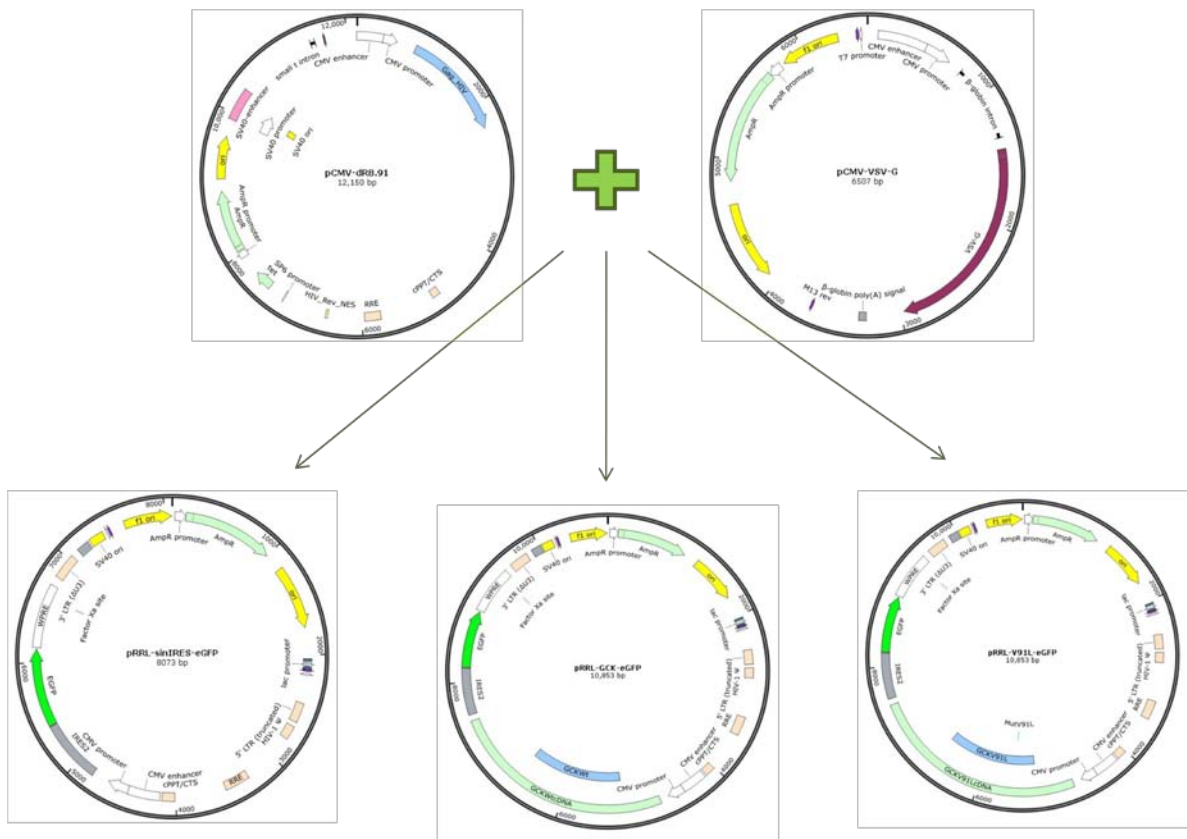
Una vez, que hemos comprobado que la secuencia de los genes de expresión de las proteínas GK silvestre y mutante V91L es correcta, y que ambas proteínas se expresan en células transfectadas con los plásmidos correspondientes, pasamos a hacer los virus que van a utilizarse como herramienta para conseguir que los islotes tanto de ratón como humanos sobreexpresen ambas proteínas y así ver qué efecto causa dicha sobreexpresión. Para ello se utilizó la línea celular A293T.

Las células A293T, son células humanas de riñón con morfología epitelial. Son células derivadas a su vez de la línea celular HEK293. Su principal característica además de que posee una alta capacidad de transfección, es que contienen el antígeno "SV40Large T" esto hace que sea la línea celular ideal y de mayor uso para la producción de vectores virales ya que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación del virus SV40, es decir, permite el primer paso para la formación de las partículas víricas.

Otro factor importante para obtener una buena producción viral es la calidad del ADN con el que vamos a transfectar las células, es fundamental que todos los vectores que usemos estén purificados de la forma más limpia posible, ya que de ello va a depender en gran medida el porcentaje de transfección que obtengamos y por lo tanto la cantidad de virus que van a producir las células.

Para obtener una cantidad suficiente y en alta calidad de los distintos vectores, se transformaron bacterias DH5α con cada uno de ellos y los plásmidos se purificaron con el kit de MidiPrep de Qiagen.

Tras sembrar las células, se dejaron crecer hasta una confluencia aproximada de entre el 80% y el 90%. Se transfectaron con las siguientes combinaciones de plásmidos para obtener los distintos lentivirus.



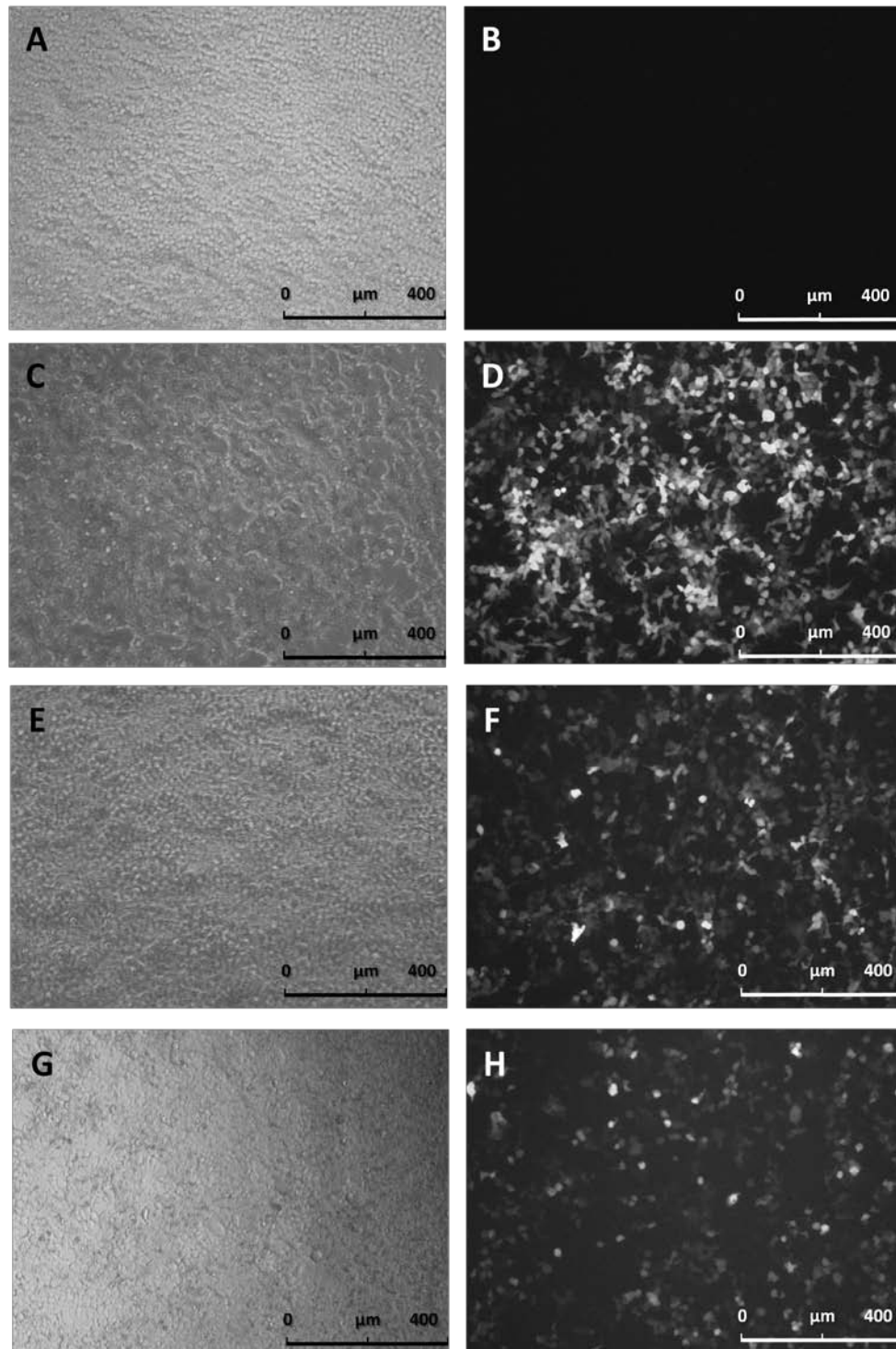
*Fig.21: esquema de las tres combinaciones de vectores para las transfecciones triples que se realizaron para la formación de cada tipo de lentivirus, siendo comunes a todas ellas los plásmidos pCMV-dR8.91 y pCMV-VSV-G.*

Todos los virus producidos van a expresar la proteína verde fluorescente eGFP como marcador que nos indicará por un lado, la eficacia de transfección de las células productoras del virus, dándonos una idea aproximada de la producción viral que obtendremos. Por otro lado nos permitirá realizar la titulación del virus de una forma sencilla mediante el citómetro de flujo sin necesidad de otro marcador.

Junto con esta proteína, se co-expresará la proteína GK o V91L, según el caso, en las células transfectadas y posteriormente en las infectadas con los lentivirus que codifican para tales proteínas. En el caso del vector control, solo se producirá la proteína eGFP, como ya hemos comprobado en las transfecciones simples.

Una vez que teníamos los vectores correctamente amplificados y cuantificados y las células a la confluencia correcta, se realizaron las co-transfecciones de los grupos de tres vectores para la producción de los lentivirus.





*Fig.22: Imágenes de las células A293Tco-transfectadas con los tres vectores necesarios para la producción viral. Las imágenes se tomaron durante el proceso de formación de las partículas virales. A la izquierda las imágenes en campo claro y a la derecha las imágenes de fluorescencia.*

*A y B. Células sin transfectar.*

*C y D. Células transfectadas produciendo lentivirus eGFP.*

*E y F. Células transfectadas produciendo lentivirus GCK-eGFP.*

*G y H. Células transfectadas produciendo lentivirus V91L-eGFP.*

Como se aprecia en la figura 22, las células que están formando las partículas lentivirales, expresan a su vez, las proteínas con las que han sido transfectadas, como si de una transfección simple se tratara, de ahí, que podamos ver expresión de eGFP en aquellas células que contienen el plásmido correspondiente.

El nivel de expresión de eGFP, así como el porcentaje de células que lo expresan resulta únicamente indicativo de la cantidad de producción viral que obtendremos, ya que para detectar la acumulación de la proteína verde, basta con que el plásmido que la codifica haya entrado en la célula durante la transfección, mientras que para que sea posible la producción viral es imprescindible que los tres plásmidos se hayan transfectados con eficacia en una misma célula.

También se puede apreciar en la figura, una mayor acumulación de eGFP en las células productoras del virus control, con respecto a las células que producen el virus que codifica para GK y más aún en el que codifica para V91L. Esto podría deberse a que en el caso del control, solo se expresa la proteína verde fluorescente, que resulta totalmente inocua para la célula. Mientras que en los otros casos, se expresan de manera simultánea la GK o la V91L, lo cual supone un estrés adicional para la célula que puede estar afectando a su maquinaria, además los vectores que contienen los genes para estas proteínas, son significativamente mayores que el vector vacío, lo cual, también dificulta su entrada en la célula.

## **2.2. Cuantificación de los Lentivirus.**

Una vez recogida la producción viral, se filtra para eliminar cualquier resto celular y se procesa para su almacenaje en condiciones óptimas.

El siguiente paso previo al uso del lentivirus es su cuantificación. Para ello, como ya hemos indicado nos serviremos de la proteína eGFP como marcador, se infectarán células con distintas cantidades de medio conteniendo lentivirus y



tras 48h y con la ayuda del citómetro de flujo, sabremos qué porcentaje de células se han infectado con cada volumen de virus.

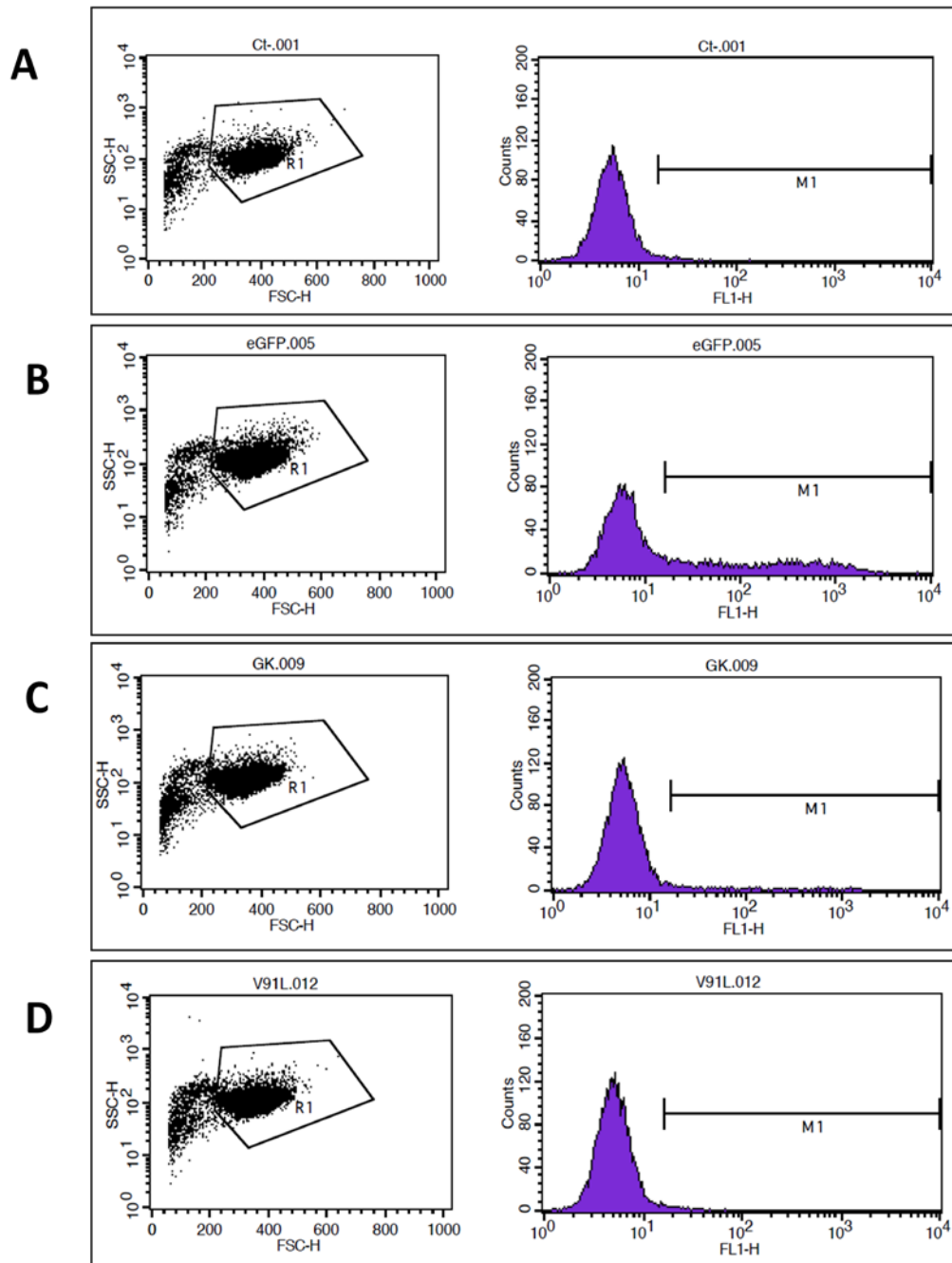


Fig.23: Citometría de flujo de una de las producciones lentivirales utilizadas en este trabajo, para la cuantificación de los distintos virus. Este proceso se realizó en total en cuatro ocasiones para cuantificar nuevas producciones virales o verificar el título de alícuotas virales previamente a su uso en los experimentos con islotes.

A la izquierda se representa mediante una nube de puntos el total de células en cultivo. A la derecha (histograma) se analiza el porcentaje de células fluorescentes en verde procedente de la expresión de la eGFP.

A: Células A293T sin infectar para establecer la autofluorescencia.

B: Células A293T infectadas con lentivirus control eGFP.

C: Células A293T infectadas con lentivirus GCK-eGFP.

D: Células A293T infectadas con lentivirus V91L-eGFP

En la figura 23 podemos comprobar cómo aumenta la cantidad de células positivas para eGFP en aquellas células infectadas con los distintos vectores virales. Tras la realización de los cálculos usando el número de células sembradas en el pocillo y las distintas cantidades de sobrenadante utilizado, obtenemos la titulación de cada producción viral.

En este caso las cantidades de lentivirus obtenidas para cada construcción fueron las siguientes:

- Lentivirus eGFP: 300 UI/ $\mu$ l.
- Lentivirus GCK-eGFP: 30UI/ $\mu$ l.
- Lentivirus V91L-eGFP: 20 UI/ $\mu$ l.

Como podemos ver, se mantienen las diferencias que ya observábamos en las células productoras de los lentivirus. Esta disminución en la cantidad de células detectadas, puede tener dos explicaciones, una, que cómo ya intuíamos en la figura 23, las células productoras del lentivirus y debido al mayor tamaño del plásmido, se transfectan peor y por lo tanto son menos las células que van a producir partículas víricas, o bien las proteínas GK y V91L afectan a la maquinaria celular produciendo un mal funcionamiento de la célula en general que afecta a la producción lentiviral.

### **2.3. Expresión de las proteínas GK y V91L en células infectadas.**

Al igual que se comprobó la expresión de las proteínas GK y V91L en el paso previo a la formación de los lentivirus, es necesario confirmar que dicha expresión se mantiene y es específica de las células infectadas.

Para ello se repitieron los experimentos de inmunofluorescencia, usando esta vez células infectadas con los distintos lentivirus.

De nuevo las inmunofluorescencias se realizaron en la línea celular A293T.

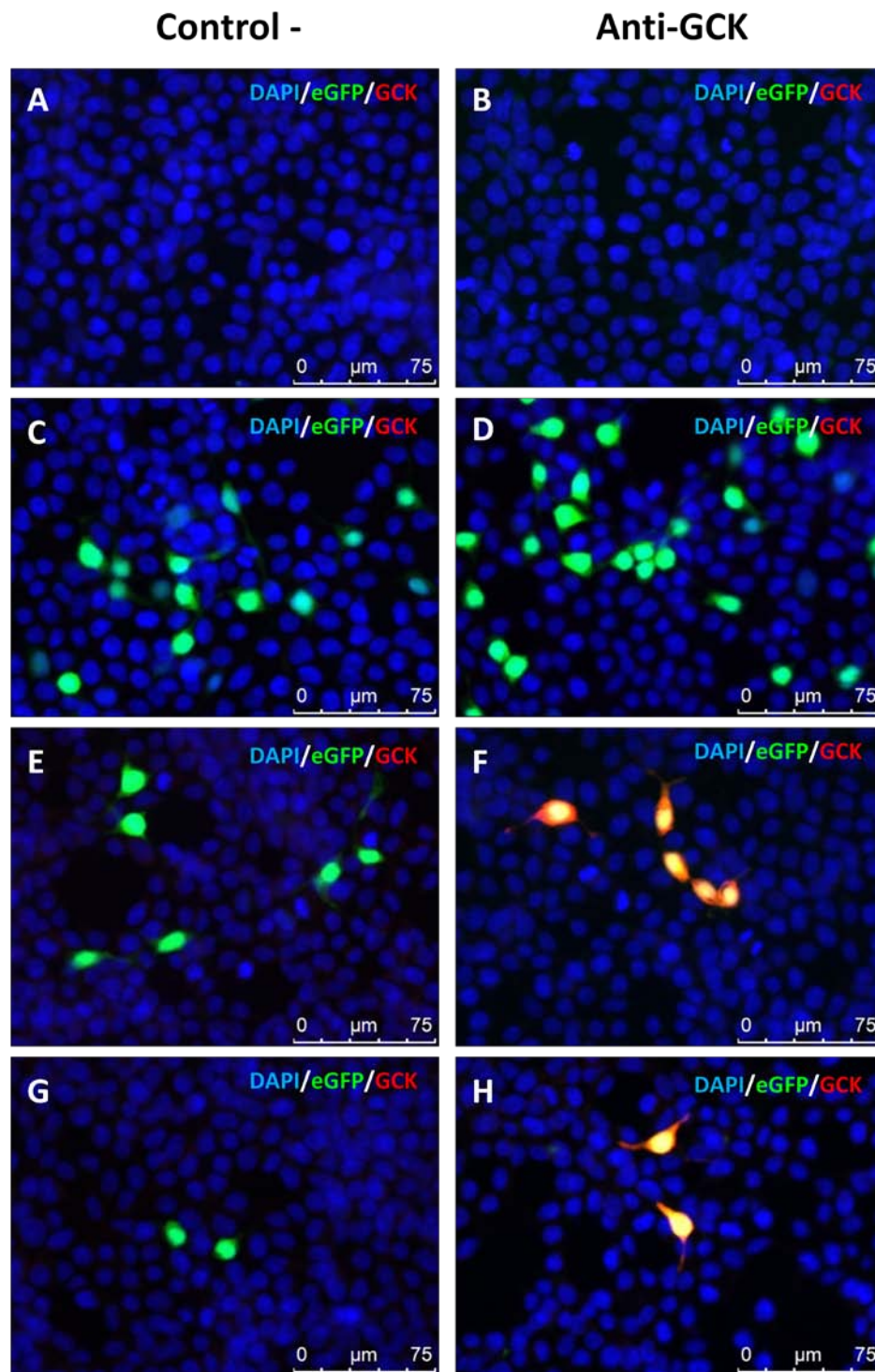


Fig.24: Imagen representativa de las infecciones realizadas sobre células A293T con los distintos lentivirus para la comprobación de la expresión de las proteínas glucoquinasa silvestre y mutante V91L ( $n=6$ ).

A, C, E y G controles negativos sin anticuerpo anti-GK. B, D, F y H con anticuerpo anti-GK.

A y B: células A293T sin infectar.

C y D: A293T Infectadas con lentivirus control eGFP.

E y F: A293T Infectadas con lentivirus GCK-eGFP.

G y H: A293T Infectadas con lentivirus V91L-eGFP.

En esta figura 24, podemos comprobar cómo, efectivamente, únicamente las células infectadas expresan eGFP, y de manera adicional GK o V91L en aquellas células infectadas con el correspondiente lentivirus.

Estos dos primeros bloques de resultados, corresponden a los pasos previos necesarios para la obtención de los lentivirus, la herramienta usada para la expresión de las proteínas GK y V91L en los islotes humanos y de ratón. A continuación se analizará cuales son los efectos observados en islotes de ratón y humanos infectados con estos lentivirus.

Como apuntamos en la introducción, los islotes de los pacientes con mutaciones activadoras de la glucoquinasa, concretamente con la mutación, V91L, tienen unas características muy concretas, que son las que vamos a analizar a continuación en los islotes infectados tanto de ratón como humanos, para comprobar si podemos reproducir al menos parcialmente el fenotipo que desarrollan estos pacientes y que podría ser de utilidad como terapia génica/celular en el tratamiento de la diabetes.

Estas características analizadas fueron las siguientes:

- Tamaño de los islotes: los pacientes con esta mutación presentan un incremento de 2.5 veces en el tamaño de sus islotes, con respecto a individuos sanos o con otras mutaciones asociadas a patologías que también causan hipoglucemias.

- Secreción de insulina alterada: los niveles de glucosa requeridos para estimular la secreción de insulina eran sensiblemente más bajos que los de individuos sanos.

- Proliferación y apoptosis: ambas incrementadas en estos pacientes, posiblemente se deba a un incremento en el tráfico intracelular de glucosa.

### **3. INFECCIÓN Y ANÁLISIS DE ISLOTES DE LANGERHANS DE RATÓN CON LENTIVIRUS.**

#### **3.1. *Tamaño de los islotes.***

Para el análisis de un posible incremento en el tamaño de los islotes infectados con el lentivirus que codifica para la proteína mutada V91L, se aprovecharon los islotes ya montados sobre portas, resultantes de las inmunofluorescencias realizadas para el estudio de la apoptosis y proliferación.

Se tomaron imágenes de dichos islotes, en un microscopio de fluorescencia, con el filtro de ultravioleta, para conseguir la imagen de DAPI y con un objetivo de poco aumento (10x), de manera que obtuviéramos imágenes de los islotes completos para poder trazar, con ayuda del programa de análisis FIJI, el área de cada islote individual y obtener la medida de dicha área.

Una vez hecho esto se hizo la media de todas las áreas y se compararon entre ellas. Se midió el área de un total de 193 islotes (39 control, 36 eGFP, 52 GCK y 66 para V91L) procedentes de seis infecciones correspondientes a experimentos independientes de proliferación y apoptosis.

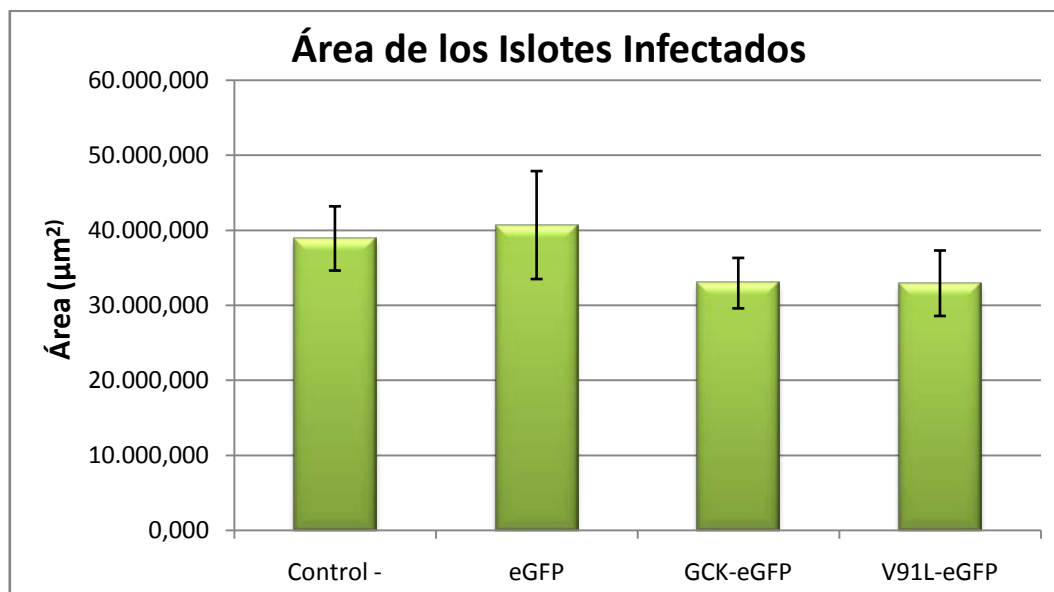


Fig. 25: Representación de las medias de las áreas de los islotes de ratón analizados. Se midieron las áreas de un total de 193 islotes procedentes de 6 infecciones independientes. Datos representados con la media  $\pm$  ESM.

Como se puede apreciar en la figura 25, no existen diferencias significativas entre el tamaño de los islotes no infectados y aquellos infectados con cualquiera de los lentivirus.

### 3.2. Secreción estática de insulina.

Para evaluar si estos islotes infectados podían reproducir la hiperinsulinemia observada en los pacientes, se sometieron a pruebas de secreción estática de insulina a distintas concentraciones de glucosa.

Glucosa	Control	eGFP	GCK-eGFP	V91L-eGFP
1.1mM	1.0	1.02±0.10	1.14±0.06	2.17±0.14*
2.8mM	1.13±0.07	1.06±0.04	1.36±0.08	2.23±0.16*
5.6mM	1.39±0.07	1.28±0.10	1.35±0.10	3.55±0.40*
8.3mM	1.99±0.12 <sup>†</sup>	1.79±0.07 <sup>†</sup>	2.20±0.18 <sup>†</sup>	5.47±0.80* <sup>†</sup>

Tabla 4: Islotes de ratón infectados (4 infecciones)

Secreción de insulina relativa al control (1.1 mM). Datos representados con la media  $\pm$  ESM.

\*:  $p < 0.01$  comparado con el resto de condiciones.

†:  $p < 0.05$  comparado con concentraciones de glucosa que no estimulan la secreción.

Podemos comprobar en los datos resumidos en la tabla 4, que mientras los islotes, bien sin infectar, bien infectados con el lentivirus de eGFP (control) y GCK, comienzan la secreción de la insulina a concentraciones de glucosa aproximadamente a 5 mM, aquellos islotes que fueron infectados con el lentivirus V91L y que por lo tanto un porcentaje de sus células están expresando la glucoquinasa mutada, comienzan a secretar insulina a una concentración mucho menor, en torno a 1.1 mM.

Los islotes infectados con los lentivirus que codifican para la glucoquinasa silvestre se comportan como los islotes control en respuesta a glucosa, tanto en el umbral de secreción de insulina en presencia de glucosa, como en la cantidad total de insulina liberada.

No así los islotes que se infectaron con la glucoquinasa mutada, en los que no solo disminuye la concentración de glucosa a la que comienza la secreción (1.1 mM), si no que la cantidad de insulina liberada es mayor comparándola con los controles cuando estos comienzan a secretar a su concentración de glucosa correspondiente. Así mismo, y muy importante, dicha secreción de insulina se



realiza de forma completamente regulada, indicando ausencia de afectación deletérea por parte de la V91L de la maquinaria secretora del islote infectado.

### **3.3. Apoptosis.**

Para medir la cantidad de apoptosis que presentaban los islotes una vez infectados, se analizaron los mismos mediante TUNEL, con esta técnica se visualiza el número de células que presentan rotura de doble cadena en su ADN.

Se realizaron en este caso un total de cinco ensayos para cada una de las condiciones sometidas a estudio, así como los controles correspondientes, para cada condición se infectaron un total de 200 islotes por condición en cada ensayo (n=5).

Se tomaron distintas imágenes de los islotes infectados con los distintos lentivirus y sin infectar como control, en el microscopio confocal. En la figura 26 presentamos una muestra de la apoptosis encontrada en cada una de las condiciones analizadas.

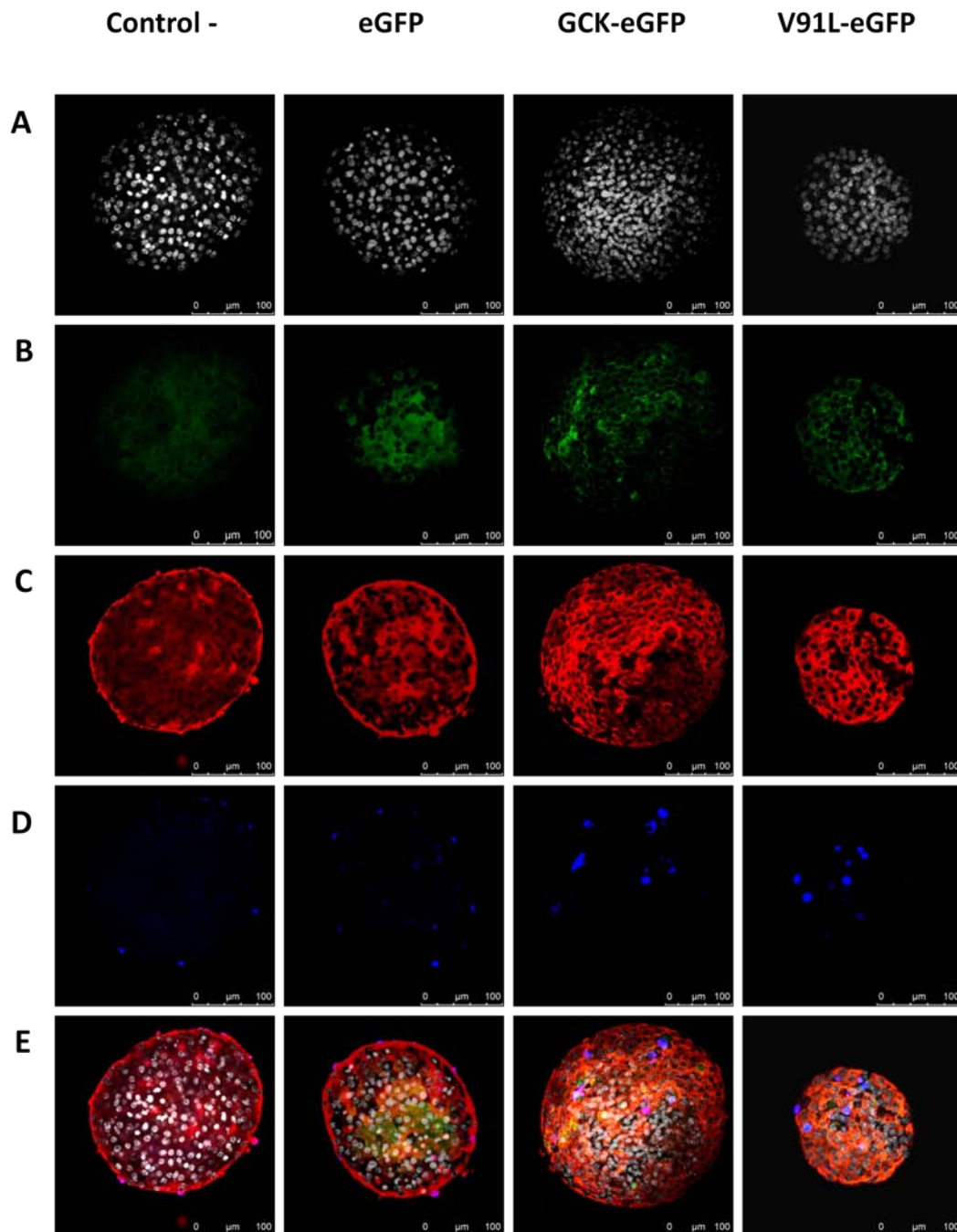
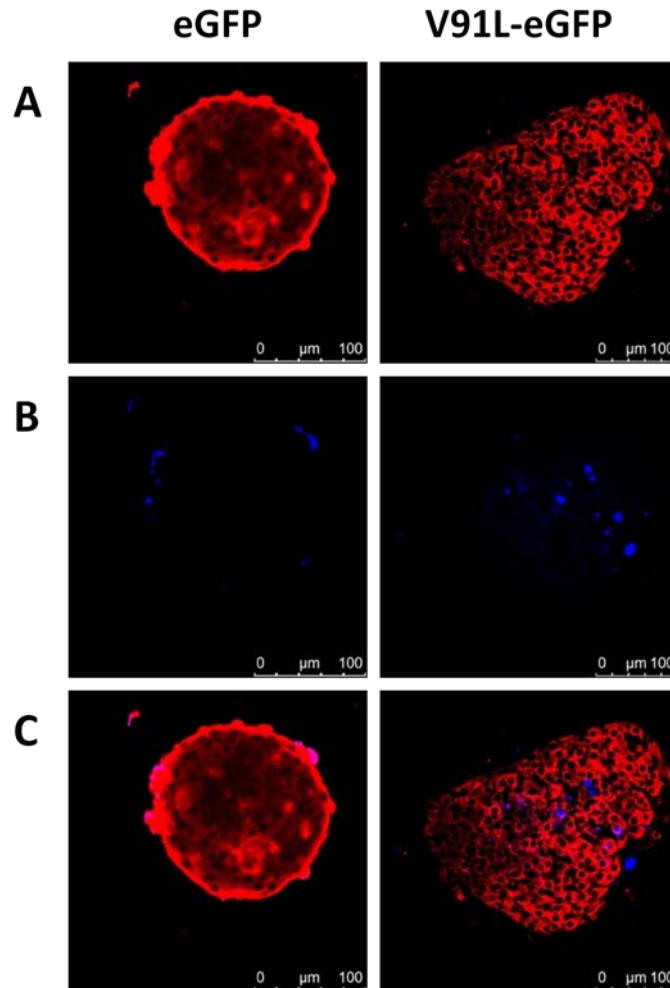


Fig. 26: Imágenes de los islotes de ratón infectados y analizados con TUNEL para cuantificar la apoptosis

A: DAPI, B: eGFP, C: Insulina, D: TUNEL, E: Superposición de todos los anteriores.

Como se observa en la figura 26, el número de núcleos marcados con fragmentación de ADN y por tanto indicativo del número de células en apoptosis, parece incrementarse con la infección de los diferentes lentivirus, también comprobamos (fig. 27) que la mayoría de las células en apoptosis

están a su vez expresando insulina, aunque esto último no ha sido posible cuantificarlo, ya que en el caso de los islotes de mayor tamaño el anticuerpo frente a insulina no ha marcado por completo el islote.



*Fig. 27: Imágenes de los islotes de ratón infectados y analizados con TUNEL para cuantificar la apoptosis*

*A: Insulina, B: TUNEL, C: Superposición de los anteriores.*

Para poder cuantificar la información aportada por imágenes como las presentadas (fig. 26) y hacer un estudio estadístico del nivel de apoptosis en los islotes y con ayuda del programa de procesamiento y análisis de imágenes FIJI, se contaron las células que aparecían marcadas como positivas para apoptosis, y se relativizó al número total de células de la misma imagen.

Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente gráfico.

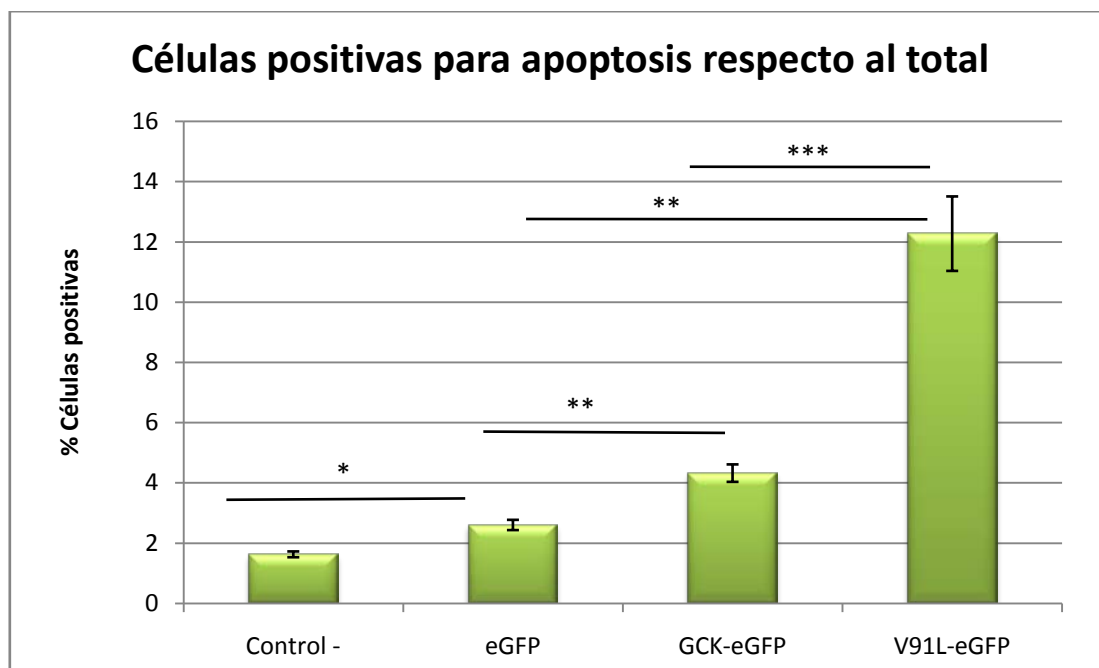


Fig. 28: Porcentaje de células positivas para apoptosis respecto al total analizado para cada corte de islote. Datos representados con la media  $\pm$  ESM, ( $n=5$ , 200 islotes infectados por condición en cada ensayo).

\* $p < 0.001$  comparando los islotes infectados con eGFP y los islotes sin infectar.

\*\* $p < 0.001$  comparando tanto los islotes infectados con el lentivirus GCK-eGFP, como los infectados con V91L-eGFP con el control de infección (eGFP).

\*\*\* $p < 0.001$  comparando los islotes infectados con lentivirus V91L-eGFP con los infectados con GCK-eGFP.

Como vemos en la gráfica (fig. 28), hay un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ) aumento de la apoptosis en los islotes infectados con el lentivirus control de eGFP frente a los controles no infectados, debido probablemente a la propia infección.

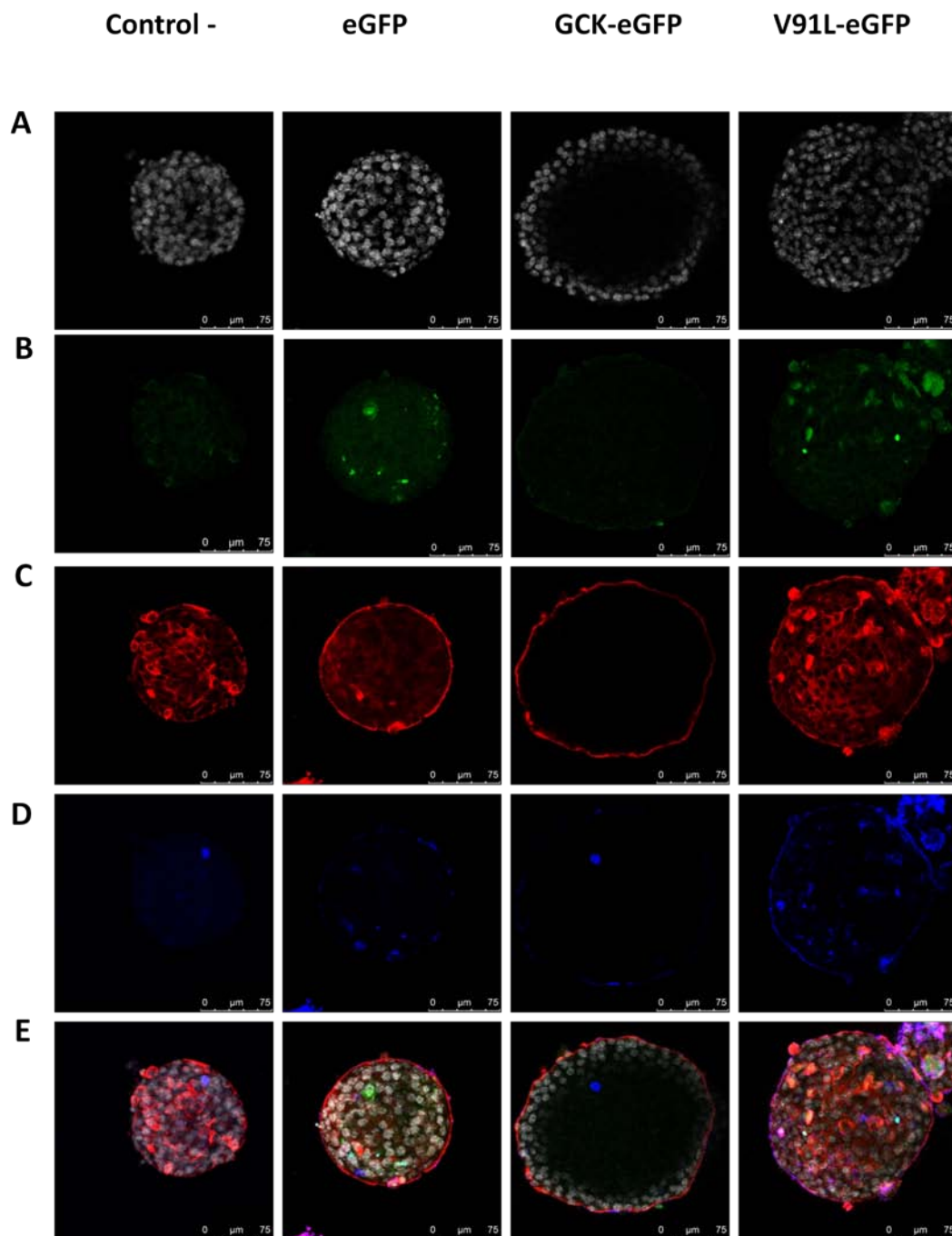
Aunque el aumento más significativo ( $p < 0.001$ ) se observa en los islotes infectados con lentivirus eGFP-V91L. En este caso, el nivel de apoptosis es tres veces superior si lo comparamos con los islotes infectados con la proteína silvestre y de casi cinco veces comparándolo con la apoptosis producida por el lentivirus control eGFP.

### **3.4. Proliferación.**

En el caso de los islotes de ratón, la proliferación se analizó inicialmente mediante inmunofluorescencia incubando los islotes previamente con BrdU (n=3 ensayos, 200 islotes infectados por condición en cada uno) y posteriormente se optó por cuantificarla con el marcador de proliferación Ki67 (n=5 ensayos, 200 islotes infectados por condición en cada ensayo).

En ambos casos, utilizando un microscopio confocal, se tomaron imágenes de distintos planos de los islotes y se cuantificó el número de células marcadas como positivas para proliferación, bien por incorporación de BrdU, como por marcaje con Ki67, frente al número de células totales de ese plano, para ello se contó el número de núcleos que aparecían marcados con DAPI.

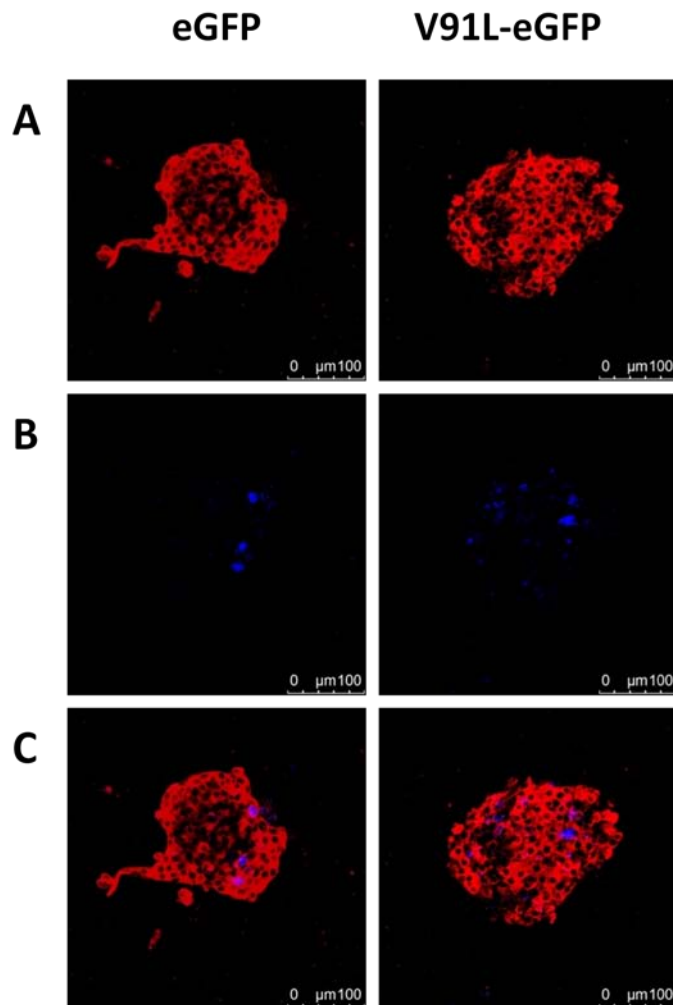
En la figura 29, presentamos algunas de las imágenes tomadas con el microscopio confocal, en las que podemos distinguir el nivel de proliferación mediante la incorporación de BrdU, en islotes infectados y control sin infectar. A pesar de los problemas técnicos que se presentaron con este marcaje, tanto en la integridad de los islotes como en la detección del anticuerpo, en estas imágenes vemos como la proliferación aumenta cuando se infecta con el virus que expresará la proteína glucoquinasa mutada V91L. Estas imágenes se analizaron para obtener datos estadísticamente significativos (fig. 31).



*Fig. 29: Imágenes de los islotes de ratón infectados y analizados con BrdU para cuantificar la proliferación. (n=3 ensayos, 200 islotes infectados por condición y ensayo)  
A: DAPI, B: eGFP, C: Insulina, D: BrdU, E: Superposición de todos los anteriores.*

También nos interesaba saber si eran las células  $\beta$  las que estaban siendo marcadas como proliferativas. Como vemos en la figura 30, las células marcadas como positivas para proliferación, también se encuentran

expresando insulina. Vemos también en esta figura, como afecta este marcaje a la integridad de los islotes.



*Fig. 30: Imágenes de los islotes de ratón infectados y analizados con BrdU para cuantificar la proliferación.*

*A: Insulina, B: BrdU, C: Superposición de los anteriores.*

A continuación, vemos en la figura 31, que una vez cuantificadas las imágenes y analizados los datos, no existen diferencias significativas en el nivel de proliferación entre los islotes control sin infectar y los infectados sólo con eGFP o con GCK-eGFP.

Sin embargo, cuando la infección se realiza con el lentivirus de expresión de la glucoquinasa mutada, la proliferación medida con BrdU aumenta significativamente ( $p < 0.001$ ).

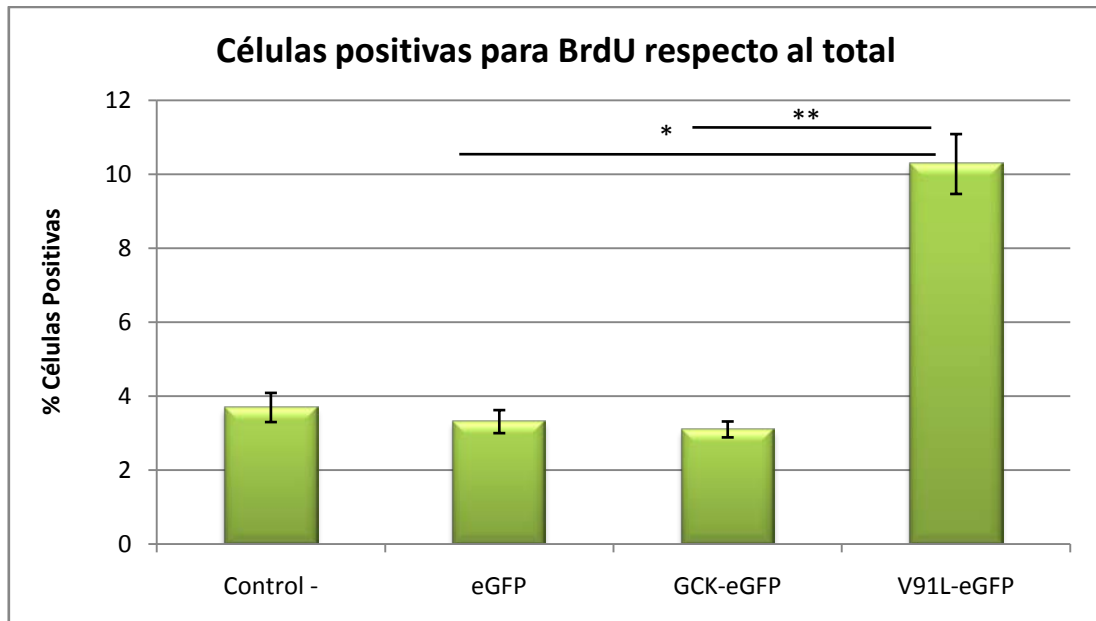


Fig. 31: Representación del porcentaje de proliferación analizando la incorporación de BrdU a las células de los islotes. Datos representados con la media  $\pm$  ESM, ( $n=3$  ensayos, 200 islotes infectados por condición y ensayo)

\* $p<0.001$  comparando los islotes infectados con V91L-eGFP con los islotes infectados con el lentivirus control (eGFP).

\*\* $p<0.001$  comparando los islotes infectados con V91L-eGFP con los infectados con la versión silvestre de la glucoquinasa (GCK-eGFP)

Como ya hemos comentado, el marcaje con BrdU presentaba algunos problemas técnicos, ya que en ocasiones la incubación con este marcador, disminuía la viabilidad de los islotes, y el anticuerpo frente a BrdU parecía reaccionar de manera inespecífica con la envuelta de los islotes, lo que nos restaba eficacia en su marcaje, se decidió optar por analizar la proliferación usando anticuerpos frente a Ki67. Esta proteína se encuentra en el núcleo celular y se utiliza ampliamente como marcador de proliferación.

Al igual que para el análisis de la proliferación con BrdU, para Ki67, se realizaron ensayos ( $n=5$ , 200 islotes infectados por condición y ensayo) de inmunofluorescencia con los islotes y se cuantificaron las imágenes obtenidas en el microscopio confocal.



En la figura 32, vemos las imágenes correspondientes al marcaje con Ki67, para la cuantificación del número de células en proliferación.

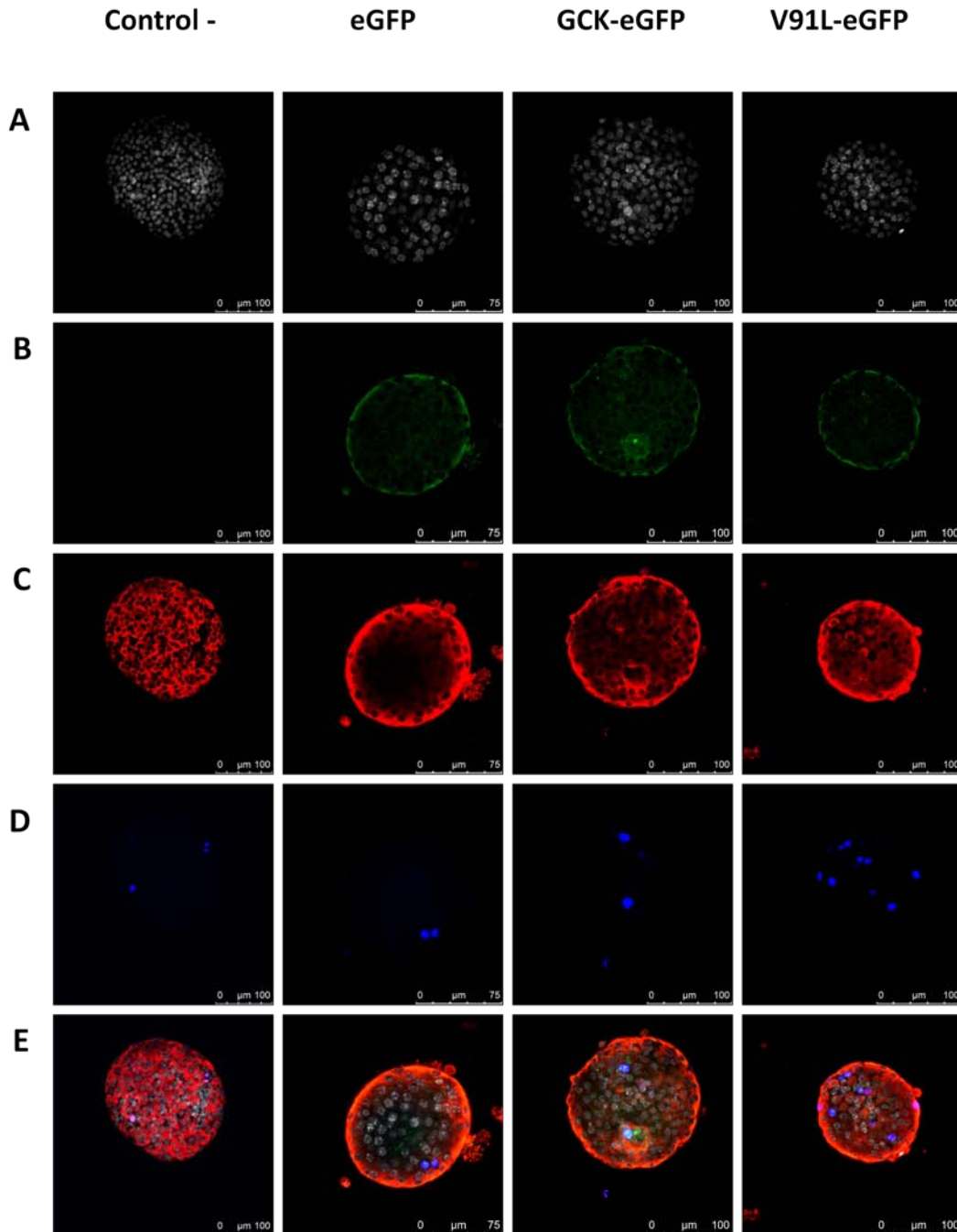
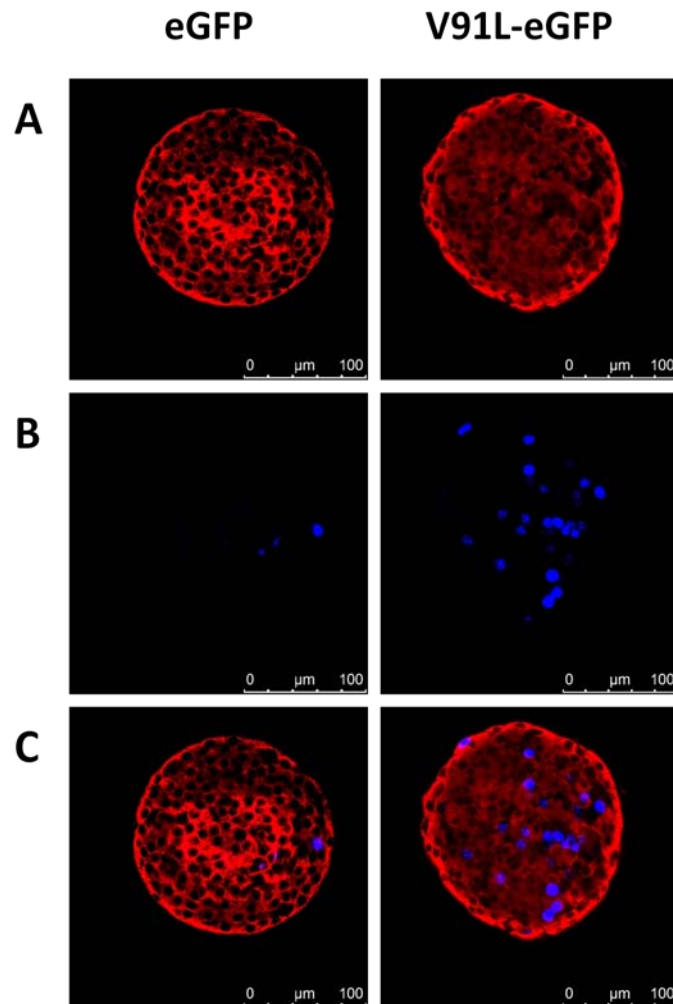


Fig. 32: Imágenes de los islotes de ratón infectados y analizados con Ki67 para cuantificar la proliferación. ( $n=5$  ensayos, 200 islotes infectados por condición y ensayo)  
A: DAPI, B: eGFP, C: Insulina, D: Ki67, E: Superposición de todos los anteriores.

Al igual que en el caso del marcaje con BrdU, nos interesa hacernos una idea (ya que no podemos cuantificarlo) de si las células en proliferación expresan a su vez la insulina (como marcador de célula  $\beta$ ). Esto lo vemos, a continuación, en la figura 33, donde de nuevo nos encontramos una mayoría de células con ambos marcadores.



*Fig. 33: Imágenes de los islotes de ratón infectados y analizados con Ki67 para cuantificar la proliferación.*

*A: Insulina, B: Ki67, C: Superposición de los anteriores.*

Todas las imágenes obtenidas, se analizaron y se cuantificó el número de células positivas para Ki67 (en proliferación) con respecto al número total de

células de cada imagen. Después de someter los datos obtenidos a estudios estadísticos, el resultado se presenta en la siguiente figura (fig.34).

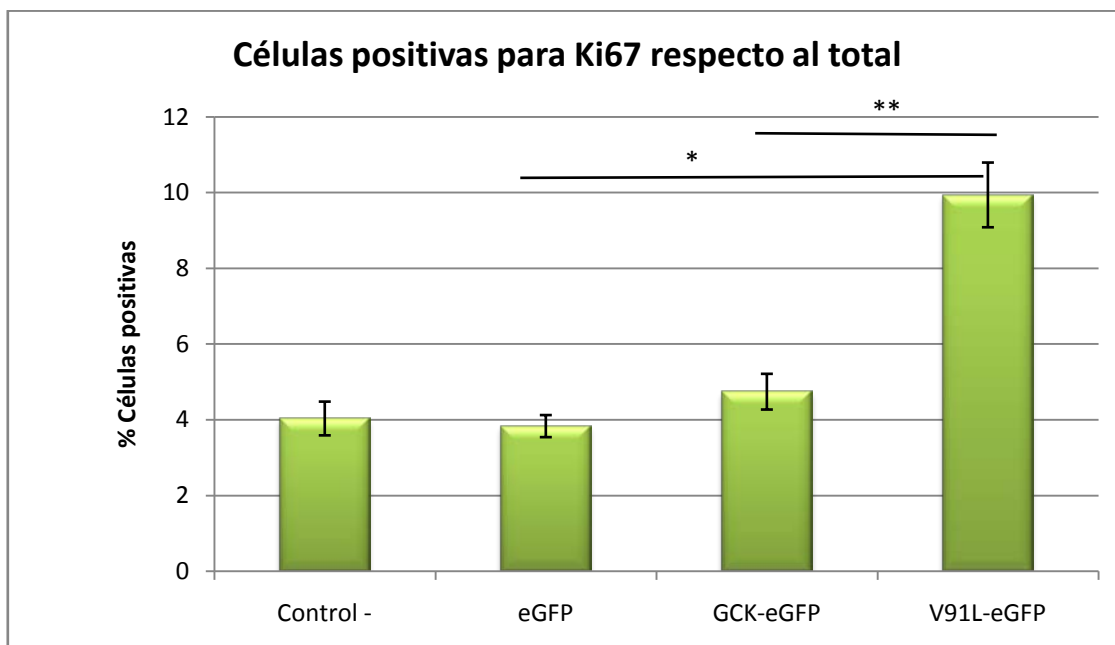


Fig. 34: Representación del porcentaje de proliferación analizando las células marcadas para Ki67, frente al total de células de los islotes. Datos representados con la media  $\pm$  ESM, ( $n=5$  ensayos, 200 islotes infectados por condición y ensayo)

\* $p<0.001$  comparando los islotes infectados con V91L-eGFP con los islotes infectados con el lentivirus control (eGFP).

\*\* $p<0.001$  comparando los islotes infectados con V91L-eGFP con los infectados con la versión silvestre de la glucoquinasa (GCK-eGFP).

Como vemos en la figura 34, las diferencias entre el control sin infectar, el control de infección expresando únicamente eGFP y la proteína glucoquinasa silvestre, no presentan diferencias significativas en cuanto a proliferación. No así los islotes infectados con los virus V91L-eGFP en lo que apreciamos un incremento significativo ( $p<0.001$ ) de la proliferación.

Comparando estos resultados, con los obtenidos previamente para BrdU, vemos que son similares, (fig. 31 y 34). Esto nos indica que, a pesar de las dificultades técnicas del marcaje con BrdU, los datos obtenidos por este método son fiables.

## 4. INFECCIÓN Y ANÁLISIS DE ISLOTES DE LANGERHANS DE HUMANOS CON LENTIVIRUS.

### 4.1. Tamaño de los islotes.

Al igual que en el caso de los islotes de ratón, para medir los islotes humanos, se utilizaron las muestras ya montadas sobre portas utilizadas para el análisis de la proliferación y la apoptosis, para tomar imágenes a poco aumento (10x) y delimitar el área de cada islote.

Se analizaron un total de 231 islotes (56 control, 56 eGFP, 67 GCK-eGFP y 52 V91L-eGFP) procedentes de cinco ensayos de proliferación y apoptosis.

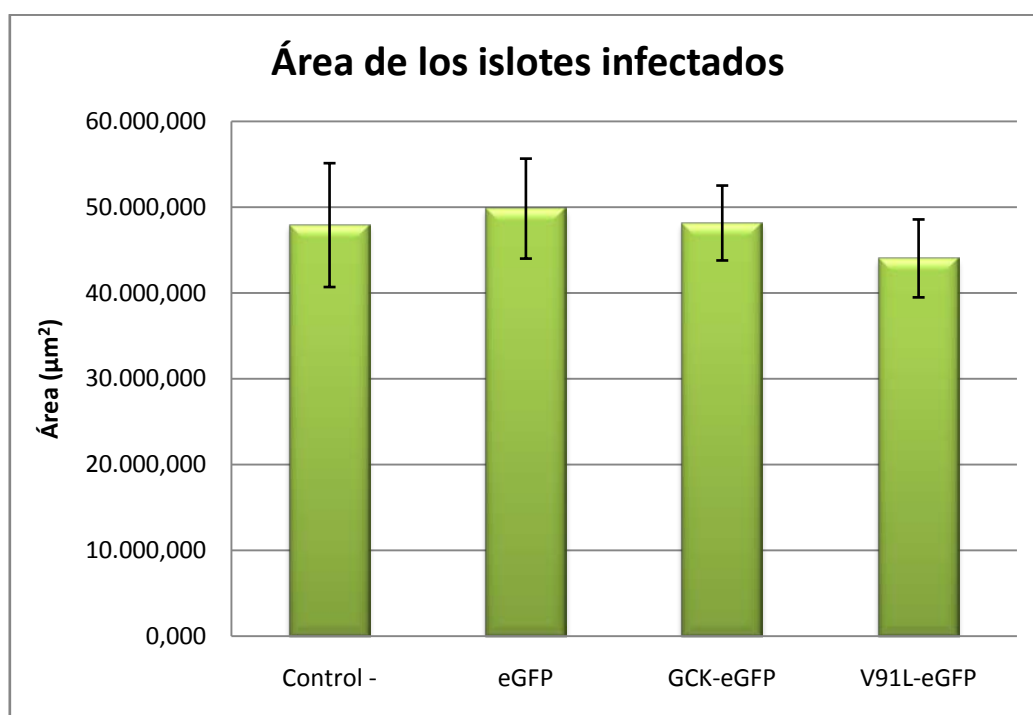


Fig. 35: Representación de las medias de las áreas de los islotes humanos analizados. El área se midió en píxeles cuadrados. Se midieron las áreas de un total de 231 islotes procedentes de 5 infecciones independientes. Datos representados con la media  $\pm$  ESM.

En el caso de los islotes humanos infectados con los distintos lentivirus y como se puede comprobar en la figura 35, no existen diferencias significativas entre los distintos grupos.

#### 4.2. Secreción estática de insulina.

Se analizó igualmente, la capacidad de secretar insulina de estos islotes, así como el umbral de glucosa al que lo hacían. Los resultados obtenidos, se representan en la siguiente tabla.

Glucosa	Control -	eGFP	GCK-eGFP	V91L-eGFP
1.1mM	1.0	1.03±0.04	0.95±0.05	1.17±0.14
2.8mM	1.10±0.10	1.01±0.05	1.14±0.09	2.81±0.18*
5.6mM	2.89±0.13 <sup>†</sup>	1.35±0.12	2.96±0.14 <sup>†</sup>	3.99±0.11*
8.3mM	4.67±0.19 <sup>†</sup>	4.83±0.17 <sup>†</sup>	3.21±0.15 <sup>†</sup>	8.27±0.62* <sup>†</sup>

Tabla 5: Islotes humanos infectados (4 infecciones)

Secreción de insulina relativa al control (1.1 mM). Datos representados con la media ± ESM.

\*:  $p < 0.05$  comparado con el resto de condiciones.

†:  $p < 0.05$  comparado con concentraciones de glucosa que no estimulan la secreción.

Como podemos comprobar, en el caso de los islotes humanos, volvemos a ver el mismo efecto, que ya observamos en los islotes de ratón infectados. Las células  $\beta$  de aquellos islotes que expresan la glucoquinasa mutada V91L, presentan un umbral para la secreción de insulina estimulada por la glucosa de aproximadamente 2.8 mM, similar al mismo umbral presentado por el paciente con la mutación GK-V91L y afecto de hipoglucemia. Además, la cantidad de insulina secretada, es mayor comparándola con los controles, aún cuando

estos comienzan la secreción a niveles óptimos para ello de glucosa. Así mismo, y como ocurre en los islotes de ratón infectados con V91L, la secreción de insulina está completamente regulada.

De nuevo, como ya observamos en ratón, aquellos islotes infectados con el lentivirus que expresa la proteína GK silvestre, se comportan como los islotes control y los infectados con el lentivirus que únicamente expresa eGFP, en cuanto a la concentración de glucosa necesaria para estimular la secreción de insulina, como en relación a la cantidad de insulina secretada.

### **4.3. Apoptosis.**

Para medir y cuantificar la cantidad de apoptosis de los islotes humanos sin infectar e infectados con los distintos vectores lentivirales, se realizaron ensayos de TUNEL (n=2 ensayos, 200 islotes infectados por condición) sobre los islotes cultivados con los distintos lentivirus.

Al igual que hicimos previamente con los islotes de ratón, se tomaron imágenes en microscopia confocal de distintos planos de los islotes y se cuantificaron las células con marcaje positivo para apoptosis frente al total de núcleos marcados con Dapi.

En la figura 36, vemos una muestra representativa de las imágenes obtenidas para el marcaje de apoptosis, mediante la detección de doble rotura en el ADN, de los islotes infectados con los distintos lentivirus y sin infectar como control.

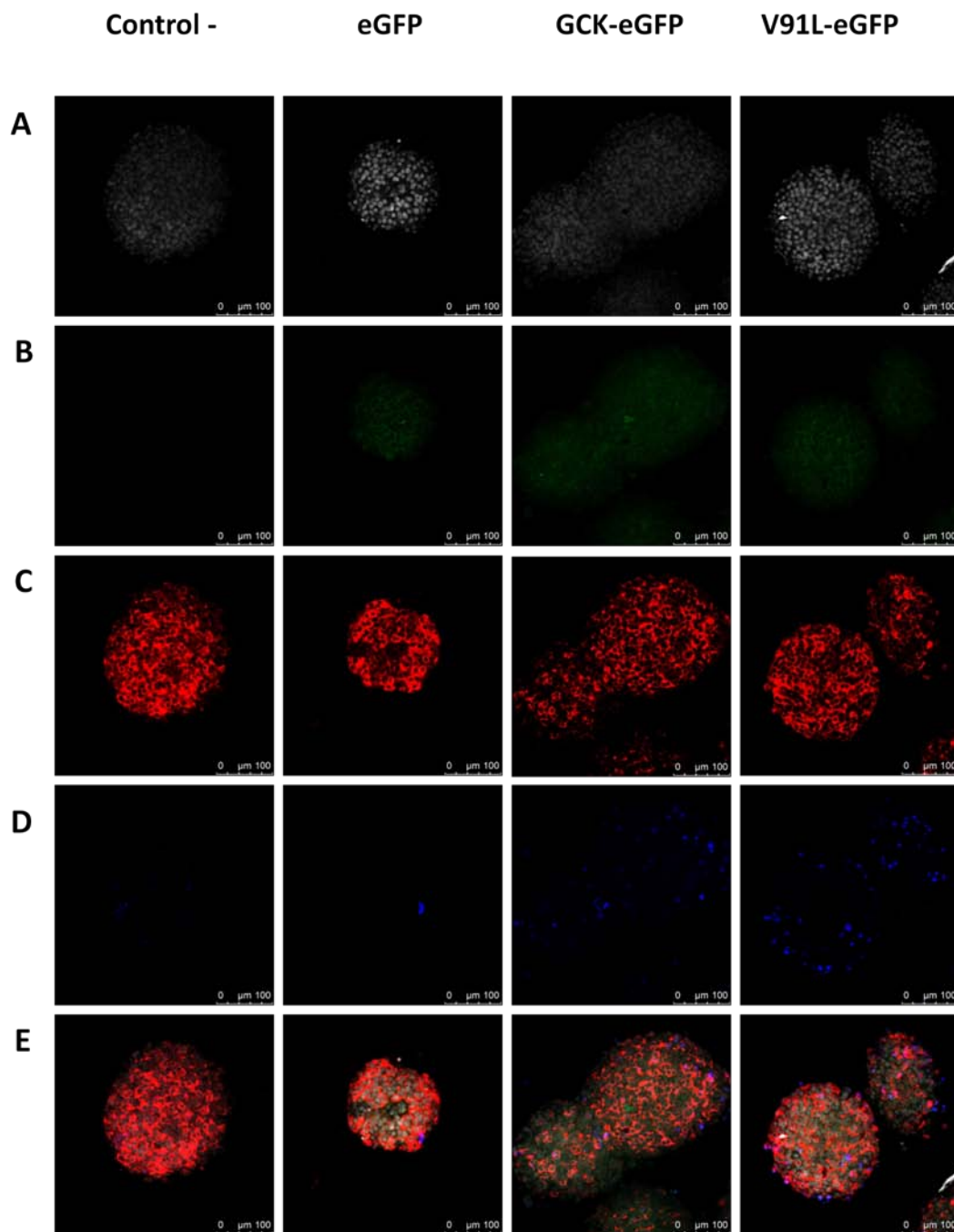


Fig. 36: Imágenes de los islotes humanos infectados y analizados con TUNEL para cuantificar la apoptosis. ( $n=2$  ensayos, 200 islotes infectados por condición y ensayo)  
A: DAPI, B: eGFP, C: Insulina, D: TUNEL, E: Superposición de todos los anteriores.

Al igual que con los islotes de ratón, quisimos saber si eran las células  $\beta$ , aquellas que se veían más afectadas por la apoptosis en las distintas infecciones (fig. 37). En este caso, y debido al mayor tamaño de los islotes, que dificultaba aún más la entrada de los anticuerpos, de nuevo, nos fue imposible la cuantificación fiable de cuantas células expresaban ambos marcadores.

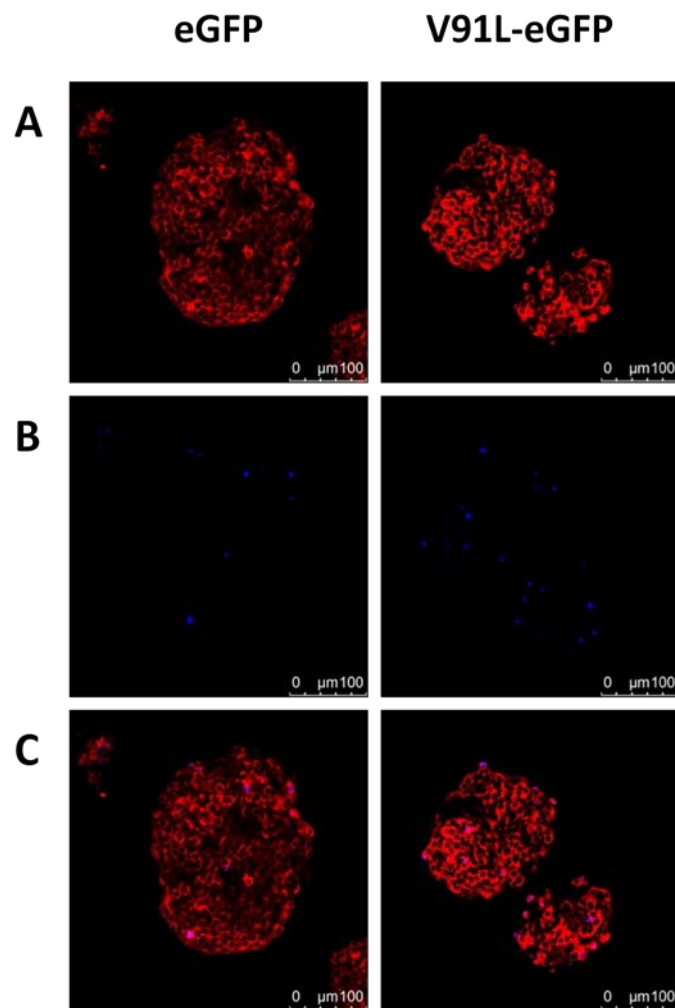


Fig. 37: Imágenes de los islotes humanos infectados y analizados con TUNEL para cuantificar la apoptosis.

A: Insulina, B: TUNEL, C: Superposición de los anteriores.



Una vez obtenidas todas las imágenes, se cuantificaron las células en apoptosis respecto al total, y se compararon los distintos grupos de islotes, para saber si existían entre ellos diferencias estadísticamente representativas (fig. 38).

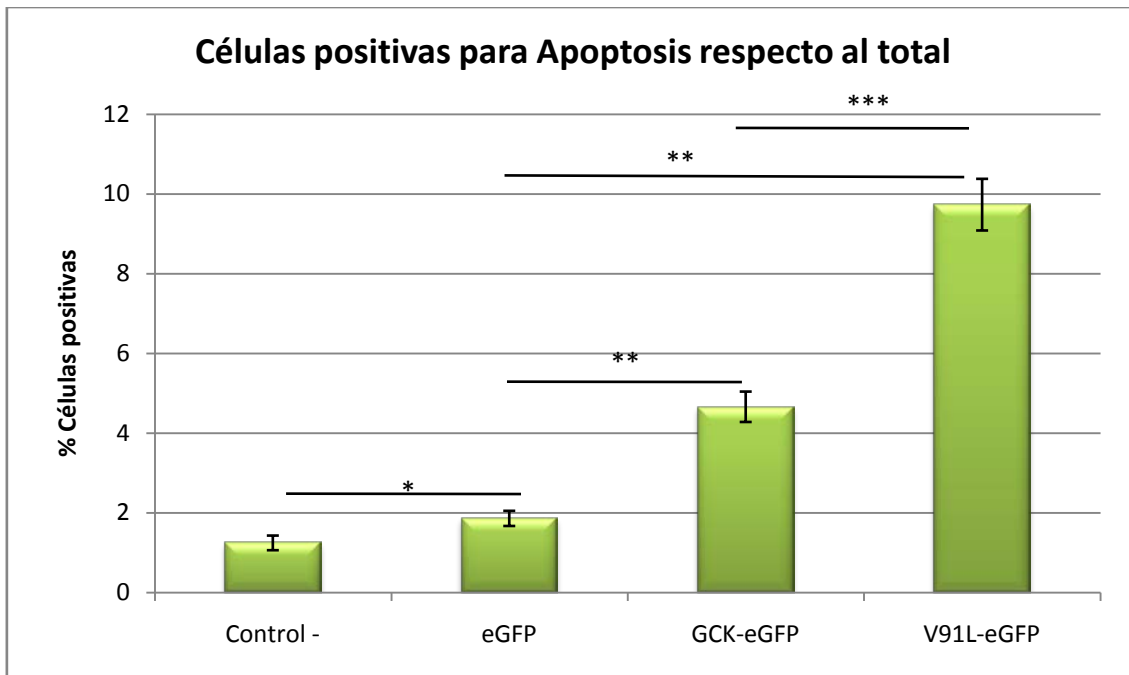


Fig. 38: Porcentaje de células marcadas como apoptóticas respecto al total analizado para cada corte de islote. Datos representados con la media  $\pm$  ESM, (n=2 ensayos, 200 islotes infectados por condición y ensayo)

\* $p < 0.05$  comparando los islotes infectados con eGFP y los islotes sin infectar.

\*\* $p < 0.001$  comparando tanto los islotes infectados con el lentivirus GCK-eGFP, como los infectados con V91L-eGFP con el control de infección (eGFP)

\*\*\* $p < 0.001$  comparando los islotes infectados con lentivirus V91L-eGFP con los infectados con GCK-eGFP.

Como se observa en la figura 38, el porcentaje de células en apoptosis, se ve significativamente afectado por la infección ( $p < 0.05$ ), aunque tiene un mayor incremento cuando esta infección se ve acompañada de la expresión de las proteínas GK y V91L ( $p < 0.001$  en ambos casos).

#### **4.4. Proliferación.**

En el caso de los islotes de humanos, dada la dificultad para disponer de ellos y teniendo en cuenta los resultados obtenidos para ratón, optamos por analizar la proliferación únicamente con ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos frente a la proteína marcadora de proliferación Ki67. (n=2 ensayos, 200 islotes infectados por condición y ensayo)

En la figura 39 se muestra una serie de imágenes representativas de las obtenidas en los dos ensayos realizados para la cuantificación de los islotes humanos infectados con los distintos lentivirus. Se aprecia un incremento en el número de células marcadas en aquellos islotes infectados con los lentivirus que expresan la proteína glucoquinasa mutada V91L.

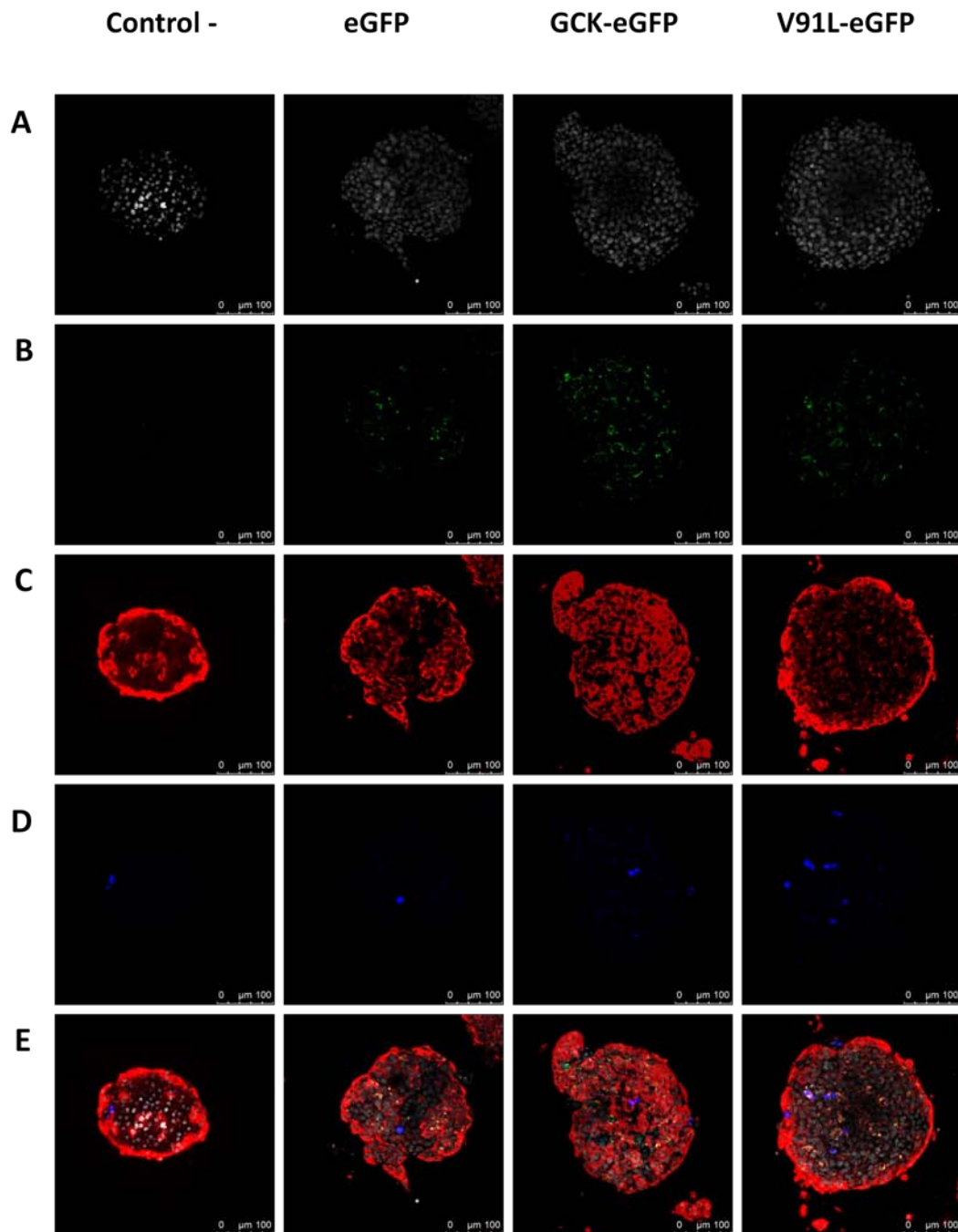
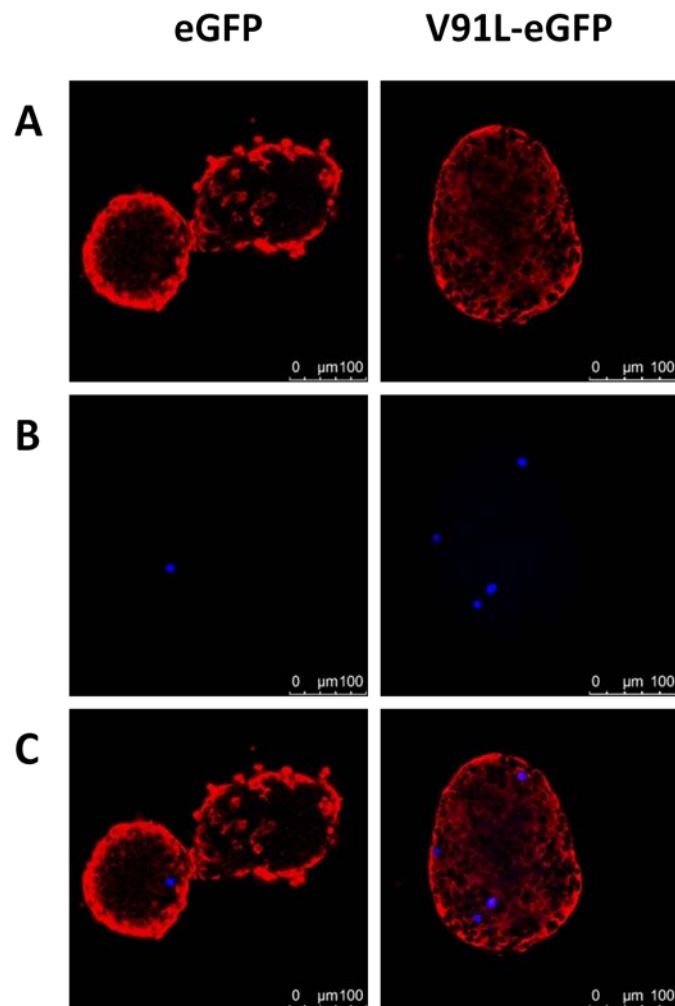


Fig. 39: Imágenes de los islotes humanos infectados y analizados con anticuerpos frente a Ki67 para cuantificar la proliferación. ( $n=2$  ensayos, 200 islotes por condición y ensayo).  
A: DAPI, B: eGFP, C: Insulina, D: Ki67, E: Superposición de todos los anteriores.

Quisimos ver una vez más hasta que punto eran las células con marcaje para insulina, las mismas que estaban marcadas como positivas para proliferación (fig. 40). De nuevo, la falta de marcaje para insulina en las áreas centrales del islote, nos impide cuantificar los resultados.



*Fig. 40: Imágenes de los islotes humanos infectados y analizados con anticuerpos frente a Ki67 para cuantificar la proliferación.*

*A: Insulina, B: Ki67, C: Superposición de los anteriores.*

Tras tomar las imágenes de distintos planos de cada islote y contar las células marcadas como positivas frente al total, se analizaron los datos obtenidos, que representamos a continuación en la figura 41.

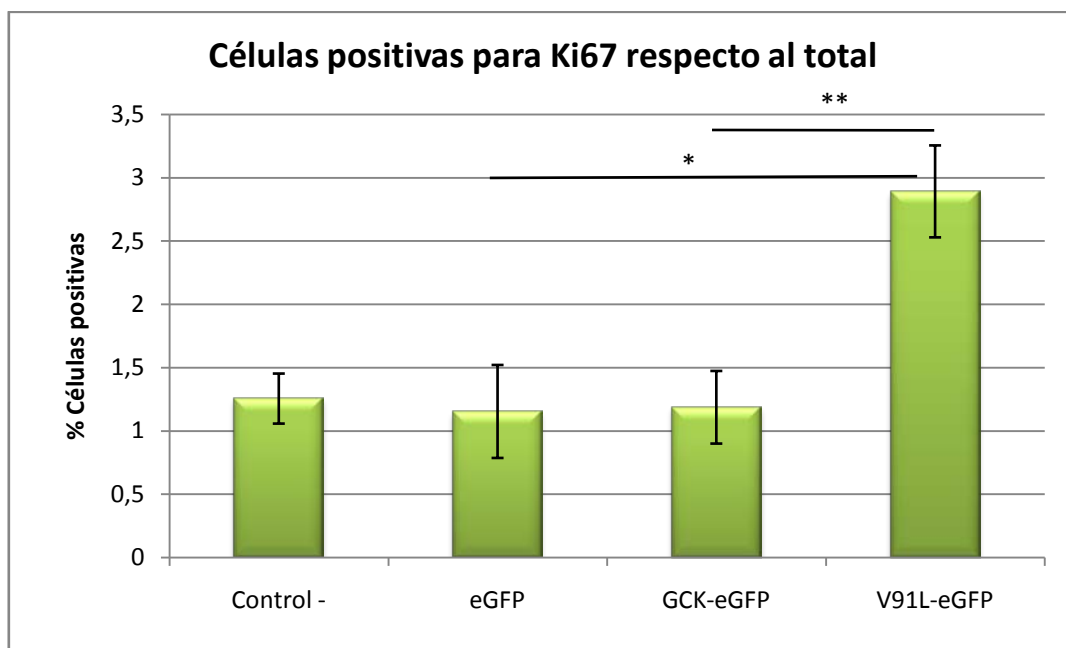


Fig. 41: Representación del porcentaje de proliferación analizando las células marcadas para Ki67, frente al total de células de los islotes. Datos representados con la media  $\pm$  ESM ( $n=2$  ensayos, 200 islotes por condición y ensayo)

\* $p<0.01$  comparando los islotes infectados con V91L-eGFP con los islotes infectados con el lentivirus control (eGFP).

\*\* $p<0.001$  comparando los islotes infectados con V91L-eGFP con los infectados con la versión silvestre de la glucoquinasa (GCK-eGFP).

Como vemos en la figura 41, al igual que ocurría en los islotes de ratón infectados, no vemos diferencias significativas entre los islotes cultivados sin virus, los islotes cultivados con virus control eGFP y aquellos cultivados con lentivirus GCK-eGFP.

Sin embargo, sí observamos un incremento significativo de la proliferación ( $p<0.01$ ) en los islotes cultivados en presencia del lentivirus V91L-eGFP con respecto al resto de condiciones (sin virus, infectados con lentivirus eGFP e infectados con lentivirus GCK-eGFP).

## **V. DISCUSIÓN**



Como hemos expuesto anteriormente, el objetivo final del presente trabajo está encaminado a proponer una nueva estrategia de terapia génica/celular para mejorar la viabilidad de los islotes provenientes de donantes cadavéricos, que son trasplantados a pacientes diabéticos, y reducir así el número de islotes necesario por paciente, ya que en la actualidad debido a que se requiere más de un donante por enfermo, el número de donantes es insuficiente para la demanda existente.

Para lograr esto necesitamos mejorar los islotes obtenidos de los donantes, de manera que sean más eficaces en la regulación de la homeostasis de la glucosa y así reducir el ratio donante/paciente. Actualmente, son muchos los estudios que se realizan en este sentido, sobre todo desde el punto de vista clínico, para la mejora de las técnicas de obtención, mantenimiento y trasplante de los islotes, así como los tratamientos de inmunosupresión y otros que deben seguir los pacientes trasplantados. ([Agarwal and Brayman, 2012](#); [Shapiro, 2012](#))

La proteína glucoquinasa, ya se había perfilado como una buena protagonista en la terapia de pacientes diabéticos mediante el uso de activadores específicos de esta proteína, para incrementar su nivel de actividad y recuperar una secreción de insulina óptima ([Gill et al., 2011](#); [Gorman et al., 2008](#); [lynedjian, 2009](#); [Matschinsky, 2009](#); [Matschinsky et al., 2006](#); [Matschinsky and Porte, 2010](#)).

A finales de los 90, por otra parte, comenzaron a describirse varios casos de familias con hipoglucemias asociadas a distintas mutaciones activadoras de la glucoquinasa cuyos efectos en los pacientes ya hemos descrito en la introducción. ([Barbetti et al., 2009](#); [Cuesta-Munoz et al., 2004](#); [Christesen et al., 2008](#); [Davis et al., 1999](#); [Glaser et al., 1998](#); [Meissner et al., 1999](#); [Wabitsch et al., 2007](#))

Y desde hace una década, se ha comenzado a estudiar la posibilidad de investigar más a fondo estas mutaciones activadoras de la glucoquinasa, con el



fin de conocer mejor los mecanismos intracelulares que se producen en estos pacientes y aplicar este conocimiento a los pacientes diabéticos para su mejora o incluso recuperación. ([Christesen et al., 2002](#); [Gloyn, 2003](#); [Gloyn et al., 2003](#); [Kassem et al., 2010](#); [Matschinsky, 2002](#); [Tornovsky-Babeay et al., 2014](#))

En esta línea se basa nuestro trabajo, en el análisis del comportamiento de islotes que expresen una de las mutaciones activadoras de la glucoquinasa descritas en humanos y cuyos efectos en los pacientes están bien caracterizados. De esta manera podemos saber si los efectos causados en los islotes de los pacientes, se reproducen en los islotes infectados y si nuestra herramienta funciona para poder usarla en la mejora de los islotes donados previamente al trasplante de estos.

Al igual que en el apartado anterior de resultados, analizaremos los mismos agrupándolos en los siguientes bloques.

1. Análisis de la secuencia y expresión de los vectores lentivirales.
2. Obtención de los lentivirus.
3. Infección y análisis de islotes de Langerhans de ratón y humanos con lentivirus.
  - 3.1. Tamaño de los islotes.
  - 3.2. Secreción estática de insulina.
  - 3.3. Apoptosis.
  - 3.4. Proliferación.

## 1. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA Y EXPRESIÓN DE LOS VECTORES LENTIVIRALES.

Como hemos comentado con anterioridad, para la mejora en la eficacia de los trasplantes de islotes a pacientes diabéticos, son varios los frentes que se deben abordar, desde la obtención de los islotes del donante, pasando por su cultivo, trasplante y posterior mantenimiento de su función, evitando el ataque del sistema inmune del receptor. ([Shapiro, 2012](#))

Recientemente, se está comenzando a desarrollar el uso de lentivirus, como terapia génica, para expresar en los islotes determinadas proteínas que contribuyan a la mejora de estos de cara a su trasplante, generalmente modificando aspectos relacionados con el futuro rechazo del sistema inmune. ([Giannoukakis et al., 1999](#); [Zaldumbide et al., 2013](#))

En nuestro caso, el uso de vectores lentivirales, va encaminado a la mejora de los islotes induciendo en estos la expresión de una mutación de glucoquinasa cuyo efecto es conocido en humanos y cuyo fenotipo puede suponer una mejora en la función y supervivencia de los islotes trasplantados a largo plazo.

Por lo tanto y para conseguir nuestro objetivo, comenzamos por fabricar nuestra herramienta de trabajo: los distintos vectores virales.

De los datos presentados en este primer bloque de resultados, podemos concluir, que los vectores virales se clonaron sin errores en su secuencia, y que son funcionales, expresando de forma correcta y específica en las células transfectadas tanto la proteína marcadora eGFP, como las proteínas GK o V91L objetos de nuestro trabajo (fig. 19 y 20).

En la figura 19 se aprecia una disminución en el número de células positivas para GK o V91L (según el vector transfectado), respecto al número de células que expresan eGFP en aquellas transfecciones realizadas con el vector control,

esto podría deberse a una bajada en la eficacia de transfección debido a un aumento en el tamaño del vector de expresión viral transfectado. En efecto, el proceso de clonación de las proteínas GK y V91L en el vector de expresión viral, da lugar a que el tamaño de este se incremente en 1398pb (pares de bases), haciendo que el tamaño final sea de 9.494pb, frente a 8.073pb que tendría el vector vacío que sólo expresa eGFP, lo que supone un incremento de aproximadamente un 17% en el tamaño del vector.

## **2. OBTENCIÓN DE LOS LENTIVIRUS.**

La co-transfección de los tres vectores necesarios para la formación de los lentivirus, da lugar a las partículas virales correspondientes, que son tituladas para su uso posterior.

En las imágenes presentadas de las células que se encuentran produciendo virus (fig.22), podemos observar una disminución en el número de células que expresan eGFP, en los cultivos de células productoras de lentivirus GK, con respecto a las células productoras del lentivirus control que solo expresa eGFP, y una disminución aún mayor en las células transfectadas para la producción de lentivirus V91L.

Esta bajada en el porcentaje de células transfectadas, se ve reflejado en una menor producción lentiviral, como podemos observar tanto en la citometría de flujo para la titulación (fig.23), como en la inmunofluorescencia de células infectadas con los distintos lentivirus (fig.24).

Esto puede deberse a dos factores o la combinación de ambos. Por una lado una menor eficiencia en la transfección de los vectores que codifican para GK y V91L, debido a su mayor tamaño, como ya vimos en el apartado anterior. Por otro lado, una posible toxicidad celular por la combinación de un promotor de gran fuerza como el CMV, junto con el efecto de las proteínas GK y V91L per sé.

Esta última posibilidad se ve respaldada por los resultados obtenidos, ya que si se tratara simplemente un problema relacionado con el tamaño del vector en la transfección, no esperaríamos diferencias entre las células transfectadas/infectadas con los vectores codificantes para GK y V91L, ya que su tamaño es idéntico.

Y como podemos comprobar en las figuras 22, 23 y 24, se aprecia una menor expresión, producción viral y por lo tanto posterior infección, en las células que producen el lentivirus V91L-eGFP y son infectadas con el mismo, y aquellas que producen y son infectadas con la versión silvestre de la proteína.

Una vez que se obtuvieron los lentivirus y se infectaron los islotes tanto de ratón como de humano, pasamos a analizar, en el tercer y cuarto bloque de resultados, los distintos aspectos característicos que presentan los individuos con la mutación V91L.

### **3. INFECCIÓN Y ANÁLISIS DE ISLOTES DE LANGERHANS DE RATÓN Y HUMANOS CON LENTIVIRUS.**

#### **3.1. Tamaño de los islotes.**

Como ya hemos explicado, las mutaciones activadoras de la glucoquinasa, producen en los pacientes hipoglucemia familiar con secreción regulada de insulina. Otros genes involucrados cuyas mutaciones son también causantes de hipoglucemias en humanos son el gen *ABCC8* que codifica para el receptor de la sulfonilurea (SUR1) ([Otonkoski et al., 1999](#); [Thomas et al., 1995](#)) y el gen *KCNJ11* que codifica para la subunidad Kir6.2 ([Nestorowicz et al., 1997](#)), ambas, SUR1 y Kir6.2, subunidades de los canales de potasio ATP-dependiente de la célula beta pancreática. Las mutaciones en estos genes son

causante de del 45% de los casos de hipoglucemias en humanos. Además genes como *GLUD1* que codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa ([Stanley et al., 1998](#)), SCHAD HADHSC codificante de la cadena corta de la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa ([Clayton et al., 2001](#)), el gen *SLC16A1* codificante del transportador monocarboxilado MCT1 ([Otonkoski et al., 2007](#)), el factor nuclear hepático 4 alfa y 1 alfa (HNF4A y HNF1A) ([Pearson et al., 2007](#); [Stanescu et al., 2012](#)) y el gen *UCP2* ([Gonzalez-Barroso et al., 2008](#)).

Es importante resaltar que la hipoglucemia causada por estos genes tiene una base fisiopatológica diferente a la hipoglucemia causada por las mutaciones activadoras de *GCK*. En efecto, mientras, como se ha comentado anteriormente, la secreción de insulina en los pacientes portadores de mutaciones activadoras en *GCK* está completamente regulada, de manera que dicha secreción de insulina se suprime cuando la SIEG alcanza su umbral “patológico”, la hipoglucemia causada por mutaciones en el resto de los genes comentados, es debida a una imposibilidad por parte de la célula beta pancreática de suprimir la secreción de insulina, siendo ésta, por tanto, no regulada y causando el cuadro clínico conocido como “hipoglucemia hiperinsulinémica”. No obstante, en clínica, era difícil discriminar el origen genético de las diferentes causas del mismo síntoma, la hipoglucemia. ([Meissner et al., 2009](#))

Una de las principales características morfológicas que distingue a los pacientes con hipoglucemia asociada a mutaciones activadoras de la glucoquinasa del resto de etiologías es el tamaño de los islotes.

Cuando se analizan las biopsias obtenidas de pacientes con mutaciones activadoras de la glucoquinasa, nos encontramos con unos islotes dos veces mayores en tamaño que los de un individuo sano, mientras que en el caso de mutaciones en los canales de potasio o calcio presentan un fenotipo opuesto, es decir, islotes más pequeños de lo normal. ([Cuesta-Munoz et al., 2004](#); [Kassem et al., 2010](#); [Tornovsky-Babeay et al., 2014](#)).

Con esta primera característica comenzamos nuestro análisis de los islotes infectados con los distintos vectores lentivirales.

Se realizó una medición del tamaño de los islotes tras 15 días de infección. Como hemos visto, no existen diferencias significativas entre los tamaños de los islotes sin infectar y los infectados con los distintos vectores virales, esto se repite tanto con los islotes de ratón (fig. 25) como los humanos (fig. 32).

Por lo tanto somos incapaces de reproducir el efecto de la expresión de la glucoquinasa mutada, sobre el tamaño de los islotes, que se observa en los pacientes.

Esto puede deberse a que, obviamente, el genoma de los pacientes porta la secuencia de la glucoquinasa mutada y por lo tanto sus células la expresan, desde su concepción e inicio del desarrollo, mientras que en nuestro modelo, estamos expresando la proteína durante un tiempo corto (comparado con el paciente) y sobre un islote maduro.

Por tanto el hecho de que no veamos diferencias puede deberse, bien al poco tiempo de expresión de la proteína y/o porque la expresión de la glucoquinasa mutada V91L, en los pacientes, puede estar de alguna manera afectando no solo al comportamiento del islote en el órgano maduro, sino también desde el estadio embrionario, que en nuestro caso y por la metodología usada, no podemos comprobar.

Al infectar los islotes una vez formados y durante un periodo de tiempo relativamente corto, no podemos decir que la sola expresión de la proteína V91L baste para que se produzca un incremento en el tamaño de los islotes, que reproduzca lo observado en los pacientes.

### **3.2. Secreción estática de insulina.**

La segunda característica que distingue los casos de hipoglucemia por otras mutaciones, de los asociados a la glucoquinasa es la alteración en la secreción de la insulina. Este punto es de alto interés para nuestro trabajo.

En todos los casos de hipoglucemia, independientemente de su causa genética, se ve incrementada la secreción de insulina por parte del islote, pero como hemos comentado anteriormente, exclusivamente en el caso de las mutaciones activadoras de la glucoquinasa, esta secreción permanece regulada por la glucosa. Es decir, en mutaciones de los canales de potasio, calcio, glutamato deshidrogenasa etc., la secreción de insulina está alterada y es independiente de la concentración de glucosa, mientras que en el caso de la glucoquinasa, aunque el umbral de secreción de insulina se encuentre alterado en mayor o menor medida (según la mutación), siempre continua dependiendo de la concentración de glucosa. ([Christesen et al., 2002](#))

Este punto es fundamental para nuestro estudio, ya que siendo nuestro objetivo la mejora de los islotes a trasplantar, necesitamos islotes más eficaces, pero que sobre todo, que mantengan la regulación por glucosa.

Por tanto nuestro siguiente punto aborda el análisis del comportamiento de los islotes en cuanto a su funcionalidad midiendo su capacidad de secreción de insulina, abordando tanto el umbral de glucosa al que se inicia la secreción de la insulina, como la cantidad de esta que secretan los islotes a distintas concentraciones de glucosa.

Los resultados nos indican que tanto en los islotes de ratón (tabla 4), como los humanos (tabla 5), infectados con los lentivirus que expresaran la proteína mutante V91L, se producen dos fenómenos que también se presentan en los pacientes.

Por un lado una bajada en el umbral de glucosa necesario para que se produzca la secreción de la insulina y por otro lado un incremento en la secreción de esta comparándola con los islotes control (sin infectar o infectados con eGFP) y los infectados con el lentivirus que expresará la glucoquinasa silvestre, aún cuando estos alcanzan su umbral óptimo para la secreción.

De esta manera estamos reproduciendo en parte el fenotipo que presentan los pacientes, unos islotes con una mayor capacidad de secretar insulina y a umbrales más bajos de glucosa.

Recordando cómo afecta la mutación V91L a las características fisiológicas de la proteína glucoquinasa, vemos que una de ellas es el aumento de la afinidad por su sustrato glucosa, ya que el aminoácido al que afecta la mutación se encuentra en el sitio activo de la proteína ([Matschinsky, 2009](#)). El cambio conformacional de la proteína explica los cambios funcionales de la proteína que dan lugar a que la secreción de la insulina se dé a umbrales de concentración de glucosa inferiores a los fisiológicos y a que la cantidad de insulina secretada sea mayor.

Tenemos que destacar que existe una diferencia entre el umbral de secreción observado en los islotes de ratón y humanos infectados con la glucoquinasa mutada. Los primeros tienen el umbral de secreción entorno a 1.1 mM de glucosa, mientras que el umbral de los islotes humanos infectados es algo superior (2.8 mM). Esto puede deberse a que la proteína que estamos expresando en todo momento es la glucoquinasa humana, y puede que su expresión en los islotes de ratón produzca un mayor efecto en la secreción de insulina, mientras que en los islotes humanos tenga un efecto más parecido al que muestran los pacientes cuyo umbral de secreción se encuentra en torno a 1.55 mM. ([Matschinsky, 2009](#))

Continuando con el estudio de las características presentadas en los pacientes analizamos la apoptosis y la proliferación, que en ambos casos se veía incrementada.



### **3.3. Apoptosis.**

Los estudios clínicos realizados sobre los pacientes con hipoglucemia familiar presentan islotes con una tasa de apoptosis superior a los controles ([Kassem et al., 2010](#)). Debido a esto y a largo plazo, lo que inicialmente era un exceso de insulina, termina convirtiéndose en una carencia de esta, por disminución en la población de célula  $\beta$ , y como consecuencia terminan desarrollando diabetes.

Estudios recientes, han demostrado, una relación entre el aumento del metabolismo de la célula  $\beta$  y el aumento de la apoptosis ([Tornovsky-Babeay et al., 2014](#)). Un incremento sostenido en el tiempo de la secreción de insulina (como el que causa la expresión de una mutación activadora de glucoquinasa), produciría un aumento en el estrés oxidativo de la célula  $\beta$ , causando daños en el ADN de las células (roturas de doble cadena) que activaran a su vez la proteína p53, que iniciará el proceso de muerte celular por apoptosis.

Con esta información, en nuestro estudio, analizamos la apoptosis mediante ensayos de TUNEL, en los que se analiza la incorporación de dUTP marcado con fluorescencia, a los extremos 3'-OH del ADN fragmentado. Esto nos permite ver las células apoptóticas marcadas en sus núcleos. En definitiva marcamos aquellas células que contienen roturas de doble cadena en su material genético. De nuevo los resultados de ratón y humanos son coincidentes.

Cuando vemos el análisis de las imágenes obtenidas con los islotes de ratón (fig. 28) y humanos (fig. 38) tras 15 días de cultivos con y sin lentivirus, vemos como se produce un incremento leve aunque significativo de la apoptosis ( $p < 0.001$  para ratón y  $p < 0.05$  para islotes humanos), en los islotes infectados con respecto a los no infectados, y que dicho incremento en la apoptosis, se acentúa cuando observamos los islotes infectados con los lentivirus GCK-eGFP y V91L-eGFP y los comparamos con los control infectados con lentivirus eGFP ( $p < 0.001$  ratón y humano).

Es lógico pensar que el simple hecho de la infección afecte a la viabilidad de las células del islote, como demuestra el incremento de la apoptosis en los islotes infectados con el virus que expresa exclusivamente eGFP frente a los islotes sin infectar. Sobre todo teniendo en cuenta, que debido al bajo título viral obtenido no ha sido posible la concentración y purificación del lentivirus, con lo que cualquier molécula que las células productoras de los virus hayan excretado al medio y pueda inducir apoptosis está ahora interaccionando con los islotes.

A pesar de esto, podemos comprobar (fig. 28 y fig. 38), como si que existe un efecto específico de aumento de la apoptosis en aquellos islotes infectados con los lentivirus que expresaran V91L-eGFP, ya que el aumento en el número de células apoptóticas es visiblemente mayor, aún comparándolo con los islotes infectados con los virus portadores de la versión silvestre de la glucoquinasa ( $p < 0.001$  en ratón y humano).

Esto reproduce el fenotipo descrito en humanos, y puede explicarse de la misma forma. El aumento en el metabolismo de la glucosa de estas células, implica un nivel de estrés oxidativo, que deriva en daño genético, y una mayor muerte celular.

En el caso de los islotes infectados con la glucoquinasa silvestre, se observa un aumento de la apoptosis moderado aunque significativo ( $p < 0.001$ ) respecto al control de islotes infectados con lentivirus eGFP, lo cual puede explicarse pensando que aunque la célula esté infectada y expresando la glucoquinasa, al no tener esta su funcionalidad alterada, no hay un incremento tan grande en el metabolismo celular, por lo que el incremento de la apoptosis se debe a la propia infección lentiviral y no a la expresión de la proteína.

Este último apunte se verá respaldado por los resultados obtenidos para proliferación y que veremos a continuación en el último apartado de la discusión

### **3.4. Proliferación.**

La última de las características fisiológicas de la expresión de la glucoquinasa mutada V91L en los islotes más relevantes que vamos a analizar es la proliferación celular. Volviendo al objetivo de mejorar los islotes de donantes para su trasplante, el hecho de que la masa de célula beta no disminuya a lo largo del tiempo una vez realizado el trasplante es fundamental.

En los resultados de proliferación obtenidos tanto en islotes de ratón como humanos, vemos un incremento de esta, en los islotes infectados con la glucoquinasa mutante V91L. Sin embargo, como ya hemos analizado en el apartado anterior referido a la apoptosis, también se produce un incremento de esta en los mismos islotes.

Resulta curioso que la expresión de una misma proteína en la célula, derive en efectos opuestos como son la muerte celular por apoptosis y la proliferación. En el primer caso, ya vimos que los niveles altos de glucosa en la célula de forma crónica, inducían la apoptosis por la activación de p53 debida a la aparición de roturas de doble cadena en el ADN.

En contraste, varios trabajos describen como la glucoquinasa, también tiene un papel protector frente a la apoptosis interaccionando con proteínas mitocondriales. ([lynedjian, 2009](#); [Kim et al., 2005](#); [Lee et al., 2009](#); [Liu et al., 2009](#)) Y como un descenso en los niveles de esta, deriva en la muerte celular. ([Danial et al., 2003](#); [Porat et al., 2011](#))

También se ha descrito el papel protector frente a la apoptosis que tienen distintos activadores de la glucoquinasa ([Matschinsky and Porte, 2010](#); [Nakamura et al., 2012](#)). Estos activadores, podrían producir en la célula un efecto similar al de la expresión de las mutaciones activadoras de la glucoquinasa.

Referente a mutaciones activadoras de la glucoquinasa, y debido a la escasez de casos diagnosticados, es poco lo que sabemos respecto a cómo se ve afectada la proliferación de la célula  $\beta$ , aunque si está descrito un incremento en el tamaño de los islotes, así como un aumento en la proliferación celular. ([Cuesta-Munoz et al., 2004](#); [Kassem et al., 2010](#); [Tornovsky-Babeay et al., 2014](#))

Parece que puede estar relacionado con los distintos estadios del desarrollo del paciente. La expresión de glucoquinasa mutada (mutación activadora) durante el periodo fetal y neonatal, induciría un aumento en la masa de célula  $\beta$  funcional, mientras que en etapas posteriores del individuo, el daño producido por el mayor metabolismo de la glucosa, terminaría induciendo la apoptosis ya descrita. ([Dadon et al., 2012](#); [Kassem et al., 2000](#)).

En este último apartado veremos los resultados de proliferación analizados mediante la incorporación de BrdU en el caso de ratón y Ki67 para ratón y humanos.

Como vemos en los datos presentados en las figuras 31 (ratón BrdU), 34 (ratón Ki67) y 41 (humano Ki67). La proliferación, no se ve afectada de forma significativa por la infección, ni en el caso de los islotes infectados con el lentivirus control de expresión de eGFP, ni en los islotes que se cultivaron durante 15 días con los lentivirus de expresión de GCK-eGFP.

No así ocurre, en el caso de los islotes de ratón o humanos que se infectaron con los lentivirus que codificaban para la versión mutante de la proteína glucoquinasa.

En este último caso vemos como se produce un incremento significativo ( $p < 0.001$  ratón y  $p < 0.01$  humano) en el número de células marcadas como positivas para proliferación, respecto a los controles negativos, sin infectar e infectados con los virus que codifican para el vector vacío, y respecto a los

islotes infectados con los lentivirus que codifican para la versión silvestre de la proteína ( $p < 0.001$ ).

Estos datos, una vez más, reproducen el fenotipo descrito en los pacientes humanos con esta mutación. ([Kassem et al., 2010](#))

Resumiendo, en este trabajo, en primer lugar, con la utilización del sistema lentiviral, hemos desarrollado una nueva herramienta para la expresión de proteínas en islotes. Y mediante este sistema hemos conseguido reproducir, la mayoría de características fisiopatológicas asociadas a una mutación activadora de la proteína glucoquinasa (V91L).

Esto supone la posibilidad de un nuevo enfoque en la terapia génica/celular. Una opción de mejorar los islotes obtenidos de los donantes cadavéricos, para así optimizar la maquinaria secretora de insulina y el número de islotes necesario para paciente trasplantado.

El escoger una mutación activadora (V91L) cuyos efectos en la célula  $\beta$  son muy patentes, nos ha facilitado el análisis de las consecuencias de su expresión en islotes. Otras mutaciones activadoras de glucoquinasa con umbrales de secreción más cercanos a los de la versión silvestre, podrían posicionarse como buenas alternativas para conseguir una mejor versión de los islotes a trasplantar, ya que minimizarían los inconvenientes de un fenotipo tan extremo como el estudiado en este trabajo.

Además el uso de lentivirus nos aporta una herramienta eficaz para expresar esta u otras proteínas en los islotes sin poner en riesgo su integridad, de esta forma, podemos avanzar en el conocimiento de otros aspectos de la biología del islote (desarrollo, diferenciación...), que no sería posible abordar con otros métodos como los cultivos celulares.

## **VI. CONCLUSIONES**



Con el objeto de generar una herramienta para el estudio de los efectos de la mutación de glucoquinasa V91L, susceptible de usarse para la mejora de la funcionalidad y viabilidad de los trasplantes de islotes a enfermos diabéticos, se generaron lentivirus que permitieran su expresión en islotes.

Las conclusiones de los resultados obtenidos son las siguientes:

1. Se consiguió la formación de lentivirus que expresaran la glucoquinasa silvestre y mutante (V91L) y fueran capaces de infectar islotes de ratón y humanos.
2. La expresión de la glucoquinasa silvestre o mutada (V91L) tras la infección no produce cambios en el tamaño o forma de los islotes infectados.
3. Los islotes infectados, que expresan la glucoquinasa silvestre no ven afectada su capacidad de secretar insulina, ni el umbral de glucosa necesario para ello.
4. Los islotes infectados con lentivirus que expresarán la glucoquinasa mutante V91L, presentan un umbral de glucosa para la secreción de insulina inferior al umbral fisiológico, y una mayor capacidad de secretar insulina que el resto de condiciones de estudio.
5. La infección de los islotes afecta a la viabilidad de estos sin importar el lentivirus con que sean infectados, aunque hay un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en la apoptosis de los islotes infectados con la glucoquinasa V91L.
6. Los análisis en la proliferación nos indican que esta no se ve afectada por la infección lentiviral.
7. La expresión de la glucoquinasa mutada V91L tras la infección produce un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la proliferación en los islotes.



8. Por todos estos datos, podemos concluir que el estudio *“in vitro”* de los efectos sobre islotes de ratón y humanos, de la expresión de la proteína glucoquinasa V91L, puede ser utilizado como paso previo para el uso de esta proteína mutada en terapia génica/celular, para la mejora de la viabilidad y funcionalidad de los trasplantes de islotes.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



(2015). (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care* 38 Suppl, S8-S16.

Agarwal, A., and Brayman, K.L. (2012). Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes. *Seminars in interventional radiology* 29, 90-98.

Alejandro, E.U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Meneur, C., and Bernal-Mizrachi, E. (2015). Natural history of beta-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Molecular aspects of medicine* 42, 19-41.

Andrikopoulos, S., Verchere, C.B., Terauchi, Y., Kadowaki, T., and Kahn, S.E. (2000). beta-cell glucokinase deficiency and hyperglycemia are associated with reduced islet amyloid deposition in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 2056-2062.

Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* 148, 1160-1171.

Athyros, V.G., and Mikhailidis, D.P. (2015). High incidence of metabolic syndrome further increases cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. Implications for everyday practice. *Journal of diabetes and its complications*.

Baltrusch, S., Lenzen, S., Okar, D.A., Lange, A.J., and Tiedge, M. (2001). Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *The Journal of biological chemistry* 276, 43915-43923.

Barbetti, F., Cobo-Vuilleumier, N., Dionisi-Vici, C., Toni, S., Ciampalini, P., Massa, O., Rodriguez-Bada, P., Colombo, C., Lenzi, L., Garcia-Gimeno, M.A., *et al.* (2009). Opposite clinical phenotypes of glucokinase disease: Description of a novel activating mutation and contiguous inactivating mutations in human glucokinase (GCK) gene. *Mol Endocrinol* 23, 1983-1989.

Bassi, R., and Fiorina, P. (2011). Impact of islet transplantation on diabetes complications and quality of life. *Current diabetes reports* 11, 355-363.

Berna, G., Leon-Quinto, T., Ensenat-Waser, R., Montanya, E., Martin, F., and Soria, B. (2001). Stem cells and diabetes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 55, 206-212.

Bourbonais, F.J., Chen, J., Huang, C., Zhang, Y., Pfefferkorn, J.A., and Landro, J.A. (2012). Modulation of glucokinase by glucose, small-molecule activator and glucokinase regulatory protein: steady-state kinetic and cell-based analysis. *The Biochemical journal* 441, 881-887.

Burke, G.W., and Ciancio, G. (2002). Islet cell transplantation: should we use more than one pancreas? *Con. Transplantation proceedings* 34, 1925-1926.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.

Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2334-2339.

Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert, C., Paty, B.W., Koh, A., and Senior, P. (2013). Pancreas and islet transplantation. *Canadian journal of diabetes* 37 *Suppl 1*, S94-96.

Clayton, P.T., Eaton, S., Aynsley-Green, A., Edginton, M., Hussain, K., Krywawych, S., Datta, V., Malingre, H.E., Berger, R., and van den Berg, I.E. (2001). Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *The Journal of clinical investigation* 108, 457-465.

Cuesta-Munoz, A.L., Huopio, H., Otonkoski, T., Gomez-Zumaquero, J.M., Nanto-Salonen, K., Rahier, J., Lopez-Enriquez, S., Garcia-Gimeno, M.A., Sanz, P., Soriguer, F.C., *et al.* (2004). Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes* 53, 2164-2168.

Cullen, K.S., Al-Oanzi, Z.H., O'Harte, F.P., Agius, L., and Arden, C. (2014). Glucagon induces translocation of glucokinase from the cytoplasm to the nucleus of hepatocytes by transfer between 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-2 and the glucokinase regulatory protein. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 1123-1134.

Chou, F.C., Huang, S.H., and Sytwu, H.K. (2012). Genetically engineered islets and alternative sources of insulin-producing cells for treating autoimmune diabetes: quo vadis? *Int J Endocrinol* 2012, 296485.

Christesen, H.B., Jacobsen, B.B., Odili, S., Buettger, C., Cuesta-Munoz, A., Hansen, T., Brusgaard, K., Massa, O., Magnuson, M.A., Shiota, C., *et al.* (2002). The second activating glucokinase mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes* 51, 1240-1246.

Christesen, H.B., Tribble, N.D., Molven, A., Siddiqui, J., Sandal, T., Brusgaard, K., Ellard, S., Njolstad, P.R., Alm, J., Brock Jacobsen, B., *et al.* (2008). Activating glucokinase (GCK) mutations as a cause of medically responsive congenital hyperinsulinism: prevalence in children and characterisation of a

novel GCK mutation. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 159, 27-34.

Dadon, D., Tornovsky-Babaey, S., Furth-Lavi, J., Ben-Zvi, D., Ziv, O., Schyr-Ben-Haroush, R., Stolovich-Rain, M., Hija, A., Porat, S., Granot, Z., *et al.* (2012). Glucose metabolism: key endogenous regulator of beta-cell replication and survival. *Diabetes, obesity & metabolism* 14 *Suppl* 3, 101-108.

Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Datta, S.R., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., *et al.* (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424, 952-956.

Davis, E.A., Cuesta-Munoz, A., Raoul, M., Buettger, C., Sweet, I., Moates, M., Magnuson, M.A., and Matschinsky, F.M. (1999). Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia* 42, 1175-1186.

Dezaki, K., and Yada, T. (2012). Islet beta-Cell Ghrelin Signaling for Inhibition of Insulin Secretion. *Methods Enzymol* 514, 317-331.

Dorr, C., Zaparty, M., Tjaden, B., Brinkmann, H., and Siebers, B. (2003). The hexokinase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*. ATP-dependent hexokinases and ADP-dependent glucokinases, two alternatives for glucose phosphorylation in Archaea. *The Journal of biological chemistry* 278, 18744-18753.

Fajans, S.S., Bell, G.I., and Polonsky, K.S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *The New England journal of medicine* 345, 971-980.

Froguel, P., Vaxillaire, M., Sun, F., Velho, G., Zouali, H., Butel, M.O., Lesage, S., Vionnet, N., Clement, K., Fougerousse, F., *et al.* (1992). Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356, 162-164.

Giannoukakis, N., Mi, Z., Gambotto, A., Eramo, A., Ricordi, C., Trucco, M., and Robbins, P. (1999). Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene therapy* 6, 1545-1551.

Gill, D., Brocklehurst, K.J., Brown, H.W., and Smith, D.M. (2011). Upregulation of beta-cell genes and improved function in rodent islets following chronic glucokinase activation. *Journal of molecular endocrinology* 47, 59-67.

Glaser, B., Kesavan, P., Heyman, M., Davis, E., Cuesta, A., Buchs, A., Stanley, C.A., Thornton, P.S., Permutt, M.A., Matschinsky, F.M., *et al.* (1998). Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *The New England journal of medicine* 338, 226-230.

Gloyn, A.L. (2003). Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Human mutation* 22, 353-362.

Gloyn, A.L., Noordam, K., Willemsen, M.A., Ellard, S., Lam, W.W., Campbell, I.W., Midgley, P., Shiota, C., Buettger, C., Magnuson, M.A., *et al.* (2003). Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations. *Diabetes* 52, 2433-2440.

Gonzalez-Barroso, M.M., Giurgea, I., Bouillaud, F., Anedda, A., Bellanne-Chantelot, C., Hubert, L., de Keyzer, Y., de Lonlay, P., and Ricquier, D. (2008). Mutations in UCP2 in congenital hyperinsulinism reveal a role for regulation of insulin secretion. *PloS one* 3, e3850.

Gorman, T., Hope, D.C., Brownlie, R., Yu, A., Gill, D., Lofvenmark, J., Wedin, M., Mayers, R.M., Snaith, M.R., and Smith, D.M. (2008). Effect of high-fat diet on glucose homeostasis and gene expression in glucokinase knockout mice. *Diabetes, obesity & metabolism* 10, 885-897.

Grupe, A., Hultgren, B., Ryan, A., Ma, Y.H., Bauer, M., and Stewart, T.A. (1995). Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* 83, 69-78.

Guo, T., Mao, Y., Li, H., Wang, X., Xu, W., Song, R., Jia, J., Lei, Z., Irwin, D.M., Niu, G., *et al.* (2012). Characterization of the gene expression profile of heterozygous liver-specific glucokinase knockout mice at a young age. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 66, 587-596.

Hattersley, A.T., Turner, R.C., Permutt, M.A., Patel, P., Tanizawa, Y., Chiu, K.C., O'Rahilly, S., Watkins, P.J., and Wainscoat, J.S. (1992). Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 339, 1307-1310.

Hebrok, M. (2012). Generating beta Cells from Stem Cells-The Story So Far. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a007674.

Heimberg, H., De Vos, A., Moens, K., Quartier, E., Bouwens, L., Pipeleers, D., Van Schaffingen, E., Madsen, O., and Schuit, F. (1996). The glucose sensor protein glucokinase is expressed in glucagon-producing alpha-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7036-7041.

Heredia, V.V., Carlson, T.J., Garcia, E., and Sun, S. (2006). Biochemical basis of glucokinase activation and the regulation by glucokinase regulatory protein in naturally occurring mutations. *The Journal of biological chemistry* 281, 40201-40207.

Hossain, P., Kavar, B., and El Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *The New England journal of medicine* 356, 213-215.

Huang, M., Lu, S., Shi, T., Zhao, Y., Chen, Y., Li, X., Liu, X., Huang, Z., and Zhang, J. (2013). Conformational transition pathway in the activation process of allosteric glucokinase. *PLoS one* 8, e55857.

Hussain, K. (2010). Mutations in pancreatic  $\beta$ -cell Glucokinase as a cause of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and neonatal diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 11, 179-183.

Ilyedjian, P.B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *The Biochemical journal* 293 ( Pt 1), 1-13.

Ilyedjian, P.B. (2009). Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* 66, 27-42.

Janikiewicz, J., Hanzelka, K., Kozinski, K., Kolczynska, K., and Dobrzyn, A. (2015). Islet beta-cell failure in type 2 diabetes--Within the network of toxic lipids. *Biochemical and biophysical research communications* 460, 491-496.

Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J., and Nagata, Y. (2004). Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12, 429-438.

Kaminski, M.T., Schultz, J., Waterstradt, R., Tiedge, M., Lenzen, S., and Baltrusch, S. (2014). Glucose-induced dissociation of glucokinase from its regulatory protein in the nucleus of hepatocytes prior to nuclear export. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 554-564.

Karvonen, M., Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., Libman, I., LaPorte, R., and Tuomilehto, J. (2000). Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes care* 23, 1516-1526.

Kassem, S., Bhandari, S., Rodriguez-Bada, P., Motaghedi, R., Heyman, M., Garcia-Gimeno, M.A., Cobo-Vuilleumier, N., Sanz, P., Maclaren, N.K., Rahier, J., *et al.* (2010). Large islets, beta-cell proliferation, and a glucokinase mutation. *The New England journal of medicine* 362, 1348-1350.



Kassem, S.A., Ariel, I., Thornton, P.S., Scheimberg, I., and Glaser, B. (2000). Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 49, 1325-1333.

Kekalainen, P., Sarlund, H., and Laakso, M. (2000). Long-term association of cardiovascular risk factors with impaired insulin secretion and insulin resistance. *Metabolism: clinical and experimental* 49, 1247-1254.

Kesavan, P., Wang, L., Davis, E., Cuesta, A., Sweet, I., Niswender, K., Magnuson, M.A., and Matschinsky, F.M. (1997). Structural instability of mutant beta-cell glucokinase: implications for the molecular pathogenesis of maturity-onset diabetes of the young (type-2). *The Biochemical journal* 322 ( Pt 1), 57-63.

Khalaileh, A., Gonen-Gross, T., Magenheim, J., Nir, T., Porat, S., Salpeter, S., Stolovich-Rain, M., Swisa, A., Weinberg, N., and Dor, Y. (2008). Determinants of pancreatic beta-cell regeneration. *Diabetes, obesity & metabolism* 10 Suppl 4, 128-135.

Kim, W.H., Lee, J.W., Suh, Y.H., Hong, S.H., Choi, J.S., Lim, J.H., Song, J.H., Gao, B., and Jung, M.H. (2005). Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54, 2602-2611.

Kulkarni, R.N. (2004). The islet beta-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 365-371.

Larion, M., and Miller, B.G. (2012). Homotropic allosteric regulation in monomeric mammalian glucokinase. *Archives of biochemistry and biophysics* 519, 103-111.

Lee, J.W., Kim, W.H., Lim, J.H., Song, E.H., Song, J., Choi, K.Y., and Jung, M.H. (2009). Mitochondrial dysfunction: glucokinase downregulation lowers interaction of glucokinase with mitochondria, resulting in apoptosis of pancreatic beta-cells. *Cellular signalling* 21, 69-78.

Liu, S., Okada, T., Assmann, A., Soto, J., Liew, C.W., Bugger, H., Shirihai, O.S., Abel, E.D., and Kulkarni, R.N. (2009). Insulin signaling regulates mitochondrial function in pancreatic beta-cells. *PloS one* 4, e7983.

MacKinnon, M. (1999). Type 2 diabetes. *Nursing standard* 14, 39-45; quiz 46.

Mahalingam, B., Cuesta-Munoz, A., Davis, E.A., Matschinsky, F.M., Harrison, R.W., and Weber, I.T. (1999). Structural model of human glucokinase in complex with glucose and ATP: implications for the mutants that cause hypo- and hyperglycemia. *Diabetes* 48, 1698-1705.

Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M.A., Tanizawa, Y., Jetton, T.L., *et al.* (1993). Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *The Journal of clinical investigation* 92, 2092-2098.

Matschinsky, F.M. (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 51 Suppl 3, S394-404.

Matschinsky, F.M. (2009). Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8, 399-416.

Matschinsky, F.M., Magnuson, M.A., Zelent, D., Jetton, T.L., Doliba, N., Han, Y., Taub, R., and Grimsby, J. (2006). The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55, 1-12.

Matschinsky, F.M., and Porte, D. (2010). Glucokinase activators (GKAs) promise a new pharmacotherapy for diabetics. *F1000 Med Rep* 2.

Meirelles Junior, R.F., Salvalaggio, P., and Pacheco-Silva, A. (2015). Pancreas transplantation: review. *Einstein* 13, 305-309.

Meissner, T., Beinbrech, B., and Mayatepek, E. (1999). Congenital hyperinsulinism: molecular basis of a heterogeneous disease. *Human mutation* 13, 351-361.

Meissner, T., Marquard, J., Cobo-Vuilleumier, N., Maringa, M., Rodriguez-Bada, P., Garcia-Gimeno, M.A., Baixeras, E., Weber, J., Olek, K., Sanz, P., *et al.* (2009). Diagnostic difficulties in glucokinase hyperinsulinism. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 41, 320-326.

Nakamura, A., Togashi, Y., Orime, K., Sato, K., Shirakawa, J., Ohsugi, M., Kubota, N., Kadowaki, T., and Terauchi, Y. (2012). Control of beta cell function and proliferation in mice stimulated by small-molecule glucokinase activator under various conditions. *Diabetologia* 55, 1745-1754.

Nakayama, H., Kato, T., Nakayama, S., Kaku, H., Muraishi, K., Tokubuchi, I., Hara, K., Kato, T., Wada, N., Tsuruta, M., *et al.* (2015). Cross-sectional and Longitudinal Analyses of Factors Contributing to the Progressive Loss of the beta-cell Function in Type 2 Diabetes. *Internal medicine* 54, 1971-1976.

Ndisang, J.F., Rastogi, S., and Vannacci, A. (2015). Insulin Resistance, Type 1 and Type 2 Diabetes, and Related Complications 2015. *Journal of diabetes research* 2015, 234135.

Nestorowicz, A., Inagaki, N., Gonoj, T., Schoor, K.P., Wilson, B.A., Glaser, B., Landau, H., Stanley, C.A., Thornton, P.S., Seino, S., *et al.* (1997). A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism. *Diabetes* **46**, 1743-1748.

Njolstad, P.R., Sovik, O., Cuesta-Munoz, A., Bjorkhaug, L., Massa, O., Barbetti, F., Undlien, D.E., Shiota, C., Magnuson, M.A., Molven, A., *et al.* (2001). Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *The New England journal of medicine* **344**, 1588-1592.

Ogunnowo-Bada, E.O., Heeley, N., Brochard, L., and Evans, M.L. (2014). Brain glucose sensing, glucokinase and neural control of metabolism and islet function. *Diabetes, obesity & metabolism* **16 Suppl 1**, 26-32.

Osbak, K.K., Colclough, K., Saint-Martin, C., Beer, N.L., Bellanne-Chantelot, C., Ellard, S., and Gloyn, A.L. (2009). Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Human mutation* **30**, 1512-1526.

Osundiji, M.A., Lam, D.D., Shaw, J., Yueh, C.Y., Markkula, S.P., Hurst, P., Colliva, C., Roda, A., Heisler, L.K., and Evans, M.L. (2012). Brain glucose sensors play a significant role in the regulation of pancreatic glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* **61**, 321-328.

Otonkoski, T., Ammala, C., Huopio, H., Cote, G.J., Chapman, J., Cosgrove, K., Ashfield, R., Huang, E., Komulainen, J., Ashcroft, F.M., *et al.* (1999). A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy in Finland. *Diabetes* **48**, 408-415.

Otonkoski, T., Jiao, H., Kaminen-Ahola, N., Tapia-Paez, I., Ullah, M.S., Parton, L.E., Schuit, F., Quintens, R., Sipila, I., Mayatepek, E., *et al.* (2007). Physical exercise-induced hypoglycemia caused by failed silencing of monocarboxylate transporter 1 in pancreatic beta cells. *American journal of human genetics* **81**, 467-474.

Pearson, E.R., Boj, S.F., Steele, A.M., Barrett, T., Stals, K., Shield, J.P., Ellard, S., Ferrer, J., and Hattersley, A.T. (2007). Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS medicine* **4**, e118.

Pedelini, L., Garcia-Gimeno, M.A., Marina, A., Gomez-Zumaquero, J.M., Rodriguez-Bada, P., Lopez-Enriquez, S., Soriguer, F.C., Cuesta-Munoz, A.L., and Sanz, P. (2005). Structure-function analysis of the alpha5 and the alpha13 helices of human glucokinase: description of two novel activating mutations. *Protein Sci* **14**, 2080-2086.

Peters, A.L. (2000). The clinical implications of insulin resistance. *The American journal of managed care* 6, S668-674; discussion S675-681.

Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Dadon, D., Granot, Z., Ben-Hur, V., White, P., *et al.* (2011). Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell metabolism* 13, 440-449.

Postic, C., Shiota, M., and Magnuson, M.A. (2001). Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 56, 195-217.

Postic, C., Shiota, M., Niswender, K.D., Jetton, T.L., Chen, Y., Moates, J.M., Shelton, K.D., Lindner, J., Cherrington, A.D., and Magnuson, M.A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 305-315.

Prado, C.L., Pugh-Bernard, A.E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., and Sussel, L. (2004). Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2924-2929.

Printz, R.L., Magnuson, M.A., and Granner, D.K. (1993). Mammalian glucokinase. *Annual review of nutrition* 13, 463-496.

Sabin, M.A., Kao, K.T., Juonala, M., Baur, L.A., and Wake, M. (2015). Viewpoint article: Childhood obesity--looking back over 50 years to begin to look forward. *Journal of paediatrics and child health* 51, 82-86.

Sayed, S., Langdon, D.R., Odili, S., Chen, P., Buettger, C., Schiffman, A.B., Suchi, M., Taub, R., Grimsby, J., Matschinsky, F.M., *et al.* (2009). Extremes of clinical and enzymatic phenotypes in children with hyperinsulinism caused by glucokinase activating mutations. *Diabetes* 58, 1419-1427.

Shapiro, A.M. (2012). Islet transplantation in type 1 diabetes: ongoing challenges, refined procedures, and long-term outcome. *The review of diabetic studies : RDS* 9, 385-406.

Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., and Rajotte, R.V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England journal of medicine* 343, 230-238.

Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiu, E., Calle-Pascual, A., Carmena, R., Casamitjana, R., Castano, L., Castell, C., Catala, M., *et al.*

(2012). Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 55, 88-93.

Stanescu, D.E., Hughes, N., Kaplan, B., Stanley, C.A., and De Leon, D.D. (2012). Novel presentations of congenital hyperinsulinism due to mutations in the MODY genes: HNF1A and HNF4A. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97, E2026-2030.

Stanley, C.A., Lieu, Y.K., Hsu, B.Y., Burlina, A.B., Greenberg, C.R., Hopwood, N.J., Perlman, K., Rich, B.H., Zammarchi, E., and Poncz, M. (1998). Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *The New England journal of medicine* 338, 1352-1357.

Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., *et al.* (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 117, 246-257.

Thomas, P.M., Cote, G.J., Wohlk, N., Haddad, B., Mathew, P.M., Rabl, W., Aguilar-Bryan, L., Gagel, R.F., and Bryan, J. (1995). Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268, 426-429.

Tornovsky-Babeay, S., Dadon, D., Ziv, O., Tzipilevich, E., Kadosh, T., Schyr-Ben Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Furth-Lavi, J., Granot, Z., *et al.* (2014). Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in beta cells. *Cell metabolism* 19, 109-121.

Toyoda, Y., Yoshie, S., Fujita, T., Ito, Y., Nonogaki, T., and Miwa, I. (1997). Glucokinase is located in secretory granules of pancreatic D-cells. *FEBS letters* 415, 281-284.

Wabitsch, M., Lahr, G., Van de Bunt, M., Marchant, C., Lindner, M., von Puttkamer, J., Fenneberg, A., Debatin, K.M., Klein, R., Ellard, S., *et al.* (2007). Heterogeneity in disease severity in a family with a novel G68V GCK activating mutation causing persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 24, 1393-1399.

Weir, G.C., Cavelti-Weder, C., and Bonner-Weir, S. (2011). Stem cell approaches for diabetes: towards beta cell replacement. *Genome medicine* 3, 61.

Zaldumbide, A., Alkemade, G., Carlotti, F., Nikolic, T., Abreu, J.R., Engelse, M.A., Skowera, A., de Koning, E.J., Peakman, M., Roep, B.O., *et al.* (2013). Genetically engineered human islets protected from CD8-mediated autoimmune

destruction in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21, 1592-1601.

Zelent, B., Odili, S., Buettger, C., Zelent, D.K., Chen, P., Fenner, D., Bass, J., Stanley, C., Laberge, M., Vanderkooi, J.M., *et al.* (2011). Mutational analysis of allosteric activation and inhibition of glucokinase. *The Biochemical journal* 440, 203-215.

Este trabajo ha sido presentado en:

- *Workshop, Programming Beta Cell Development, Impairment and Regeneration*. Octubre 2011. Elsinore, Dinamarca.  
“*Replication of beta cell proliferation without cell dedifferentiation in islet containing the naturally occurring activating glucokinasa mutation V91L. Implications for cell therapy*”.  
Martín F., Navarro M., Araujo R., Vázquez-Puertas C., Baixeras E., Gómez-Huelgas R., Repice M., Dominguez-Bendala J., Bernad A., Cuesta-Muñoz A.
- *Keyston Symposia, Advances in Islet Biology*. Marzo 2012. California, E.E.U.U.  
“*Beta cell proliferation without cell dedifferentiation in islet containing the naturally occurring activating glucokinasa gene (GCK) mutation V91L*”.  
Martín F., Navarro M., Araujo R., Vázquez C., Baixeras E., Gómez R., Repice M., Izarra A., Rodríguez N., Dominguez-Bendala J., Bernad A., Cuesta-Muñoz A.
- *The European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual meeting*. Octubre 2012. Berlín, Alemania.  
“*Highly efficient pancreatic mouse islets due to activating glucokinasa gene mutations: lessons from human models*”.  
Martín F., Navarro M., Araujo R., Vázquez C., Baixeras E., Gómez R., Repice M., Izarra A., Rodríguez N., Dominguez-Bendala J., Bernad A., Cuesta-Muñoz A.
- *The European Association for the Study of Diabetes (EASD). Islet study group symposium*. Octubre 2012. Rostock, Alemania.  
“*Highly efficient pancreatic human islets due to activating glucokinasa gene mutations: lessons from human models*”.  
Cuesta-Muñoz A., Navarro M., Araujo R., Gómez R., Repice M., Izarra A., Rodríguez N., Dominguez-Bendala J., Bernad A., Martín F.
- *Beta Cell Workshop*. Abril 2013. Kioto, Japón.  
“*Highly efficient pancreatic human islets due to activating glucokinasa gene mutations: lessons from human models*”.  
Martín F., Navarro M., Araujo R., Gómez R., Repice M., Izarra A., Rodríguez N., Dominguez-Bendala J., Bernad A., Cuesta-Muñoz A.