

4. Regulación de la expresión génica por glucosa

MARTA CASADO PINNA

1. LA GLUCOSA, REGULADOR UNIVERSAL DE LA FUNCIÓN GÉNICA

Una característica esencial de la vida de todo organismo es la adaptación constante de su metabolismo al entorno nutricional. La regulación del metabolismo implica no sólo una rápida modulación en la actividad de proteínas específicas, sino también un control de su síntesis a través de la regulación transcripcional de sus genes. A lo largo de la evolución es probable que los primeros fenómenos de control transcripcional aparecieran para perfeccionar la homeostasis celular en un medio exterior inestable en el momento en que la simple regulación, según la ley de acción de masas y la regulación de tipo alostérico se volvieron insuficientes. La glucosa, el monosacárido más abundante en la naturaleza, proporciona un buen ejemplo de cómo los organismos han desarrollado mecanismos que les permitan hacer frente a una disponibilidad de nutrientes variable. La regulación de la expresión génica dependiente de glucosa ha sido particularmente bien estudiada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En este organismo la glucosa reprime la transcripción de toda una serie de genes responsables de la respiración, de la utilización de otras fuentes de carbono (galactosa, maltosa, sacarosa) y de genes que codifican enzimas de la vía gluconeogénica. Por el contrario, la glucosa es capaz de inducir genes implicados en su propio metabolismo, especialmente genes que codifican transportadores de glucosa y enzimas de la glucólisis [1]. Fenómenos de este tipo podemos encontrarlos en todos los microorganismos, archaeobacterias, eubacterias o eucariotas monocelulares. En mamíferos, la respuesta a la glucosa es más compleja, ya que combina los efectos relacionados al metabolismo *per se* del azúcar con aquellos derivados de las modificaciones hormonales dependientes de glucosa, principalmente la estimula-

ción pancreática de la secreción de insulina y la inhibición de la secreción de glucagón. Durante decenios las investigaciones sobre la regulación génica se focalizaron sobre los mecanismos de acción hormonal, ignorando el papel modulador de los nutrientes. De este modo, hasta 1980, el papel de la glucosa y sus metabolitos se limitaba a la estimulación de la secreción y expresión del gen de la insulina y su actuación en el metabolismo intermediario como sustratos, productos o efectores alostéricos, todas ellas regulaciones a corto plazo. En cambio, las adaptaciones a largo plazo, es decir, la inducción génica, se atribuía a la acción de la insulina. Sin embargo, a través del cultivo primario de hepatocitos, se ha demostrado que los nutrientes desempeñan por sí mismos un papel importante en la regulación de la expresión génica. Trataremos en esta revisión de mostrar el progreso hecho en la comprensión de las bases moleculares de la inducción génica por glucosa, tomando como modelo los genes hepáticos implicados en la vía glucolítica/lipogénica (Fig. 1). Actualmente, esta clase de genes son el más claro ejemplo de la regulación de la expresión génica en respuesta a cambios en la dieta, integrando mecanismos dependientes tanto de hormonas como de nutrientes.

2. LA TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL A LA MAQUINARIA TRANSCRIPCIONAL

La glucosa entra en el hígado por un mecanismo de transporte facilitado utilizando el transportador de glucosa GLUT-2. Este transportador se caracteriza por su baja afinidad por la glucosa y por una velocidad de transporte alta y simétrica, es decir, idéntica en el sentido de entrada y salida de glucosa. Esta última propiedad es la que explica la importancia de la expresión de GLUT-2 en tejidos secretores de glucosa, permitiendo un rápido equilibrio entre las concentraciones intracelulares y extracelulares de glucosa, en particular en condiciones gluconeogénicas. Experimentos realizados en líneas celulares de hepatoma desprovistas de GLUT-2 y cultivadas en ausencia de glucosa o en animales knock out para dicho transportador mantenidos en ayuno, mostraron que en ausencia de GLUT-2, la expresión de genes dependientes de glucosa, como el gen hepático de la piruvato quinasa (PK-L), era constitutiva [2, 3]. Estos resultados ilustran la importancia de las propiedades cinéticas del transportador, de tal modo que en ausen-

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR GLUCOSA

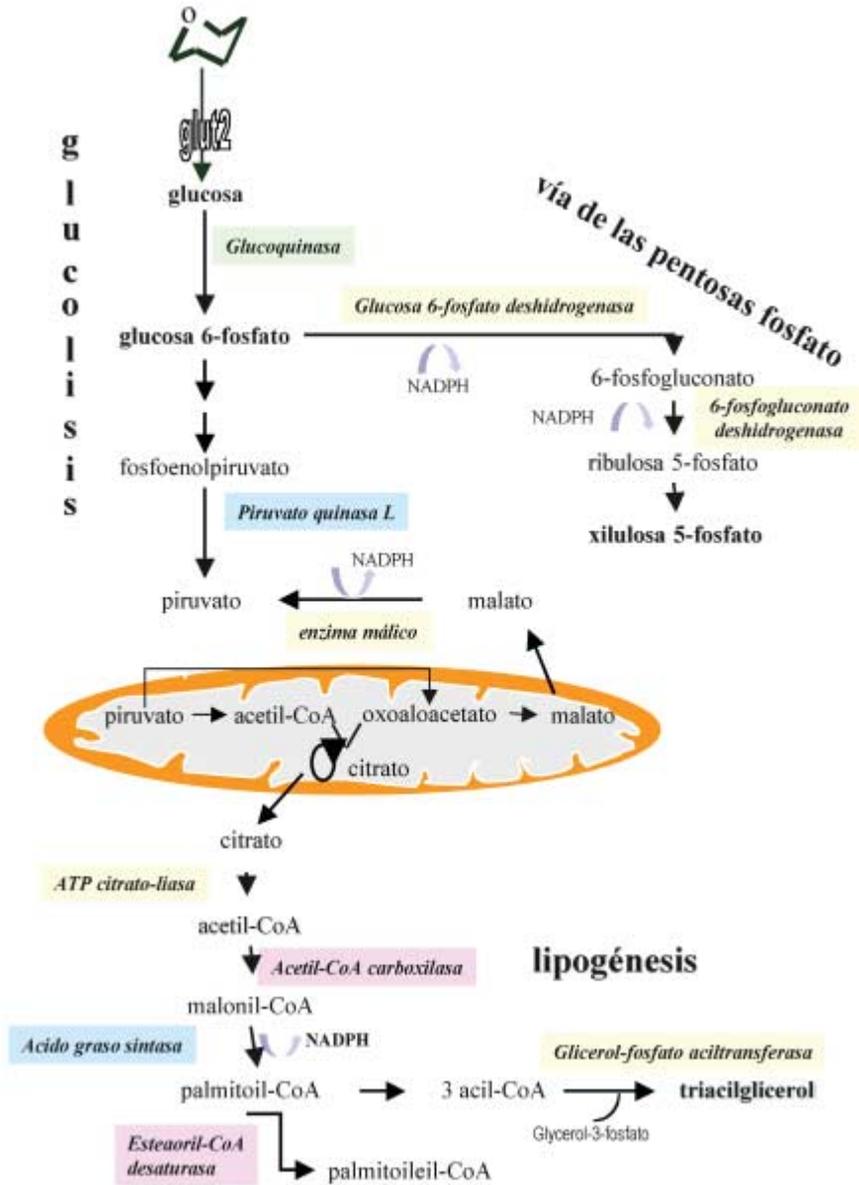


FIGURA 1. Esquema de las etapas principales de las vías glucolítica/liogénica y de las pentosas fosfato en el hígado. La expresión de los enzimas presentes en el esquema se induce a nivel transcripcional por una dieta rica en carbohidratos. Activadores conocidos de la transcripción: verde: insulina (mediado por SREBP-1c) y glucosa (mediado por ChREBP); azul: insulina (mediado por SREBP-1c) y glucosa; rosa: insulina (mediado por SREBP-1c) y glucosa; amarillo: SREBP-1c.

cia del mismo la concentración intracelular de glucosa se mantiene elevada, explicando la continua estimulación de los genes gluco-sensibles y la consiguiente pérdida de la respuesta a glucosa. La inducción de la síntesis de GLUT-2 restablece de nuevo la respuesta génica dependiente de glucosa.

En la levadura, dos miembros de la gran familia de transportadores de hexosas, *Snf3* y *Rgt2*, generan tanto la señal de inducción de la expresión de genes dependientes de glucosa como la de los propios transportadores del azúcar [4]. Aunque no se conoce el mecanismo molecular que permite la transmisión de la señal, se ha puesto de manifiesto la importancia del dominio citosólico de los sensores en la generación de la señal de presencia de glucosa [5]. En mamíferos, Guillemain y colaboradores sugirieron igualmente que el gran bucle citoplasmático de GLUT-2 podría jugar también un papel en la transducción de señal de la glucosa desde la membrana plasmática al núcleo [6]. En este sentido, cabe indicar que la sobreexpresión de este dominio en células de hepatoma de ratón mhAT3F elimina la respuesta a glucosa [2].

Después de su entrada en el hígado, la glucosa debe ser metabolizada para generar una señal intracelular que permita la regulación transcripcional. El primer paso de su metabolismo es la fosforilación por la glucoquinasa (GK), generando glucosa 6-fosfato (Glu-6P). El metabolismo de la glucosa, vía GK, es esencial para la máxima inducción de la expresión hepática de genes glucolítico/lipogénicos, como lo demuestra un trabajo reciente en ratones deficientes en GK en los que la expresión de esos genes no se induce por una dieta rica en carbohidratos [7]. El metabolito exacto que transmite la señal no ha sido aún claramente identificado. Para que un metabolito sea considerado como la molécula que transmita la señal de la glucosa, debe cumplir como requisito que su concentración varíe proporcionalmente a la concentración extracelular de glucosa. Hay varias líneas de evidencias que demuestran que dicho papel es llevado a cabo por la Glu-6P: (i) En líneas celulares de insulinoma y en tejido adiposo, el efecto inductor de la glucosa sobre la expresión génica es mimetizado por 2-deoxiglucosa, un análogo del monosacárido que tras su fosforilación a 2-deoxiglucosa-6-fosfato se acumula en el interior de la célula [8, 9]; y (ii) la concentración y cinética de acumulación intracelular de Glu-6P varía en paralelo a la expresión génica [10]. Otra argumentación a favor de la Glu-6P como

mediador de la señal de glucosa es el hecho de que en la rata la inhibición *in vivo* de la glucosa 6-fosfatasa, que conlleva una acumulación hepática de Glu-6P, conduce a una aguda estimulación de la lipogénesis y el desarrollo de esteatosis hepática [11].

La Glu-6P participa posteriormente en varias vías metabólicas (síntesis de glucógeno, glucolisis, la vía de las pentosas fosfato y la síntesis de hexosaminas). Varios grupos han puesto de manifiesto el papel de un metabolito de la vía de las pentosas fosfato en la señalización por glucosa. Doiron y colaboradores mostraron que el xilitol, un alcohol que en la célula es rápidamente metabolizado a xilulosa 5-fosfato (Xu-5P), era capaz de mimetizar el efecto de la glucosa en la regulación de la expresión génica a concentraciones insuficientes para modificar significativamente los niveles intracelulares de Glu-6P [12]. Los efectos del xilitol sobre la inducción de gen de la glucosa 6-fosfatasa también han sido descritos *in vivo*. La inducción se correlacionó con un aumento en la concentración de Xu-5P sin cambios en la concentración de Glu-6P [13]. Sin embargo, trabajos realizados por el grupo del doctor Ferré han mostrado que en hepatocitos cultivados en presencia de glucosa, xilitol o dihidroxiacetona, no hubo un paralelismo entre los niveles de Xu-5P y la inducción de la expresión de genes lipogénicos. Además, el xilitol incrementó de una manera dosis dependiente la concentración de Glu-6P [10]. Nuestro laboratorio, en colaboración con el grupo de la doctora Cascante (Universidad Autónoma, Barcelona) está llevando a cabo actualmente una serie de trabajos para elucidar si la vía de las pentosas fosfato aporta realmente el metabolito intermediario en la regulación de la expresión génica por glucosa.

La transmisión de la señal de glucosa a la maquinaria transcripcional implica una serie de cascadas de fosforilación/defosforilación. Cuando disminuyen los niveles de glucosa en sangre, se produce un aumento concomitante de glucagón, lo que supone un incremento en los niveles de AMP cíclico (AMPC) en los hepatocitos. Este aumento en este segundo mensajero lleva consigo la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPC (PKA), que fosforila e inactiva enzimas o factores de transcripción claves en el metabolismo hepático de carbohidratos como, por ejemplo, el enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa2) y la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) [14, 15]. Se ha demostrado tam-

bién la implicación de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) en la transmisión de la señal. AMPK es una serina-treonina quinasa activada por cualquier estrés que disminuya el contenido celular de ATP, como puede ser la hipoxia o la privación de nutrientes. AMPK es un complejo heterotrimérico compuesto de una subunidad catalítica (α), y dos subunidades reguladoras (β y γ) [16]. AMPK, al igual que el complejo Snf1, su homólogo en levadura, es capaz de modular la expresión génica. La activación de AMPK en hepatocitos en cultivo primario, bien mediante el uso de AICAR (5-amino-4-imidazole-decarboxamida ribósido), que se transforma en la célula en un análogo del AMP, o mediante la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de la quinasa, inhibe la expresión de genes inducidos por glucosa/insulina, como la ácido graso sintasa (FAS), piruvato quinasa hepática (PK-L) o Spot 14 (S14) [17]. La inhibición por AMPK de la expresión de genes glucolítico/lipogénicos, así como genes implicados en la producción hepática de glucosa se alcanza a través de la modulación de la actividad de factores de transcripción, como la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP)-1c, el factor ChREBP, HNF4 α (factor nuclear hepático 4 α) o proteínas forkhead [18-21]. La inhibición de la actividad AMPK, mediante formas dominantes negativas de la quinasa, no implica una inducción de genes gluco-sensibles en condiciones de baja glucosa [22]. Por lo tanto, si bien la activación de la AMPK inhibe la transcripción génica por insulina y glucosa, en el hígado la AMPK no está involucrada en la activación de la expresión génica.

En relación a los mecanismos de defosforilación, los trabajos realizados por el grupo del doctor Uyeda sugieren que una serina-treonina proteín-fosfatasa 2A (PP2A) activada por Xu-5P es responsable de la activación de la transcripción de genes implicados en la vía glucolítica/lipogénica. De los resultados obtenidos por estos autores se deduce que tras la ingesta de una comida rica en carbohidratos, el incremento en los niveles de Xu-5P activa la proteína PP2A que a su vez activa la síntesis de fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂) por defosforilación del enzima implicado en su síntesis, PFK-2/FBPasa2. Esta defosforilación provoca la activación de la fosfofructoquinasa por incremento en los niveles de Fru-2,6-P₂ su más potente activador [23]. Además del enzima bifuncional, PP2A es capaz de regular la transcripción de genes implicados en la vía glucolítica/lipogénica a través de la defosforilación del factor ChREBP lo que modula, como veremos más adelante del capítulo, la

localización nuclear de este factor [15]. Estos resultados apuntan nuevamente a Xu-5P como el metabolito transmisor de la señal de glucosa a la maquinaria transcripcional.

3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR INSULINA: EL PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SREBP-1C

La insulina es la principal hormona que controla los distintos programas metabólicos que permiten a los organismos vivos adaptar su metabolismo al ambiente nutricional. Se ha postulado que la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP)-1c es un mediador central en las acciones genómicas de la insulina en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, principalmente a nivel de hígado y tejido adiposo [24].

SREBPs son una familia de factores de transcripción implicados originalmente en la regulación de genes por colesterol [25]. Se han descrito hasta la fecha tres miembros de esta familia: SREBP-1a y 1c, y SREBP-2. Las formas 1a y 1c surgen de un único gen (*SREBF1*) por el uso alternativo de dos promotores, y difieren en su primer exón y, en el caso de humanos, también en los dos últimos exones [26]. SREBP-1c se expresa en la mayor parte de tejidos, especialmente en hígado, tejido adiposo blanco, glándula adrenal, cerebro y músculo esquelético. Por el contrario, SREBP-1a se expresa en tejidos altamente proliferativos como bazo e intestino [27]. Al igual que los otros miembros de la familia SREBP, el factor SREBP-1c es sintetizado como una forma precursora que se encuentra anclada al retículo endoplásmico y a la membrana nuclear. En su estructura se pueden distinguir tres regiones fundamentales: (i) Un fragmento aminoterminal, que es realmente un factor de transcripción de la familia b/HLH/LZ (básico/hélice-bucle-hélice/cremallera de leucina); la presencia de un residuo de tirosina en la región básica del motivo bHLH le permite, a diferencia de otros miembros de esta familia de factores de transcripción, unirse tanto a secuencias SRE (sterol-regulatory elements; 5'-TCACCCCCAC-3') como a «cajas E» (5'-CANNTG-3') [28]; (ii) Un dominio central que contiene dos regiones transmembrana separadas por 31 aminoácidos situados en el lumen del retículo endoplásmico; y (iii) Un dominio carboxiterminal regulador [29] (Fig. 2A).

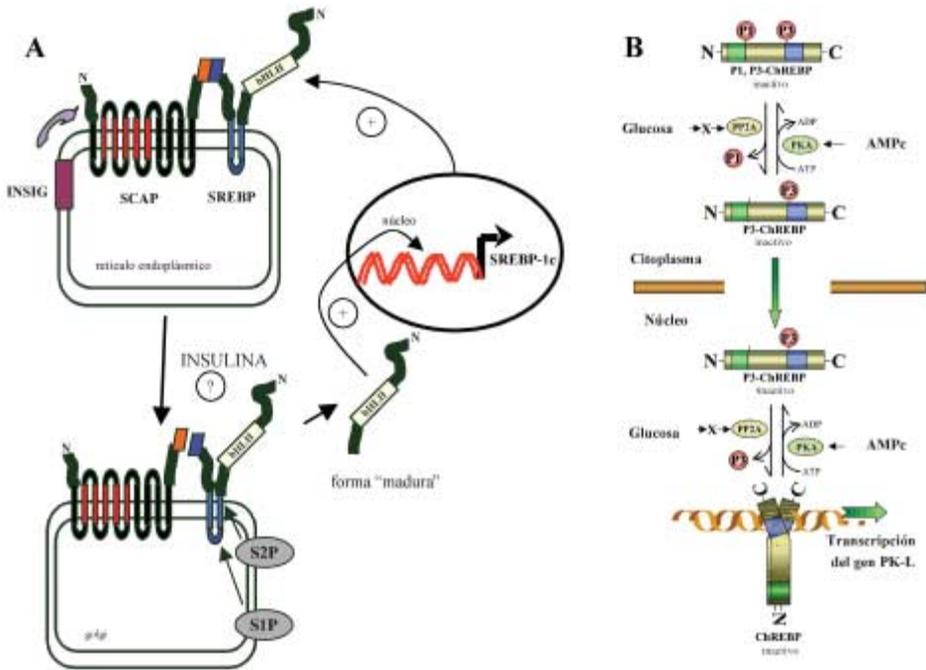


FIGURA 2. A) Esquema del procesamiento de SREBP-1 en respuesta a insulina. En presencia de insulina, el complejo SCAP-SREBP escapa del control de Insig lo que le conduce al aparato de Golgi en el que podrán actuar las proteasas SIP y S2P. De esta forma se libera el dominio aminoterminal de SREBP, que se dirige al núcleo para unirse a las secuencias de ADN que reconoce dicho factor de transcripción, presentes entre otros en su propio promotor. De esta forma la insulina es capaz de aumentar la expresión de SREBP-1c. B) Representación esquemática del posible mecanismo de regulación por glucosa y AMPc del factor ChREBP. Dos sitios de fosforilación P1 (Ser196) y P3 (Thr666) son claves en esta regulación. Un metabolito de la glucosa (X) activaría una fosfatasa tipo 2A que a su vez defosforilaría el sitio P1. Tras la pérdida del fosfato, ChREBP podría entrar en el núcleo en donde se defosforilaría el sitio P3 permitiendo la unión del factor al elemento de respuesta a carbohidratos del gen de la PK-L (adaptada de Kawaguchi et al. (2001) (15).

Esta forma precursora es inactiva y para realizar su acción transcripcional debe sufrir, a través de un complejo sistema de regulación, dos cortes proteolíticos sucesivos que liberan la región aminoterminal (50 kDa) denominada «forma madura» que migrará al núcleo. Tres proteínas, unidas a la membrana del retículo endoplásmico (ER), participan en este proceso: dos proteasas de membrana (S1P y S2P) y la proteína SCAP (SREBP cleavage-activating protein). La liberación de las formas

maduras de SREBP-1a y 2 depende de los niveles de colesterol. Cuando los niveles de colesterol disminuyen, SCAP sufre un cambio conformacional que la libera de las proteínas Insig-1 e Insig-2. En este momento el complejo SREBP/SCAP es capaz de migrar del ER al complejo de Golgi en el que actúan las dos proteasas en un proceso denominado RIP (regulated intramembrane proteolysis) [30, 31]. Sin embargo, la expresión y efectos transcripcionales de SREBP-1c parecen estar relacionados con el metabolismo de lípidos y carbohidratos. En hígado de rata o ratón, la expresión y procesamiento de SREBP-1c se incrementan cuando animales ayunados son realimentados con una dieta rica en carbohidratos [32].

La relación de SREBP-1c con la insulina quedó patente en experimentos con cultivo primario de hepatocitos, en los que la insulina activó fuertemente la expresión de SREBP-1c [33]. El principal efecto de la insulina sobre la expresión de SREBP-1c es transcripcional, efecto mediado a través de IRS (sustrato del receptor de la insulina)-1, implicando la vía de la fosfoinositol-3 quinasa (PI3K) [34]. A nivel del promotor, un fragmento de 1,5 Kb por delante del sitio de iniciación de la transcripción es capaz de conferir respuesta a insulina, AMPc y ácidos grasos polinsaturados [35]. En esta región podemos identificar, entre otros, sitios de unión NF- κ B, SRE (lo que apunta a una posible autorregulación de SREBP-1c), cajas E y sitios Sp1 [36].

En esta zona del promotor también localizamos una región de unión del receptor hepático LXR, miembro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares cuyo ligando son los oxysterol, derivados metabólicos del colesterol. Tobin y colaboradores han demostrado que la inducción de la expresión de SREBP-1c por insulina está suprimida en ratones knock out para ambas isoformas α y β de LXR, lo que sugiere que LXR es un intermediario en la transcripción estimulada por insulina de SREBP-1c [37]. Recientemente, el grupo de la doctora Fougère ha mostrado tanto en cultivo primario de hepatocitos como *in vivo* en ratas lactantes, que la activación de LXR aumenta los niveles de ARN mensajero (ARNm) de SREBP-1c, así como los niveles de la proteína precursora. Este precursor sería rápidamente procesado tras una breve exposición a la insulina [38]. Yabe y colaboradores [39] habían propuesto que la insulina podría inducir el procesamiento de SREBP-1c a través de la regulación selectiva de la proteína Insig-2. Sin embargo, Hegarty

y colaboradores han demostrado que la insulina es capaz de inducir el procesamiento de SREBP-1c a pesar de la fuerte inducción de la expresión de la proteína Insig-2a por LXR, revelando de este modo un nuevo papel de la insulina como inductor del procesamiento del factor SREBP-1c [38] (Fig. 2A).

En relación con patologías metabólicas, SREBP-1c puede considerarse desde dos perspectivas opuestas. De un lado, como un factor de transcripción clave en las acciones genómicas de la insulina tanto en el metabolismo de carbohidratos como en el metabolismo de lípidos, por lo que una pérdida de función llevaría a un fenómeno de resistencia a insulina. En este sentido, la sobreexpresión de SREBP-1c en el hígado de ratones diabéticos provoca un incremento en la expresión de enzimas glucolíticos (GK) y lipogénicos (FAS, S14) y una reducción en la expresión de enzimas gluconeogénicos (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, PEPCK), lo que conduce a una dramática reducción en la hiperglicemia, mimetizando la acción de la insulina [40].

Por otro lado, SREBP-1c favorece la síntesis de ácidos grasos y el depósito de lípidos. Dado que los lípidos están implicados en el desarrollo de resistencia a insulina a través de mecanismos de competición por sustrato, antagonismo de la acción de la insulina o lipotoxicidad [41], un aumento en la actividad de SREBP-1c podría ser también responsable de la aparición de un cuadro de resistencia a insulina. Se ha descrito la sobreexpresión de SREBP-1c en varios modelos de resistencia a insulina como los ratones lipodistróficos y obesos ob/ob [42], el knock out de IRS-2 [43] y las ratas obesas fa/fa [44]. Estudios recientes han demostrado que un nivel de expresión de SREBP-1c elevado induce una resistencia hepática a la insulina al suprimir la expresión de IRS-2 [45].

En cualquier caso, parece evidente que se debe tener en cuenta una posible implicación de SREBP-1c en patologías metabólicas que cursen con eventos de resistencia a insulina como la diabetes mellitus tipo 2, obesidad y dislipemia. Recientemente, se han identificado distintos polimorfismos asociados con riesgo a padecer diabetes tipo 2 y elevados niveles plasmáticos de colesterol [46], así como asociados con obesidad mórbida [47]. En nuestro grupo hemos identificado diez nuevos polimorfismos tras el análisis del gen *SREBF-1* en pacientes diabéticos tipo 2. En un primer momento, hemos centrado nuestro estudio en la caracterización de una nueva mutación c677C>T que implica el cambio

de la treonina 226 por metionina. La mutación disminuye la actividad transcripcional y la capacidad de unión al ADN de SREBP-1c, lo que se traduce en una disminución de la expresión de genes diana como el gen FAS o el gen para el receptor de las LDL [48].

En tejido adiposo, la expresión de SREBP-1c está igualmente controlada positivamente por insulina y media el efecto de esta hormona en la expresión del gen FAS. Esto sugiere que en este tejido sensible a la insulina, la proteína SREBP-1c tiene un papel similar al observado en hígado [49]. En músculo esquelético, otro de los tejidos sensibles a insulina, SREBP-1c regula la expresión de genes controlados por insulina, como UCP3, sugiriendo su importancia en la transducción de los efectos de la insulina en este tejido y, por tanto, en la sensibilidad del músculo a esta hormona tanto en estados fisiológicos como patológicos [50]. Por último, la sobreexpresión de SREBP-1c en la línea celular pancreática Min6 provoca una acumulación intracelular de lípidos y el cese de la secreción de insulina, lo que lleva a pensar que SREBP-1c podría estar implicado en la lipotoxicidad que tiene lugar en la célula β en algunas formas de diabetes mellitus tipo 2 [51].

4. NATURALEZA DEL COMPLEJO DE RESPUESTA A GLUCOSA: EL MODELO DE LA PIRUVATO QUINASA HEPÁTICA

Exceptuando al gen GK cuya expresión es regulada exclusivamente por la insulina [52], la mayoría de los genes glucolítico/lipogénicos son regulados también por la glucosa [53]. Tomando como modelo el gen de la PK-L, el grupo del doctor Kahn comprobó que las 183 primeras pares de base del promotor del gen de la PK-L eran capaces de soportar la expresión tejido-específica y mantener la regulación de su expresión dependiente de glucosa [54]. En este fragmento del promotor podemos distinguir cuatro elementos denominados, de 3' a 5', L1, L2, L3 y L4. Los elementos L3 y L4 eran los responsables de la respuesta a glucosa del promotor de la piruvato quinasa. Sin embargo, únicamente múltiples copias del elemento L4, pero no del elemento L3, dotaban a un promotor heterólogo de capacidad de respuesta a glucosa [54]. De este modo, la región L3, capaz de unir el factor de transcripción HNF-4 α , se comporta como un sitio auxiliar mientras que la región L4 es el verdadero

elemento de respuesta a glucosa (GIRE). La arquitectura del elemento de respuesta a glucosa del gen de la PK-L es particular. Consiste de dos cajas E (CANNTG) más o menos degeneradas separadas por cinco pares de bases. Las primeras cuatro bases de dichas cajas E, así como la distancia entre las mismas, es crítica para mantener la respuesta a glucosa [55]. Secuencias similares al GIRE de la PK-L han sido descritas en otros genes glucosa-dependientes como el gen de S14 [55], del gen FAS [56] o en el promotor del receptor del glucagón [57].

Las proteínas USF (Upstream Stimulatory Factors) 1 y 2 son factores de transcripción caracterizados por un dominio b/HLH/LZ, responsable de su dimerización y unión al ADN. Estos factores, codificados por dos genes distintos, son ubicuos y forman dímeros (homo y heterodímeros) y bajo esta forma reconocen *in vitro* la secuencia CACGTG denominada caja E. A través de su unión a esta secuencia nucleotídica, los factores USF activan la transcripción de un gran número de genes. En particular, en el hígado, se unen al GIRE de PK-L o S14, activando su expresión. El papel de USF2 en la regulación de la expresión génica por glucosa se puso en primer lugar de manifiesto mediante el uso de formas dominantes negativas [58] o mediante la microinyección de anticuerpos anti-USF2 en células de insulinoma [59]. En ambos casos se perdía la inducción génica dependiente de glucosa.

Con el fin de poder caracterizar el papel *in vivo* de los factores USF, se crearon dos modelos de ratones knock out por recombinación homóloga. Los ratones USF1^{-/-} no presentaban un fenotipo aparente [60], mientras que los ratones USF2^{-/-} tenían un mortalidad perinatal del 80 por 100, un retraso en el crecimiento ya evidente en el día 16 de desarrollo embrionario, hipofertilidad masculina y problemas de lactación en las hembras [61]. Posteriormente, se ha podido comprobar que junto con la inactivación del gen USF2 se había invalidado el gen de la hepcidina implicado en el metabolismo del hierro, por lo que ciertos rasgos fenotípicos del modelo podrían deberse a esta segunda invalidación [62].

Desde el punto de vista de la regulación de la expresión por glucosa, la deficiencia en factores USF altera la respuesta normal hepática a la glucosa de diferentes genes activados por una dieta rica en azúcares (PK-L, S14 y FAS). El papel principal de esta respuesta lo juega el heterodímero USF1/USF2 aunque, en ciertos casos el homodímero USF2/USF2 es capaz de cumplir la misma función [63]. El papel de los

factores USF también ha sido demostrado en otros tejidos. Así, USF1 contribuye a la expresión renal de TGF-(transforming growth factor)- α 1 en respuesta a carbohidratos, pudiendo jugar un papel en la regulación génica renal en procesos patológicos como la diabetes [64].

Sin embargo, los factores USF no son buenos candidatos para ser los factores responsables de la regulación de la expresión génica por glucosa, ya que (i) sus niveles no son regulados por la dieta; (ii) no hay una proporcionalidad entre la afinidad de los factores USF y la respuesta génica a la glucosa, y (iii) la inducción génica dependiente de glucosa no es inhibida por la expresión en hepatocitos en cultivo primario de formas USF dominantes negativas [65].

Empleando el sistema de un híbrido en levadura, se demostró que el factor transcripcional COUPTF (chicken ovoalbumin upstream promoter transcription factor)-II podía unirse al elemento GIRE del gen de la PK-L [66]. COUPTF-II es un receptor huérfano nuclear que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas tiroideas y reconoce secuencias repetidas de ADN de tipo RGG/TTCA. La sobreexpresión de COUPTF-II inhibe el poder transactivador de las proteínas USF sobre el promotor de la PK-L y reprime la inducción génica por glucosa en cultivo primario de hepatocitos. Por tanto, este factor de transcripción funcionaría como un sistema modulador negativo del factor de respuesta a glucosa. Recientemente, se ha mostrado que COUPTF-II interacciona a través de su dominio de unión al ADN con el receptor de glucocorticoides GR α . Esta interacción es necesaria para el aumento inducido por glucocorticoides de la actividad del promotor y expresión del gen de la PEPCK, el enzima limitante de la vía gluconeogénica, sugiriendo que COUPTF-II participaría en alguno de los efectos metabólicos de los glucocorticoides por su interacción con GR α [67].

En un intento de caracterizar nuevos factores de transcripción capaces de unirse al elemento de respuesta a glucosa del gen de la PK-L, Uyeda y colaboradores purificaron e identificaron una nueva proteína, a la que denominaron ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) que parecía un buen candidato a ser el verdadero responsable de la regulación de la transcripción dependiente de glucosa, ya que era activo en una dieta rica en carbohidratos y se inhibía por ayuno o por una dieta rica en lípidos. ChREBP se expresa en hígado, riñón, cerebelo e intestino, aunque sólo en el hígado se ha podido de-

tectar su unión al elemento de respuesta a glucosa [68]. ChREBP, conocido también como WBSR14 y MondoB, es una proteína de 864 aminoácidos que, al igual que los factores USF, pertenece a la familia de factores de transcripción b/HLH/LZ. Presenta una señal de localización nuclear (NLS) cerca del extremo amino terminal, dominios ricos en prolina y varios sitios potenciales de fosforilación por AMPc y AMPK.

ChREBP contiene dos sitios principales de fosforilación por AMPc, P1 y P3, que se regulan por mecanismos de fosforilación/defosforilación mediado por AMPc y glucosa (Fig. 2B). El sitio P1 se localiza en la región de localización nuclear, mientras que P3 se encuentra en el dominio básico de unión al ADN. En condiciones de baja glucosa, el AMPc activa la fosforilación de la serina 196 (P1). Ello hace que ChREBP se encuentre secuestrado en el citoplasma. El primer paso en la activación por la glucosa es la defosforilación de este residuo de serina mediada, según los autores por la proteína PP2A activada por Xu-5P [15]. Ello conduce a la translocación del factor ChREBP al núcleo. En el núcleo, el factor sigue inactivo, ya que el sitio P3, que corresponde a la treonina 666, se encuentra aún fosforilado, lo que impide la unión del factor al GIRE del gen de la PK-L. Una vez en el núcleo, la glucosa induce la defosforilación del residuo de treonina, lo que permite la unión del factor y la consiguiente activación de la transcripción del gen de la PK-L [15].

Extractos nucleares de hígados de ratas alimentadas con una dieta rica en grasa presentaban una menor unión al DNA de ChREBP en comparación con los extractos de animales alimentados con una dieta rica en carbohidratos [19]. Kawaguchi y colaboradores pusieron de manifiesto que el mecanismo de inhibición de ChREBP y, por consiguiente, la inhibición de la transcripción del gen de la piruvato quinasa hepática, parecía ser mediado por la fosforilación de la serina 568 por AMPK. Los ácidos grasos eran capaces de activar la quinasa al elevar los niveles de AMP tras su activación por la acyl-coA sintetasa. La fosforilación de la Ser 568 disminuye la unión del factor ChREBP al elemento de respuesta del promotor de la PK-L [19].

El papel esencial de ChREBP en la regulación de la expresión génica por glucosa de enzimas glucolítico/lipogénicos como PK-L, FAS o S14 ha sido demostrado *in vivo* con la generación de animales knock out para este factor de transcripción [69, 70]. En hepatocitos aislados de ratones ChREBP *-/-*, la glucosa no es capaz de aumentar los niveles de ARNm de

genes lipogénicos, incluso en presencia de una concentración de insulina elevada. En el hígado de estos ratones, la expresión de SREBP-1c no se encuentra alterada si la comparamos con los ratones control, por lo que la deficiencia de expresión de los genes lipogénicos se debe exclusivamente a la ausencia del factor ChREBP. Estos resultados demuestran claramente que, en ausencia de ChREBP, no existe ningún otro factor en el hígado que sea capaz de reemplazar a este factor para activar los genes glucolítico/lipogénicos en respuesta a glucosa [70].

Mediante el uso del sistema de doble híbrido en levadura, Stoeckman y colaboradores identificaron, en una librería de ADNc de hígado de ratón, una proteína, Mlx, que interaccionaba con el dominio b/HLH/LZ de ChREBP, dominio responsable de su unión al DNA y dimerización. Esta interacción ya había sido previamente caracterizada en otro contexto celular [71]. Mlx (Max-like protein X) es un miembro ampliamente expresado de la subclase Myc/Max/Mad de la familia b/HLH/LZ de factores de transcripción. Estos autores demostraron que la actividad de un plásmido reportero conteniendo el elemento de respuesta a carbohidratos de diferentes enzimas lipogénicos no se activa en células HEK293 al menos que ChREBP y Mlx se expresen conjuntamente. Además, la unión *in vitro* de ChREBP al ADN sólo se observaba en presencia del factor Mlx. Sin embargo, en cultivo primario de hepatocitos, la coexpresión de Mlx no tuvo ningún efecto en la expresión inducida por ChREBP de los promotores de genes gluco-sensibles [71]. Por tanto, son necesarios experimentos adicionales para confirmar si ChREBP actúa como homo o heterodímeros y, en este último caso, para identificar los posibles candidatos que interaccionarían con ChREBP.

5. CONCLUSIONES

La elucidación de las bases moleculares de la inducción génica por la glucosa ha experimentado un gran progreso en los últimos años, gracias a la aparición sobre esta «dulce» escena de dos actores principales, SREBP-1c y ChREBP. Tras la ingesta de una dieta rica en carbohidratos, la glucosa estimula la secreción pancreática de la insulina elevándose de este modo la concentración hepática de la hormona. Ello conduce a la inducción de la expresión y activación del factor SREBP-1c, que, una vez en el núcleo, promoverá la inducción del gen de la glucoquina-

sa. La síntesis de la GK incrementará la fosforilación de la glucosa generando la señal intermediaria (glucosa 6-fosfato, xilulosa 5-fosfato u otro metabolito aún sin identificar) que conducirá a la defosforilación de ChREBP y su translocación al núcleo. En el núcleo, coordinado con SREBP-1c controlará el metabolismo hepático de la glucosa (Fig. 3).

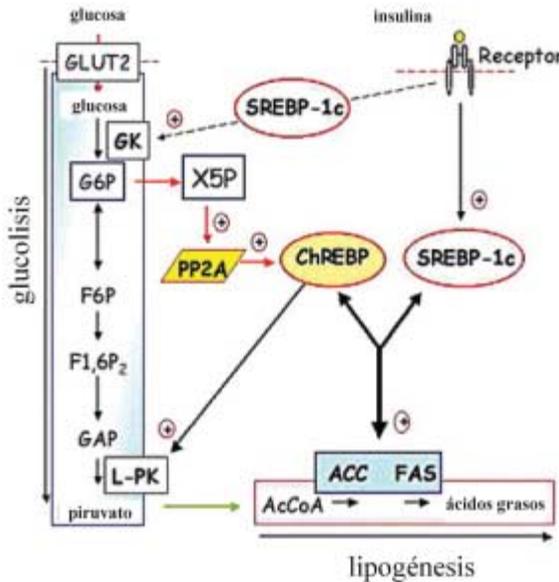


FIGURA 3. Acción coordinada de SREBP-1c y ChREBP en la regulación de la expresión de genes glucolítico/lipogénicos [adaptada de Dentin et al. *Biochimie* 87 (2005) 81-86].

Se han de confirmar en humanos la importancia de SREBP-1c y ChREBP en procesos patológicos. Este tipo de descubrimientos supone un importante paso adelante en nuestra capacidad para combatir enfermedades. Cada nuevo gen identificado nos permite conocer detalladamente los defectos metabólicos específicos que originan estas enfermedades, permite el diseño de dietas individualizadas, así como poder utilizar la manipulación de los genes como estrategias para lograr o mantener el estado de salud de los individuos.

Los trabajos realizados en el laboratorio del autor son financiados por el Instituto de Salud Carlos III (RCMN C03/08) y el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2003-01262).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CARLSON, M. (1998): Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr Opin Genet Dev* **8** (5): 560-4.
- (2) ANTOINE, B.; LEFRANCOIS-MARTÍNEZ, A.M.; LE GUILLOU, G.; LETURQUE, A.; VANDEWALLE, A. and KAHN, A. (1997): Role of the GLUT 2 glucose transporter in the response of the L-type pyruvate kinase gene to glucose in liver-derived cells. *J Biol Chem* **272** (29): 17937-43.
- (3) BURCELIN, R.; DEL CARMEN MUNOZ, M.; GUILLAM, M.T. and THORENS, B. (2000): Liver hyperplasia and paradoxical regulation of glycogen metabolism and glucose-sensitive gene expression in GLUT2-null hepatocytes. Further evidence for the existence of a membrane-based glucose release pathway. *J Biol Chem* **275** (15): 10930-6.
- (4) OZCAN, S., DOVER, J. and JOHNSTON, M. (1998): Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **17** (9): 2566-73.
- (5) VAGNOLI, P., COONS, D.M. and BISSON, L.F. (1998): The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **160** (1): 31-6.
- (6) GUILLEMAIN, G.; LOIZEAU, M.; PINCON-RAYMOND, M.; GIRARD, J. and LETURQUE, A. (2000): The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. *J Cell Sci* **113** (Pt 5): 841-7.
- (7) DENTIN, R.; PEGORIER, J.P.; BENHAMED, F.; FOUFELLE, F.; FERRE, P.; FAUVEAU, V.; MAGNUSON, M.A.; GIRARD, J. and POSTIC, C. (2004): Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* **279** (19): 20314-26.
- (8) FOUFELLE, F.; GOUHOT, B.; PEGORIER, J.P.; PERDEREAU, D.; GIRARD, J. and FERRE, P. (1992): Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate. *J Biol Chem* **267** (29): 20543-6.
- (9) MARIE, S.; DÍAZ-GUERRA, M.J.; MIQUEROL, L.; KAHN, A. and IYNEDJIAN, P.B. (1993): The pyruvate kinase gene as a model for studies of glucose-dependent regulation of gene expression in the endocrine pancreatic beta-cell type. *J Biol Chem* **268** (32): 23881-90.
- (10) MOURRIERAS, F.; FOUFELLE, F.; FORETZ, M.; MORIN, J.; BOUCHE, S. and FERRE, P. (1997): Induction of fatty acid synthase and S14 gene expression by glucose, xylitol and dihydroxyacetone in cultured rat hepatocytes is closely correlated with glucose 6-phosphate concentrations. *Biochem J* **326** (Pt 2): 345-9.
- (11) BANDSMA, R.H.; WIEGMAN, C.H.; HERLING, A.W.; BURGER, H.J.; TER HARMSSEL, A.; MEIJER, A.J.; ROMIJN, J.A.; REIJNGOUD, D.J. and KUIPERS, F. (2001): Acute inhibition of glucose-6-phosphate translocator activity leads to increased de novo lipogenesis and development of hepatic steatosis without affecting VLDL production in rats. *Diabetes* **50** (11): 2591-7.

- (12) DOIRON, B.; CUIF, M.H.; CHEN, R. and KAHN, A. (1996): Transcriptional glucose signaling through the glucose response element is mediated by the pentose phosphate pathway. *J Biol Chem* **271** (10): 5321-4.
- (13) MASSILLON, D.; CHEN, W.; BARZILAI, N.; PRUS-WERTHEIMER, D.; HAWKINS, M.; LIU, R.; TAUB, R. and ROSSETTI, L. (1998): Carbon flux via the pentose phosphate pathway regulates the hepatic expression of the glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in conscious rats. *J Biol Chem* **273** (1): 228-34.
- (14) CASADO, M.; BOSCA, L. AND MARTIN-SANZ, P. (1995): Differential regulation of the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and pyruvate kinase by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in fetal and adult hepatocytes. *J Cell Physiol* **165** (3): 630-8.
- (15) KAWAGUCHI, T.; TAKENOSHITA, M.; KABASHIMA, T. and UYEDA, K. (2001): Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (24): 13710-5.
- (16) HARDIE, D.G. (2004): The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci* **117** (Pt 23): 5479-87.
- (17) FERRE, P.; AZZOUT-MARNICHE, D. and FOUFELLE, F. (2003): AMP-activated protein kinase and hepatic genes involved in glucose metabolism. *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 1): 220-3.
- (18) DIRAISON, F.; PARTON, L.; FERRE, P.; FOUFELLE, F.; BRISCOE, C.P.; LECLERC, I. and RUTTER, G.A. (2004): Over-expression of sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c) in rat pancreatic islets induces lipogenesis and decreases glucose-stimulated insulin release: modulation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). *Biochem J* **378** (Pt 3): 769-78.
- (19) KAWAGUCHI, T.; OSATOMI, K.; YAMASHITA, H.; KABASHIMA, T. and UYEDA, K. (2002): Mechanism for fatty acid «sparing» effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **277** (6): 3829-35.
- (20) LECLERC, I.; LENZNER, C.; GOURDON, L.; VAULONT, S.; KAHN, A. and VIOLET, B. (2002): Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **50** (7): 1515-1521.
- (21) BARTHEL, A.; SCHMOLL, D.; KRUGER, K.D.; ROTH, R.A. and JOOST, H.G. (2002): Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase. *Endocrinology* **143** (8): 3183-6.
- (22) WOODS, A.; AZZOUT-MARNICHE, D.; FORETZ, M.; STEIN, S.C.; LEMARCHAND, P.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. and CARLING, D. (2000): Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* **20** (18): 6704-11.

- (23) KABASHIMA, T.; KAWAGUCHI, T.; WADZINSKI, B.E. and UYEDA, K. (2003): Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (9): 5107-12.
- (24) FOUFFELLE, F. and FERRE, P. (2002): New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* **366** (Pt 2): 377-91.
- (25) WANG, X.; SATO, R.; BROWN, M.S.; HUA, X. and GOLDSTEIN, J.L. (1994): SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **77** (1): 53-62.
- (26) HUA, X.; WU, J.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. and HOBBS, H.H. (1995): Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* **25** (3): 667-73.
- (27) SHIMOMURA, I.; SHIMANO, H.; HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (1997): Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* **99** (5): 838-45.
- (28) KIM, J.B.; SPOTTS, G.D.; HALVORSEN, Y.D.; SHIH, H.M.; ELLENBERGER, T.; TOWLE, H.C. and SPIEGELMAN, B.M. (1995): Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol* **15** (5): 2582-8.
- (29) BROWN, M.S. and GOLDSTEIN, J.L. (1997): The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89** (3): 331-40.
- (30) YANG, T.; ESPENSHADE, P.J.; WRIGHT, M.E.; YABE, D.; GONG, Y.; AEBERSOLD, R.; GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (2002): Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* **110** (4): 489-500.
- (31) YABE, D.; BROWN, M.S. and GOLDSTEIN, J.L. (2002): Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (20): 12753-8.
- (32) HORTON, J.D.; BASHMAKOV, Y.; SHIMOMURA, I. and SHIMANO, H. (1998): Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** (11): 5987-92.
- (33) FORETZ, M.; PACOT, C.; DUGAIL, I.; LEMARCHAND, P.; GUICHARD, C.; LE LIEPVRE, X.; BERTHELIER-LUBRANO, C.; SPIEGELMAN, B.; KIM, J.B.; FERRE, P. and FOUFFELLE, F. (1999): ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* **19** (5): 3760-8.
- (34) MATSUMOTO, M.; OGAWA, W.; TESHIGAWARA, K.; INOUE, H.; MIYAKE, K.; SAKAUE, H. and KASUGA, M. (2002): Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of

- sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes. *Diabetes* **51** (6): 1672-80.
- (35) DENG, X.; CAGEN, L.M.; WILCOX, H.G.; PARK, E.A.; RAGHOW, R. and ELAM, M.B. (2002): Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **290** (1): 256-62.
- (36) AMEMIYA-KUDO, M.; SHIMANO, H.; YOSHIKAWA, T.; YAHAGI, N.; HASTY, A.H.; OKAZAKI, H.; TAMURA, Y.; SHIONOIRI, F.; IZUKA, Y.; OHASHI, K.; OSUGA, J.; HARADA, K.; GOTODA, T.; SATO, R.; KIMURA, S.; ISHIBASHI, S. and YAMADA, N. (2000): Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J Biol Chem* **275** (40): 31078-85.
- (37) TOBIN, K.A.; ULVEN, S.M.; SCHUSTER, G.U.; STEINEGER, H.H.; ANDRESEN, S.M.; GUSTAFSSON, J.A. and NEBB, H.I. (2002): Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* **277** (12): 10691-7.
- (38) HEGARTY, B.D.; BOBARD, A.; HAINAULT, I.; FERRE, P.; BOSSARD, P. and FOUFELLE, F. (2005): Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** (3): 791-6.
- (39) YABE, D.; KOMURO, R.; LIANG, G.; GOLDSTEIN, J.L. and BROWN, M.S. (2003): Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (6): 3155-60.
- (40) BECARD, D.; HAINAULT, I.; AZZOUT-MARNICHE, D.; BERTRY-COUSSOT, L.; FERRE, P. and FOUFELLE, F. (2001): Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes* **50** (11): 2425-30.
- (41) SCHMITZ-PEIFFER, C. (2000): Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal* **12** (9-10): 583-94.
- (42) SHIMOMURA, I.; MATSUDA, M.; HAMMER, R.E.; BASHMAKOV, Y.; BROWN, M.S. and GOLDSTEIN, J.L. (2000): Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* **6** (1): 77-86.
- (43) TOBE, K.; SUZUKI, R.; AOYAMA, M.; YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; MATSUI, J.; AKANUMA, Y.; KIMURA, S.; TANAKA, J.; ABE, M.; OHSUMI, J.; NAGAI, R. and KADOWAKI, T. (2001): Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2(-/-) mouse liver. *J Biol Chem* **276** (42): 38337-40.
- (44) KAKUMA, T.; LEE, Y.; HIGA, M.; WANG, Z.; PAN, W.; SHIMOMURA, I. and UNGER, R.H. (2000): Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (15): 8536-41.

- (45) IDE, T.; SHIMANO, H.; YAHAGI, N.; MATSUZAKA, T.; NAKAKUKI, M.; YAMAMOTO, T.; NAKAGAWA, Y.; TAKAHASHI, A.; SUZUKI, H.; SONE, H.; TOYOSHIMA, H.; FUKAMIZU, A. and YAMADA, N. (2004): SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol* **6** (4): 351-7.
- (46) LAUDES, M.; BARROSO, I.; LUAN, J.; SOOS, M.A.; YEO, G.; MEIRHAEGHE, A.; LOGIE, L.; VIDAL-PUIG, A.; SCHAFER, A.J.; WAREHAM, N.J. and O'RAHILLY, S. (2004): Genetic variants in human sterol regulatory element binding protein-1c in syndromes of severe insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* **53** (3): 842-6.
- (47) EBERLE, D.; CLEMENT, K.; MEYRE, D.; SAHBATOU, M.; VAXILLAIRE, M.; LE GALL, A.; FERRE, P.; BASDEVANT, A.; FROGUEL, P. and FOUFELLE, F. (2004): SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. *Diabetes* **53** (8): 2153-7.
- (48) VERNIA, S.; EBERLÉ, D.; HERNÁNDEZ MIJARES, A.; FOUFELLE, F. and CASADO, M. (2005): A Rare Missense Mutation in a Type 2 Diabetes Patient Decreases the Transcriptional Activity of Human Sterol Regulatory Element Binding Protein-1. *Hum. Mutat.* (submitted).
- (49) KIM, J.B.; SARRAF, P.; WRIGHT, M.; YAO, K.M.; MUELLER, E.; SOLANES, G.; LOWELL, B.B. and SPIEGELMAN, B.M. (1998): Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* **101** (1): 1-9.
- (50) GUILLET-DENIAU, I.; MIEULET, V.; LE LAY, S.; ACHOURI, Y.; CARRE, D.; GIRARD, J.; FOUFELLE, F. and FERRE, P. (2002): Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes* **51** (6): 1722-8.
- (51) ANDREOLAS, C.; DA SILVA XAVIER, G.; DIRAISON, F.; ZHAO, C.; VARADI, A.; LÓPEZ-CASILLAS, F.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. and RUTTER, G.A. (2002): Stimulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression by glucose requires insulin release and sterol regulatory element binding protein 1c in pancreatic MIN6 beta-cells. *Diabetes* **51** (8): 2536-45.
- (52) MAGNUSON, M.A.; ANDREONE, T.L.; PRINTZ, R.L.; KOCH, S. and GRANNER, D.K. (1989): Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (13): 4838-42.
- (53) GIRARD, J.; FERRE, P. and FOUFELLE, F. (1997): Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr* **17**: 325-52.
- (54) DÍAZ GUERRA, M.J.; BERGOT, M.O.; MARTÍNEZ, A.; CUIF, M.H.; KAHN, A. and RAYMONDJEAN, M. (1993): Functional characterization of the L-type pyruvate kinase gene glucose response complex. *Mol Cell Biol* **13** (12): 7725-33.
- (55) SHIH, H.M.; LIU, Z. and TOWLE, H.C. (1995): Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription. *J Biol Chem* **270** (37): 21991-7.

- (56) RUFO, C.; TERÁN-GARCÍA, M.; NAKAMURA, M.T.; KOO, S.H.; TOWLE, H.C. and CLARKE, S.D. (2001): Involvement of a unique carbohydrate-responsive factor in the glucose regulation of rat liver fatty-acid synthase gene transcription. *J Biol Chem* **276** (24): 21969-75.
- (57) PORTOIS, L.; MAGET, B.; TASTENOY, M.; PERRET, J. and SVOBODA, M. (1999): Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J Biol Chem* **274** (12): 8181-90.
- (58) LEFRANCOIS-MARTÍNEZ, A.M.; MARTÍNEZ, A.; ANTOINE, B.; RAYMONDJEAN, M. and KAHN, A. (1995): Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter. *J Biol Chem* **270** (6): 2640-3.
- (59) KENNEDY, H.J.; VIOLLET, B.; RAFIQ, I.; KAHN, A. and RUTTER, G.A. (1997): Upstream stimulatory factor-2 (USF2) activity is required for glucose stimulation of L-pyruvate kinase promoter activity in single living islet beta-cells. *J Biol Chem* **272** (33): 20636-40.
- (60) VALLET, V.S.; CASADO, M.; HENRION, A.A.; BUCCHINI, D.; RAYMONDJEAN, M.; KAHN, A. and VAULONT, S. (1998): Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem* **273** (32): 20175-9.
- (61) VALLET, V.S.; HENRION, A.A.; BUCCHINI, D.; CASADO, M.; RAYMONDJEAN, M.; KAHN, A. and VAULONT, S. (1997): Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 2 *-/-* mice. *J Biol Chem* **272** (35): 21944-9.
- (62) NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; DEVAUX, I.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; KAHN, A. and VAULONT, S. (2001): Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (15): 8780-5.
- (63) CASADO, M.; VALLET, V.S.; KAHN, A. and VAULONT, S. (1999): Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J Biol Chem* **274** (4): 2009-13.
- (64) ZHU, Y.; CASADO, M.; VAULONT, S. and SHARMA, K. (2005): Role of Upstream Stimulatory Factors in regulation of renal transforming growth factor- β 1. *Diabetes* in press.
- (65) KAYTOR, E.N.; QIAN, J.; TOWLE, H.C. and OLSON, L.K. (2000): An indirect role for upstream stimulatory factor in glucose-mediated induction of pyruvate kinase and S14 gene expression. *Mol Cell Biochem* **210** (1-2): 13-21.
- (66) LOU, D.Q.; TANNOUR, M.; SELIG, L.; THOMAS, D.; KAHN, A. and VASSEUR-COGNET, M. (1999): Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II, a new partner of the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene, acts as an inhibitor of the glucose response. *J Biol Chem* **274** (40): 28385-94.
- (67) DE MARTINO, M.U.; ALESCI, S.; CHROUSOS, G.P. and KINO, T. (2004): Interaction of the glucocorticoid receptor and the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII): implications for the actions of glucocor-

- ticoids on glucose, lipoprotein, and xenobiotic metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1024: 72-85.
- (68) YAMASHITA, H.; TAKENOSHITA, M.; SAKURAI, M.; BRUICK, R.K.; HENZEL, W.J.; SHILLINGLAW, W.; ARNOT, D. and UYEDA, K. (2001): A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (16): 9116-21.
- (69) IIZUKA, K.; BRUICK, R.K.; LIANG, G.; HORTON, J.D. and UYEDA, K. (2004): Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (19): 7281-6.
- (70) ISHII, S.; IIZUKA, K.; MILLER, B.C. and UYEDA, K. (2004): Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (44): 15597-602.
- (71) STOECKMAN, A.K.; MA, L. and TOWLE, H.C. (2004): Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* **279** (15): 15662-9.