

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

ESTUDIO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SREBP1 EN  
ESTADOS DE RESISTENCIA A INSULINA

SANTIAGO VERNIA MIRALLES

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 1 de Juny de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Antonio Zorzano Olarte
- D<sup>a</sup>. Paloma Martín Sanz
- D. Jordi Pérez Tur
- D. Cesareo Roncero Romero
- D. Francisco Estruch Ros

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Marta Casado Pinna

©Copyright: Servei de Publicacions  
Santiago Vernia Miralles

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6938-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Instituto de Biomedicina de Valencia



**ESTUDIO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN  
SREBP1 EN ESTADOS DE RESISTENCIA A  
INSULINA**

**TESIS DOCTORAL  
SANTIAGO VERNIA MIRALLES  
Valencia, 2007**



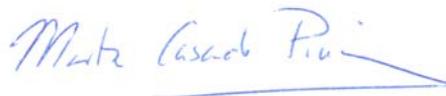
Dña. Marta Casado Pinna, Doctora en Farmacia y Científica titular en el Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC),

**CERTIFICA:**

Que D. **Santiago Vernia Miralles**, licenciado en Farmacia por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "Estudio del factor de transcripción SREBP1 en estados de resistencia a insulina".

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Valencia, a 18 de Diciembre de 2006



Dra. Marta Casado Pinna

Unidad de Patología Metabólica Experimental  
Instituto de Biomedicina de Valencia



**A M<sup>a</sup> Dolores y Santiago,  
por su cariño, su ejemplo y su apoyo**



## AGRADECIMIENTOS

Desde la primera vez que entré en el Instituto de Biomedicina, mucha gente me ha ayudado de manera decisiva.

La capacidad de colaboración es algo inherente a la actividad científica, y en este centro he encontrado una formidable muestra de ello. Por cariño, amistad o simplemente altruismo me han ayudado en el desarrollo de esta tesis por encima de lo que yo podía imaginar. Por ello quiero hacer constar en primer lugar mi agradecimiento a todos los integrantes del Instituto de Biomedicina. Espero no olvidar nunca esta lección ni por supuesto a vosotros.

Me gustaría mostrar mi gratitud a Marta Casado por darme la posibilidad de incorporarme a su grupo, por su confianza durante estos cinco años. He tenido la suerte de participar en los primeros pasos de este proyecto, que han sido difíciles pero muy gratificantes para mí. Estoy seguro de que todo este trabajo pronto dará sus frutos y que como siempre encontraremos una buena manera de celebrarlo.

Quisiera continuar citando a las personas con las que más horas he pasado en el laboratorio, Carme y Belén, que para mi han sido un ejemplo de compañerismo. Tener la ayuda de una persona como Carme me ha enseñado mucho y me ha dado brillantes consejos que han hecho avanzar esta tesis. Belén empezó aprendiendo y ha acabado enseñándonos a todos. Ha sido un gran apoyo en los momentos más difíciles.

Muchas gracias a las tres, por que habéis hecho que estos años sean productivos para mi en todos los aspectos. Ha sido una suerte teneros cerca!

Por el laboratorio se ha ido incorporando gente con la que he podido compartir menos tiempo pero el suficiente para ver que son personas de gran valía de las que he aprendido mucho en el plano personal y en el científico: Ana, Mari Carmen, Antonio Ramos, Amalia, Rafa y por supuesto Violeta. A todos ellos, gracias.

También quisiera mostrar mi agradecimiento a los miembros de la Unidad de Endocrinología del Hospital Dr. Peset, especialmente a Antonio Ruiz, a Antonio Hernández y a Isabel Soria; a Javier Chaves y a Sebastián Blesa del Laboratorio de Estudios Genéticos (Hospital Clínico Universitario de Valencia) y especialmente a los pacientes que han colaborado en este estudio. Todos ellos han hecho posible la realización del análisis genético incluido en este trabajo.

Sin duda, si de algo puedo estar orgulloso es de la gran cantidad de personas que me han demostrado su amistad, y que hacen que esta y cualquier actividad tenga sentido. Entre ellas, mis amigas de la Facultad de Farmacia, Amparo, Maria, Elena y Luisa, a las que veo menos de lo que quisiera.

También a Toni, Vincenzo y Benito, los "vecinos" del primero por que juntos hemos pasado muy buenos momentos.

Además he contado con la ayuda en el manejo de programas informáticos sobre genética humana de Carmina y Amalia; espero que vayamos a muchos más conciertos juntos. A Pili por su ayuda en los SSCP, por su cariño, y sus buenos consejos.

A Bea, Mari Paz y Cintia, las chicas de regeneración, que han sido siempre el alma de la fiesta.

A Paula, por su apoyo y su ilusión, ya sabe que para mi es una suerte tenerla como amiga. A Laia por las risas y las cervecitas en Benimaclet, y oye, donde haga falta!

No hace falta que diga que para mi son muy importantes y que las quiero.

A Pascual Sanz por la confianza que deposita en mí y a mis nuevos compañeros Ada, Bart, Dani, Jose, Leda, Luisa, MC y Miguel. No es necesario mucho tiempo para ver que sois grandes y teneros cariño, y yo desde luego lo tengo.

Por supuesto quiero agradecer el apoyo y cariño incondicional de mis amigos y familiares, especialmente a mis padres, a mi hermana Ana, y a Eugenia, que tal vez no entiendan mucho de esta tesis, pero sin ellos seguramente yo tampoco.



# ÍNDICES



1.	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	25
1.1-	<b>DIABETES MELLITUS</b> .....	27
1.2-	<b>DIABETES MELLITUS TIPO 2</b> .....	28
1.3-	<b>DM2: MECANISMOS MOLECULARES DE PATOGÉNESIS</b> .....	30
1.3-1.	<b><i>Resistencia a la insulina</i></b> .....	31
1.3-1.1.	Obesidad y resistencia a la insulina .....	34
1.3-1.2.	Ácidos grasos y resistencia a la insulina .....	36
1.3-1.3.	Inflamación y resistencia a la insulina .....	37
1.3-1.4.	Metabolismo mitocondrial .....	38
1.3-2.	<b><i>Secreción de insulina: Disfunción de la célula <math>\beta</math> pancreática</i></b> .....	38
1.3-2.1.	Glucotoxicidad y función $\beta$ pancreática .....	40
1.3-2.2.	Lipotoxicidad y función $\beta$ pancreática .....	41
1.4-	<b>GENÉTICA DE LA DIABETES TIPO 2</b> .....	42
1.5-	<b>PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ELEMENTO DE RESPUESTA A ESTEROLES (SREBP)</b> .....	45
1.5-1.	<b><i>Caracterización y estructura</i></b> .....	45
1.5-2.	<b><i>Regulación de SREBP1</i></b> .....	47
1.5-2.1.	Regulación de la expresión de SREBP .....	47
1.5-2.2.	Procesamiento: SREBP-SCAP-INSIG .....	50
1.5-2.2.1.	Descripción del mecanismo .....	50
1.5-2.2.2.	Proteínas INSIG .....	53
1.5-2.3.	Modificación postraduccional y degradación de SREBP .....	55
1.5-2.4.	Interacciones proteína-proteína de SREBP .....	56
1.5-2.5.	Estabilidad del mensajero .....	57
1.5-3.	<b><i>Actividad de los factores SREBP</i></b> .....	57
1.5-3.2.	Tejido adiposo .....	60
1.5-3.3.	Músculo esquelético .....	61
1.5-3.4.	Tejido endotelial vascular .....	62
1.5-3.5.	Sistema nervioso .....	63
1.5-3.6.	Páncreas .....	63
1.5-4.	<b><i>Implicaciones fisiopatológicas del factor SREBP1</i></b> .....	65
1.5-5.	<b><i>Estudios genéticos previos de la ruta INSIG / SCAP / SREBP1</i></b> .....	67
2.	<b>HIPÓTESIS</b> .....	69
3.	<b>OBJETIVOS</b> .....	73
4.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	77
4.1-	<b>PACIENTES Y CONTROLES</b> .....	79
4.1-1.	<b><i>Grupos de población estudiados</i></b> .....	79
4.1-2.	<b><i>Obtención ADN genómico</i></b> .....	79
4.2-	<b>ESTUDIO DEL GEN SREBF1</b> .....	80
4.2-1.	<b><i>Amplificación del gen SREBF1 mediante PCR</i></b> .....	80
4.2-2.	<b><i>Rastreo molecular del gen SREBF1 mediante SSCP</i></b> .....	81
4.2-3.	<b><i>Nomenclatura de las mutaciones y polimorfismos</i></b> .....	84
4.2-4.	<b><i>Genotipado de SNPs y deleciones en SREBF1</i></b> .....	84
4.2-5.	<b><i>Análisis informático</i></b> .....	87
4.2-6.	<b><i>Clonación de SREBP1a y 1c humanos</i></b> .....	88
4.2-7.	<b><i>Preparación de adenovirus recombinantes</i></b> .....	90

4.2-8.	<u>Cultivo primario de hepatocitos de rata e infección con adenovirus</u> .....	93
4.2-9.	<u>Cultivo celular y ensayo luciferasa para valorar la actividad de las proteínas SREBP1 silvestres y mutadas</u> .....	94
4.2-10.	<u>Ensayos de retardo electroforético (EMSA)</u> .....	96
4.2-11.	<u>Análisis proteico</u> .....	97
4.2-11.1.	Western-blot experimentos de actividad SREBP1 .....	97
4.2-11.2.	Electroforesis bidimensional de SREBP1c silvestre y Thr202Met.....	98
4.2-11.3.	Purificación de SREBP1c WT y Thr202Met por cromatografía de afinidad	98
4.2-11.4.	Degradación con cicloheximida.....	99
4.2-11.5.	Expresión y purificación de SREBP1 humano en células procariotas...	100
4.2-12.	<u>Real-time PCR cuantitativa</u> .....	102
4.2-13.	<u>Inmunomicroscopía confocal</u> .....	102
4.2-14.	<u>Clonación las regiones 5' y 3'UTR del gen SREBF1</u> .....	103
4.2-15.	<u>Ensayo luciferasa de las construcciones 5' y 3'UTR</u> .....	105
4.2-16.	<u>Análisis estadístico</u> .....	106
4.3-	<u>ESTUDIO INSIG2</u> .....	106
4.3-1.	<u>Análisis de variantes INSIG2</u> .....	106
4.3-2.	<u>Construcciones promotor INSIG2-Luciferasa</u> .....	107
4.3-3.	<u>Cultivos celulares y ensayos luciferasa</u> .....	107
4.3-4.	<u>Genotipado de pacientes y controles</u> .....	108
4.3-5.	<u>Estudio de asociación del gen INSIG2 con DM2</u> .....	108
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	111
5.1-	<u>GENOTECAS</u> .....	113
5.2-	<u>ESTUDIO DEL GEN SREBF1</u> .....	114
5.2-1.	<u>Rastreo molecular del gen SREBF1</u> .....	114
5.2-1.1.	Variantes identificadas en el primer exón y el promotor de la isoforma SREBP1c.	114
5.2-1.2.	Variante identificada en el primer intrón .....	115
5.2-1.3.	Variantes identificadas en el exón 3.....	116
5.2-1.4.	Variantes identificadas en el exón 9.....	117
5.2-1.5.	Variante encontrada en el exón 18c.....	118
5.2-1.6.	Variantes identificadas en la región 3'UTR del gen SREBF1.....	119
5.2-2.	<u>Estudio de asociación con DM2 de las variantes encontradas en el gen SREBF1</u> .....	121
5.2-3.	<u>Análisis funcional de las variantes identificadas en SREBF1</u> .....	127
5.2-3.1.	Estudio de las mutaciones encontradas en la proteína .....	128
5.2-3.2.	Estudio de las variantes localizadas en las regiones de unión intrón-exón	141
5.2-3.3.	Estudio de las variantes localizadas en la región reguladora 3'UTR de SREBP1c	143
5.2-3.4.	Estudio de las variantes localizadas en las regiones reguladoras 5'UTR de SREBP1a y SREBP1c.....	146
5.2-4.	<u>Implicación de SREBP1 en diabetes monogénicas</u> .....	149
5.3-	<u>ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN EL GEN INSIG2</u> .....	152
5.3-1.	<u>Selección de las SNP estudiadas</u> .....	152
5.3-2.	<u>Genotipado de las variantes y estudios de asociación</u> .....	154
5.3-3.	<u>Estudio funcional de las variantes de INSIG2</u> .....	157

5.3-4. <i>Asociación con parámetros bioquímicos y antropométricos</i> .....	159
6. <b>DISCUSIÓN</b> .....	161
7. <b>CONCLUSIONES</b> .....	175
8. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	178



FIGURA 1: RELACIÓN HIPERBÓLICA ENTRE LA FUNCIÓN B PANCREÁTICA Y LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA..	30
FIGURA 2: PRINCIPALES TEJIDOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO GLUCOLIPÍDICO REGULADO POR INSULINA, CON IMPLICACIONES EN LA ETIOPATOGENIA DE LA DM2.	32
FIGURA 3: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA.	33
FIGURA 4: ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES <i>SREBF1</i> Y <i>SREBF2</i> .	46
FIGURA 5: REPRESENTACIÓN DE LA DISPOSICIÓN EN LA MEMBRANA DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO (RE) DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL TRANSPORTE Y MADURACIÓN DE LOS FACTORES SREBP.	47
FIGURA 6: ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA BÁSICA DEL PROMOTOR DE SREBP1C HUMANO.	48
FIGURA 7: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS SREBP.	52
FIGURA 8: DESCRIPCIÓN DE LAS RUTAS METABÓLICAS INDUCIDAS POR LAS PROTEÍNAS SREBP1C Y SREBP2 EN HÍGADO.	60
FIGURA 9: ESQUEMA DE LA TÉCNICA SSCP.	83
FIGURA 10: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES MÁS IMPORTANTES DE SREBP1.	90
FIGURA 11: DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROTOCOLO SEGUIDO PARA LA PREPARACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES.	92
FIGURA 12: REACCIONES BIOLUMINISCENTES CATALIZADAS POR LA FIREFLY LUCIFERASA (A) Y RENILLA LUCIFERASA (B).	96
FIGURA 13: ESQUEMA DE LAS CONSTRUCCIONES PPROEXHT-SREBP1.	100
FIGURA 14: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CONSTRUCCIONES OBTENIDAS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE LAS VARIANTES EN LAS REGIONES UTR DEL GEN <i>SREBF1</i> .	105
FIGURA 15: PATRÓN DE MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA Y ELECTROFEROGRAMA DE UN PACIENTE HETEROCIGOTO PARA LA (A)	

VARIANTE -38G>A EN LA REGIÓN 5'UTR Y (B) PARA LA VARIANTE -60G>A EN EL PROMOTOR DE LA ISOFORMA SREBP1C. ....	115
FIGURA 16: PATRÓN DE MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE UN PACIENTE HETEROCIGOTO PARA LA DELECIÓN IVS1 –11DELTC, LOCALIZADA EN LA REGIÓN DE UNIÓN INTRÓN-EXÓN2.....	116
FIGURA 17: PATRÓN DE MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PACIENTES HETEROCIGOTOS PARA LAS VARIANTES ENCONTRADAS EN EL EXÓN 3. ....	117
FIGURA 18: PATRÓN DE MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PACIENTES HETEROCIGOTOS PARA LOS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS EN EL EXÓN 9 .....	118
FIGURA 19: PATRÓN DE MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PACIENTES HOMOCIGOTOS, HETEROCIGOTOS Y SILVESTRES PARA EL POLIMORFISMO ENCONTRADO EN EL EXÓN 18C. ....	119
FIGURA 20: ELECTROFEROGRAMA DE LOS CLONES OBTENIDOS TRAS LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN 3'UTR DE LA ISOFORMA SREBP1C EN PACIENTES HETEROCIGOTOS.....	120
FIGURA 21: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL GEN SREBF1 Y DE LA LOCALIZACIÓN DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS POR SSCP (AZUL). ....	121
FIGURA 22: DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO ENCONTRADO ENTRE LAS VARIANTES DEL GEN <i>SREBF1</i> . ....	125
FIGURA 23: CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA EN LA QUE SE IDENTIFICÓ LA VARIANTE THR202MET.....	129
FIGURA 24: ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DEL FACTOR SREBP1 HUMANO CON LAS PROTEÍNAS ORTÓLOGAS DE DISTINTAS ESPECIES. ....	130
FIGURA 25: ACTIVIDAD DE CANTIDADES CRECIENTES DEL VECTOR DE EXPRESIÓN PCDNA-SREBP1C SILVESTRE (WT) O CON LAS VARIANTES PRO173LEU Y THR202MET SOBRE EL PROMOTOR DE LA GLUCOQUINASA DE RATA EN UN ENSAYO LUCIFERASA EN CÉLULAS COS7.....	131
FIGURA 26: TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS COS-7 CON VECTORES DE EXPRESIÓN PARA SREBP1C (WT O THR202MET), UN PLÁSMIDO REPORTERO, CON LA SECUENCIA DE LA LUCIFERASA BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR DE LA GLUCOQUINASA (PRGKL-1448), O CON EL PROMOTOR DE LA GLUCOQUINASA CON LOS SITIOS “SRE” MUTADOS (PRGKL-1448MAB), Y EL VECTOR PGFPN1 COMO CONTROL INTERNO.....	132

FIGURA 27: SOBREENPRESIÓN DE SREBP1C MEDIANTE VECTORES ADENOVIRALES. ....	133
FIGURA 28: ACTIVIDAD DE LAS ISOFORMAS SREBP1A Y 1C SILVESTRES Y MUTADAS EN LA INDUCCIÓN DE SUS GENES DIANA. ....	134
FIGURA 29: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE SREBP1. ....	136
FIGURA 30: ENSAYO EMSA REALIZADO CON LAS PROTEÍNAS SREBP1 SILVESTRE, PRO197LEU Y THR226MET SINTETIZADAS IN VITRO CON UN SISTEMA DE RETICULOCITOS DE CONEJO. ....	137
FIGURA 31: MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LAS PROTEÍNAS SREBP1 WT Y THR226MET. ....	138
FIGURA 32: DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SREBP1 WT Y THR226MET EN PRESENCIA DE CICLOHEXIMIDA. ....	140
FIGURA 33: PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HIS-SREBP1. ....	141
FIGURA 34: PREDICCIÓN INFORMÁTICA DE SITIOS ACEPTORES DE SPLICING DEL EXÓN 2 Y 19C DEL GEN <i>SREBF1</i> . ....	142
FIGURA 35: PREDICCIÓN INFORMÁTICA DEL SITIO DONADOR DE SPLICING DEL EXÓN 18C DEL GEN <i>SREBF1</i> . ....	143
FIGURA 36: HOMOLOGÍA ENTRE LAS REGIONES 3'UTR DEL GEN <i>SREBF1</i> DE RATA Y HUMANO. ....	144
FIGURA 37: EFECTO EN LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS EN LA REGIÓN 3'UTR DE SREBP1C. ....	145
FIGURA 38: EFECTO DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS EN LA REGIÓN 5'UTR DE SREBP1A SOBRE SU ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL. ....	146
FIGURA 39: PREDICCIÓN INFORMÁTICA DEL EFECTO DE LA VARIANTE -60G>A SOBRE LOS LUGARES DE UNIÓN DEL PROMOTOR DE SREBP1C. ....	147
FIGURA 40: EFECTO DE LAS VARIANTES SITUADAS EN EL PROMOTOR Y LA REGIÓN 5'UTR DE SREBP1C EN SU ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL. ....	148
FIGURA 41: ESTRUCTURA SECUNDARIA DE MÍNIMA ENERGÍA CALCULADA POR EL PROGRAMA RNASTRUCTURE V.4.3 PARA LA REGIÓN 5'UTR DE SREBP1C SILVESTRE O 5'UTR-38G>A. ....	149
FIGURA 42: ÁRBOL GENEALÓGICO DE LOS INDIVIDUOS DIAGNOSTICADOS COMO MODYX EN LOS QUE SE ENCONTRÓ LA VARIANTE 5'UTR-38G>A. ....	150

FIGURA 43: ÁRBOL GENEALÓGICO DE LOS FAMILIARES DEL PACIENTE (INDIVIDUO 4) EN EL QUE SE IDENTIFICÓ LA VARIANTE 5'UTR-38G>A EN NUESTRA POBLACIÓN. ....	151
FIGURA 44: PREDICCIÓN INFORMÁTICA DEL EFECTO DE LAS VARIANTES ESTUDIADAS EN LOS SITIOS DE UNIÓN DEL PROMOTOR DE INSIG2 SEGÚN LOS PROGRAMAS MATINSPECTOR Y TRANSFAC. ....	153
FIGURA 45: REPRESENTACIÓN DE LAS VARIANTES ESTUDIADAS EN EL GEN <i>INSIG2</i> MEDIANTE EL PROGRAMA HAPLOVIEW, CON SU LOCALIZACIÓN. . .	156
FIGURA 46: ANÁLISIS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR INSIG2 HUMANO. ....	158
FIGURA 47: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE SREBP1C EN DISTINTOS TEJIDOS. ....	171

TABLA 1: CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE LA DIABETES.....	27
TABLA 2: CATEGORÍAS DIAGNÓSTICAS EN FUNCIÓN DE LA GLUCEMIA EN AYUNAS Y DOS HORAS DESPUÉS DE UNA SOBRECARGA ORAL DE GLUCOSA. ....	29
TABLA 3: SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA EL RASTREO MOLECULAR DEL GEN <i>SREBF1</i> MEDIANTE SSCP.....	81
TABLA 4: OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN LA PCR MULTIPLEX Y EN LA MINISECUENCIACIÓN PARA EL GENOTIPADO DE LAS VARIANTES PRESENTES EN EL GEN <i>SREBF1</i> .....	85
TABLA 5: OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE FRAGMENTOS PARA EL GENOTIPADO DE LAS DELECCIONES ENCONTRADAS EN EL GEN <i>SREBF1</i> .....	87
TABLA 6: OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA PCR MULTIPLEX Y EN LA MINISECUENCIACIÓN PARA EL GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN <i>INSIG2</i> .....	108
TABLA 7: PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ANTROPOMÉTRICOS DE LOS PACIENTES Y CONTROLES. ....	113
TABLA 8: VARIANTES ENCONTRADAS EN EL GEN <i>SREBF1</i> QUE NO FUERON INCLUIDAS EN EL ESTUDIO DE ASOCIACIÓN.....	122
TABLA 9: VARIANTES SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO DE ASOCIACIÓN. LA COLUMNA SNP INDICA LA NOMENCLATURA UTILIZADA EN EL TEXTO.	123
TABLA 10: ASOCIACIÓN MEDIANTE ANALISIS LINEAL UNIVARIANTE DE LA DELECCIÓN IVS1 -11DEL TCC CON PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ANTROPOMÉTRICOS DE PACIENTES CON DM2.....	124
TABLA 11: ESTRUCTURA DE LOS HAPLOTIPOS MAYORITARIOS ENCONTRADOS EN EL GEN <i>SREBF1</i> . ....	127
TABLA 12: PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ANTROPOMÉTRICOS DETERMINADOS EN FAMILIARES DEL PACIENTE EN EL QUE SE IDENTIFICÓ POR PRIMERA VEZ LA VARIANTE 5'UTR-38G>A.....	151
TABLA 13: DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LAS SNPS ESTUDIADAS EN EL GEN <i>INSIG2</i> EN CASOS Y CONTROLES. ....	155
TABLA 14: GENOTIPOS Y FRECUENCIAS DE LOS HAPLOTIPOS DEL GEN <i>INSIG2</i> EN CASOS Y CONTROLES.....	157

TABLA 15: ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO RS7589375T>C CON NIVELES DE INSULINA Y PRESIÓN ARTERIAL EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA EN UN ANÁLISIS UNIVARIANTE REALIZADO MEDIANTE EL PROGRAMA SPSS. .... 159

Aa: **Aminoácidos**  
ACC: **Acetil-CoA Carboxilasa**  
ACTH: Adrenocorticotropina (*Adrenocorticotropic Hormone*)  
ApoA: Apolipoproteína A  
ApoB: Apolipoproteína B  
ATP: Adenosina 5'-trifosfato  
BSA: Albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*)  
Ct: Colesterol total  
DM: **Diabetes mellitus**  
DM2: **Diabetes mellitus tipo 2**  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
dNTP: Deoxinucleótidos 5'-trifosfato (adenosina, citidina, guanosina y timidina)  
EMSA: Ensayo de retardo de movilidad electroforética (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)  
FAS: Ácido graso sintasa (*fatty acid synthase*)  
FBS: Suero bovino fetal (*fetal bovine serum*)  
GAA: **Glucemia en ayunas alterada**  
GK: Glucoquinasa (*Glucokinase*)  
GLUT: Proteína transportadora de glucosa (*Glucose transporter*)  
GSIS: Secreción de insulina estimulada por glucosa.  
HAART: *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*  
HbA1c: Hemoglobina glicosilada  
HDL: Lipoproteína de alta densidad (*high density lipoprotein*)  
HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*  
HGVS: *Human genome variation society*  
HMG CoA: **3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A**  
HNF: Factor nuclear hepático (*Hepatic nuclear factor*)  
HOMA: *Homeostasis Model Assessment*  
HTA: **Hipertensión arterial**  
IG: Intolerancia a la glucosa (*IGT: Impaired glucose tolerance*)  
I $\kappa$ B: Quinasa inhibidora del factor kappa  $\beta$  ( *$\kappa$ B kinase*)  
IKK: Quinasa inhibidora de la quinasa del factor kappa  $\beta$  (*inhibitor of  $\kappa$ B kinase*)  
IL-6: **Interleuquina-6**  
IMC: Índice de masa corporal  
INSIG: *Insulin induced gene*  
IRS: Sustrato del receptor de la insulina (*Insulin receptor substrate*)  
K.O: *Knock-Out*

KSIS: Secreción de insulina estimulada por potasio  
LB: *Luria Broth*  
LDLr: Receptor de las lipoproteínas de baja densidad  
LDL: Lipoproteína de baja densidad (*Low density lipoprotein*)  
LXR: Receptor hepático X (*Liver X receptor*)  
MCS: Sitio de clonación múltiple (*Multiple cloning site*)  
MODY: *Maturity-Onset Diabetes of the Young*  
NEUROD1: *Neurogenic differentiation 1*  
NFκB: Factor nuclear kappa β (*nuclear factor kappa β*)  
PAD: Presión arterial diastólica  
PAS: Presión arterial sistólica  
Pb: Par de bases  
PCSK9: *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*  
PDX-1: *Pancreas duodenum homeobox-1*  
PK: *Piruvate kinase*  
PPAR: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*  
PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados  
RE: Retículo endoplásmico  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
Rpm: **R**evoluciones **p**or **m**inuto  
SDS: Dodecilsulfatosódico  
SEM: Error estándar de la media (*standard error of measurement*)  
SNP: Polimorfismo de un único nucleótido (*Single nucleotide polymorphism*)  
SREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (*sterol regulatory element binding proteins*)  
SSCP: Polimorfismos conformacionales de cadena simple (*Single-strand conformation polymorphism*).  
SSD: Dominio sensor de esteroides (*sterol-sensing domain*)  
STZ: Estreptozotocina  
TBE: Tris-Borate-EDTA  
TG: Triglicéridos  
TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*)  
TTOG: Test de tolerancia oral a la glucosa  
UCP2: *Uncoupling protein-2*  
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad (*Very low density lipoprotein*)  
WT: Silvestre (**W**ild **t**ype)  
5'UTR: Región 5' no traducida  
3'UTR: Región 3' no traducida

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1- DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica originada por un déficit absoluto o relativo de insulina que impide a las células utilizar correctamente la glucosa. En función del origen fisiopatológico del defecto y de si afecta a la secreción pancreática de insulina, a su acción a nivel periférico o a ambas, podemos distinguir diferentes tipos de diabetes (**tabla 1**). En los últimos años la variación en los hábitos de vida ha ocasionado un cambio en los patrones clásicos de aparición de la enfermedad, diagnosticándose diabetes tipo 2 cada vez en pacientes de edad más joven. Por ello, actualmente es necesaria una evaluación completa de todas las características clínico-analíticas del paciente para un diagnóstico inequívoco.

<b>1. DIABETES TIPO I</b>
1.- Tipo 1a o inmune 2.- Tipo 1b o idiopática
<b>2. DIABETES TIPO 2 O DIABETES MELLITUS NO INSULINO-DEPENDIENTE (DM2)</b>
<b>3. OTROS TIPOS ESPECÍFICOS</b>
1.- Defectos genéticos en la función de la célula beta a. Tipo MODY (MODY1: HNF4 $\alpha$ ; MODY2: GK; MODY3: HNF1 $\alpha$ ; MODY4: IPF-1; MODY5: HNF1 $\beta$ ; MODY6: NEUROD1) b. Por transmisión de DNA mitocondrial 2.- Defectos genéticos extrapancreáticos: Insulinorresistencia tipo A, Leprechaunismo 3.- Enfermedades del páncreas exocrino: Pancreatitis, neoplasia, fibrosis quística, hemocromatosis 4.- Endocrinopatías: Acromegalia, síndrome de Cushing, feocromocitoma, glucagonoma, hipertiroidismo, somatostatina, aldosteronoma. 5.- Tóxicos o Fármacos: Glucocorticoides, pentamidina, ácido nicotínico, $\beta$ -adrenérgicos, diazóxido, $\alpha$ -interferón. 6.- Infecciones congénitas: Rubeola congénita, citomegalovirus 7.- Formas no comunes de diabetes autoinmune 8.- Síndromes genéticos asociados con diabetes: Síndromes de Down, Turner, Klinefelter, Wolfram, Prader-Willi, Porfiria, Ataxia de Friederich, Corea de Huntington
<b>4. DIABETES GESTACIONAL</b>

**Tabla 1: Clasificación etiológica de la diabetes.** En el caso de las diabetes tipo MODY se indica el gen responsable de cada subtipo.

Nuestro estudio se ha centrado principalmente en la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y concretamente en la identificación de nuevos genes que puedan modificar la susceptibilidad a esta enfermedad.

## **1.2- DIABETES MELLITUS TIPO 2**

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad heterogénea, compleja y multifactorial que incluye distintas alteraciones metabólicas con un fenotipo final común, la hiperglucemia<sup>1</sup>. Representa un 90-95% de todos los casos de diabetes y afecta aproximadamente al 5% de adultos en países desarrollados. Además, una elevada proporción de individuos presenta resistencia a la insulina, un estado que predispone al individuo a la DM2. De hecho, en la etiología de la enfermedad, el punto central es el desequilibrio entre la sensibilidad a la insulina y la función de la célula  $\beta$ , ambas condicionadas genéticamente<sup>2</sup>.

La DM2 presenta un importante componente genético y ambiental (adquirido)<sup>3-6</sup>. Su herencia es poligénica, lo que implica que para que se manifieste la enfermedad es necesaria la presencia simultánea de diversos defectos genéticos o polimorfismos<sup>7</sup>.

Respecto al componente adquirido, existen tres factores que desempeñan un papel etiopatogénico debido a su relación con la resistencia a la insulina y que están ocasionando un aumento exponencial en la incidencia de la enfermedad en países desarrollados: la longevidad de la población, el incremento de los niveles de sobrepeso, y el estilo de vida sedentario, que implica escaso ejercicio físico y hábitos dietéticos poco saludables. La mayoría de pacientes con DM2 son obesos. La obesidad, especialmente la obesidad abdominal, causa resistencia a la insulina<sup>8</sup> y está determinada genéticamente<sup>9</sup>.

Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de otros factores como el retraso en el crecimiento intrauterino<sup>10</sup>. Evidentemente, este factor también posee un condicionante genético, pero además condiciona el riesgo de DM2 incluso en gemelos dizigóticos o monozigóticos discordantes para la enfermedad<sup>11,12</sup>.

Padecer diabetes implica un mayor riesgo de desarrollar otras muchas enfermedades. La hiperglucemia mantenida, y las alteraciones lipídicas generalmente asociadas a la diabetes favorecen el desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares, generadoras de daño y disfunción en diferentes órganos, especialmente en ojos, riñones, nervios, corazón y

vasos sanguíneos. Si estas complicaciones no se tratan adecuadamente acortan la esperanza de vida del paciente.

El Síndrome metabólico o “Síndrome X” engloba un grupo de estados patológicos asociados a la resistencia a insulina como son la obesidad abdominal, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia y disminución del colesterol HDL. Aunque la relevancia de su diagnóstico es discutible, este síndrome constituye un factor de riesgo para desarrollar DM2 y cardiopatía isquémica.

En cuanto al diagnóstico de la DM2, se detecta un pico máximo a los 60-70 años, siendo la distribución por sexos aparentemente homogénea (46% varones y 54% mujeres). Su diagnóstico diferencial es clínico, sospechándose en mayores de 30 años con antecedentes familiares y ausencia de cetosis en situaciones de estrés.

Se definen cuatro categorías diagnósticas en función del nivel de glucemia en plasma venoso, asociadas a riesgos progresivamente crecientes de desarrollar diabetes y enfermedad cardiovascular (**tabla 2**)

Situación	Glucemia basal (mg/ml)	2h tras TTOG (mg/ml)
Normoglucemia	>60 y <110	<140
Glucemia en ayunas alterada (GAA)	≥110 y <126	-
Intolerancia a la glucosa (IG)	-	≥140 y <200
Diabetes mellitus (DM)	≥126	≥200

**Tabla 2: Categorías diagnósticas en función de la glucemia en ayunas y dos horas después de una sobrecarga oral de glucosa.** TTOG: Test de tolerancia oral a la glucosa.

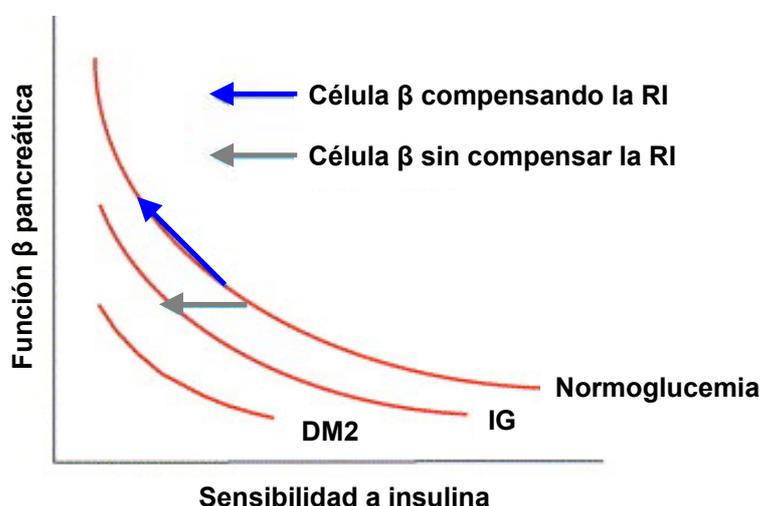
La glucemia en ayunas alterada (GAA) o la intolerancia a la glucosa (IG) pueden considerarse estados prediabéticos o de alto riesgo ya que frecuentemente son estados intermedios en la historia natural de la enfermedad. Otros factores de riesgo para desarrollar DM2 son:

- Historia familiar de diabetes
- Sobrepeso (IMC>25)
- Inactividad física habitual
- Raza/Etnia (Afro-americanos, hispano-americanos, americanos nativos, asio-americanos, habitantes de islas del pacífico)
- Hipertensión (≥140/90 mmHg en adultos)

- HDL colesterol  $\leq 35$ mg/dl y/o triglicéridos  $\geq 250$ mg/dl
- Historia previa de diabetes gestacional o feto macrosómico
- Síndrome de ovario poliquístico

### **1.3- DM2: MECANISMOS MOLECULARES DE PATOGÉNESIS**

El control de la glucemia en el organismo está garantizado gracias al equilibrio entre “secreción de insulina” y “acción de la insulina”. En condiciones normales, la célula  $\beta$  pancreática puede compensar una menor sensibilidad a la insulina aumentando su secreción, de forma que existe una relación curvilínea entre la función de la célula  $\beta$  y la sensibilidad a la insulina<sup>13</sup>. Cuando en un individuo disminuye esta capacidad de adaptación se produce una desviación de esta hipérbola y, en consecuencia, una disminución en el control de la glucemia que puede manifestarse clínicamente como DM2 o menos severamente como IG (**figura 1**). Incluso en este último caso, las concentraciones de glucosa en ayuno y 2h después de una ingesta aumentarán ligeramente<sup>14</sup>. Este aumento puede ser pequeño pero con el tiempo es en sí mismo una posible causa de disfunción  $\beta$  pancreática debido al efecto tóxico de la hiperglucemia.



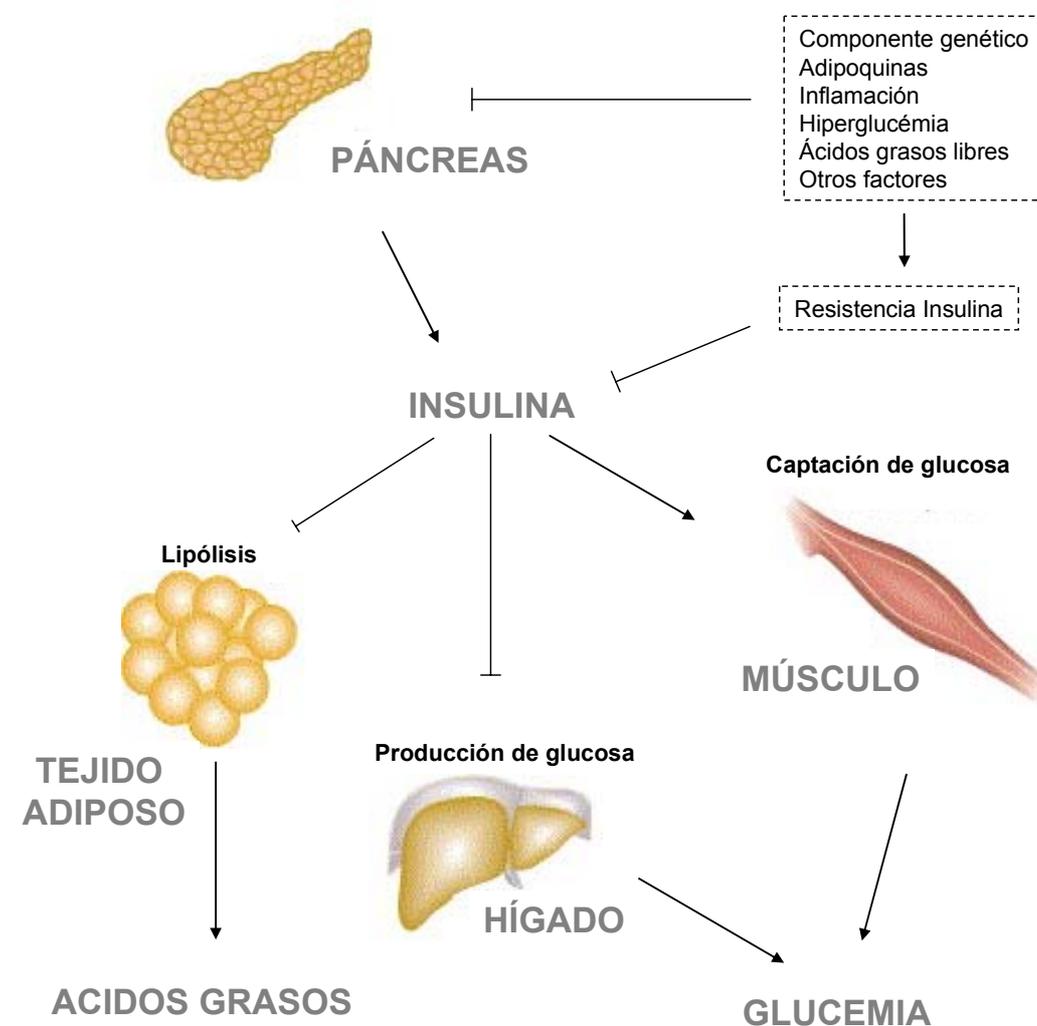
**Figura 1: Relación hiperbólica entre la función  $\beta$  pancreática y la sensibilidad a la insulina.** Una desviación de esta curva ocasiona un control deficiente de la glucemia y se manifiesta clínicamente como DM2 o como Intolerancia a la glucosa (IG). RI: Resistencia a insulina. Figura adaptada de<sup>15</sup>.

En general, la resistencia a la insulina es un fenómeno que ocurre en las fases tempranas de la enfermedad, mientras que la funcionalidad de la célula  $\beta$  pancreática disminuye antes del comienzo de la hiperglucemia clínica y declina gradualmente siendo causa y efecto del desarrollo de la enfermedad. Tanto la sensibilidad a la insulina como la función  $\beta$  pancreática tienen un importante componente genético<sup>16,17</sup>. La adaptación  $\beta$  pancreática valorada como la respuesta de insulina en relación con la sensibilidad a la insulina en familiares de pacientes con DM2, que presenten IG o normoglucemia también tiene un alto componente hereditario<sup>18</sup>.

### **1.3-1. Resistencia a la insulina**

Las variaciones interindividuales en la sensibilidad a la insulina se deben a un importante componente genético<sup>19</sup>, pero además están influenciadas por múltiples factores adquiridos entre los que se incluyen: edad<sup>20,21</sup>, estado físico<sup>22,23</sup>, dieta<sup>24</sup>, tratamiento farmacológico<sup>25-27</sup>, obesidad<sup>28-33</sup> y distribución corporal de la grasa<sup>34-40</sup>.

La resistencia a la insulina se define como un estado en el que los efectos biológicos de esta hormona son menores de los esperados, principalmente respecto a la utilización de glucosa y síntesis de glucógeno por el músculo esquelético, la supresión de la producción endógena de glucosa, especialmente por el hígado<sup>41</sup>, o en la supresión de la lipólisis en el tejido adiposo (**figura 2**).



**Figura 2: Principales tejidos implicados en el metabolismo glucolipídico regulado por insulina, con implicaciones en la etiopatogenia de la DM2.** Figura adaptada de<sup>15</sup>.

La insulina desencadena diversas respuestas metabólicas pleiotrópicas, uniéndose y activando a un receptor específico de la membrana plasmática, con actividad tirosina-quinasa<sup>42</sup>. Los sustratos de este receptor, principalmente las proteínas IRS (insulin receptor substrate), son fosforilados en sus residuos de tirosina de forma que servirán como anclaje a proteínas adaptadoras que activarán distintas rutas de señalización (**figura 3**).

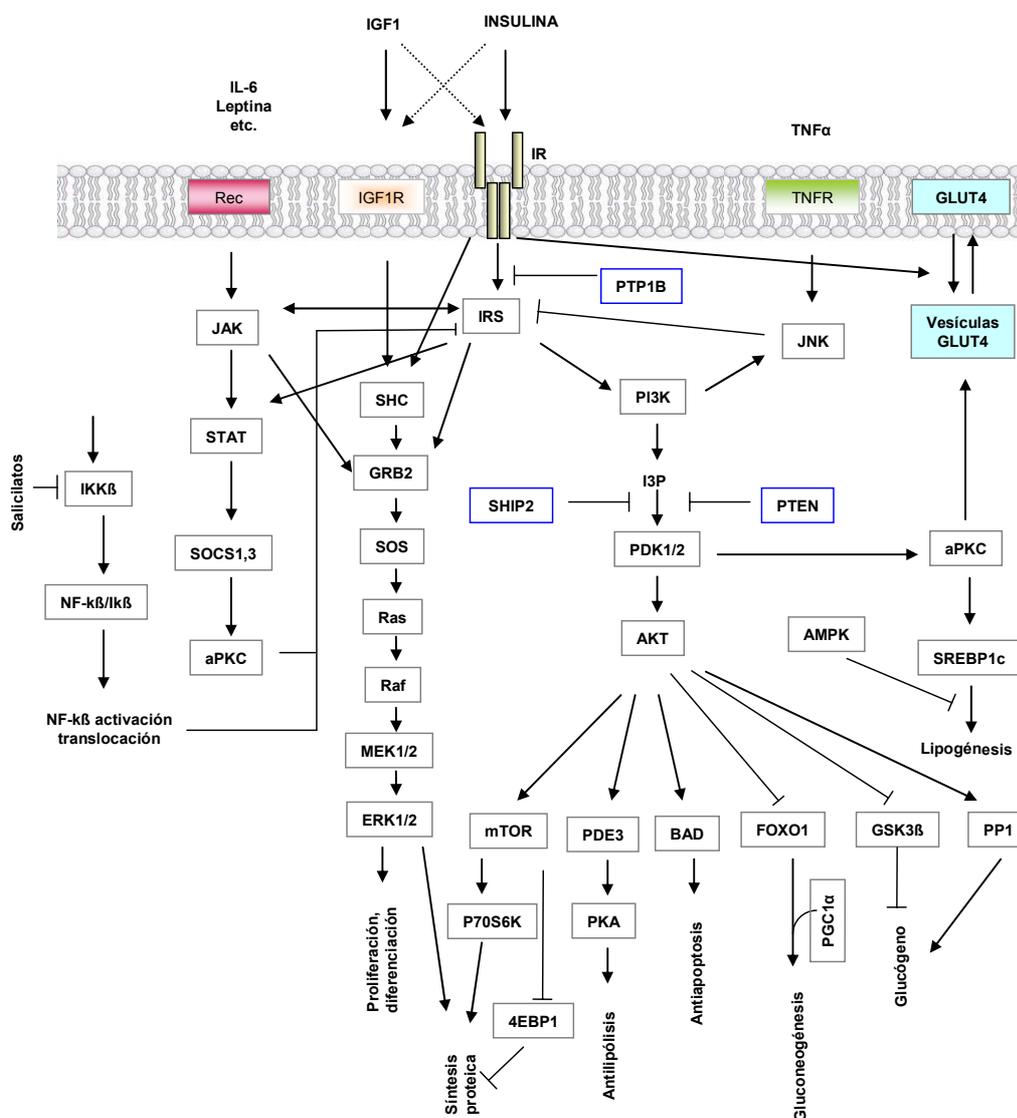


Figura 3: Representación esquemática de las principales rutas de señalización de la insulina.

El bloqueo de uno o varios puntos de estas rutas de señalización constituye uno de los mecanismos de resistencia a la insulina. Por ejemplo, los efectos positivos en la señalización ejercidos por la fosforilación de tirosinas del

propio receptor y de las proteínas IRS, son bloqueados por la defosforilación de las cadenas laterales de tirosinas por tirosina-fosfatasas y por la fosforilación de treoninas y serinas, eventos que normalmente ocurren simultáneamente<sup>43</sup>.

La supresión de la señalización de insulina también puede ocurrir a través de una internalización o pérdida del receptor de insulina de la superficie celular y por degradación de las proteínas IRS<sup>44</sup>. Los miembros de la familia de proteínas SOCS (supresor of cytokine signalling) participan en la degradación de IRS a través de la vía ubiquitin-proteasoma<sup>45</sup>.

Se han descrito numerosas situaciones fisiopatológicas en las que puede producirse un bloqueo de estas rutas de señalización desencadenando algún grado de resistencia a la insulina. En los siguientes apartados se describirán algunas de estas situaciones como la obesidad, procesos inflamatorios o fenómenos de estrés oxidativo.

### **1.3-1.1. Obesidad y resistencia a la insulina**

La obesidad es la causa más común de resistencia a insulina y DM2. Simplemente el sobrepeso (IMC>25) multiplica por tres el riesgo de desarrollar DM2<sup>46</sup>.

La obesidad refleja un desequilibrio en el que la energía ingerida excede a la consumida, y es almacenada en forma de grasa, lo que ocasiona la expansión del tejido adiposo.

La insulina actúa sobre el tejido adiposo a tres niveles: (i) favoreciendo la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros; (ii) estimulando el transporte de glucosa y la lipogénesis (síntesis de triglicéridos) y (iii) inhibiendo la lipólisis. Además, la insulina también aumenta la captación de ácidos grasos desde lipoproteínas circulantes estimulando la actividad de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo.

Si el tejido adiposo se expande excesivamente los adipocitos se hipertrofian y se hacen más sensibles al efecto lipolítico de las catecolaminas y menos sensibles a la insulina. La pérdida de sensibilidad a la insulina hace que esta no inhiba eficazmente la lipólisis aumentando los niveles plasmáticos de ácidos grasos y glicerol. Por tanto existe un umbral condicionado por factores genéticos y adquiridos en el que se satura la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo, de forma que el exceso de grasa se redirige a depósitos ectópicos en otros órganos como el hígado, páncreas o

músculo. En estos órganos la acumulación de lípidos intracelulares ejerce un efecto tóxico e induce la resistencia a la insulina, fenómeno conocido como lipotoxicidad<sup>47-54</sup>.

A este respecto existen importantes diferencias biológicas entre la grasa subcutánea, localizada bajo la piel, y la intraabdominal o visceral que rodea a los órganos gastrointestinales, siendo esta más activa lipolíticamente. Estas diferencias hacen que respecto a las implicaciones metabólicas sea más importante la distribución corporal de la grasa que su cantidad absoluta. El tejido adiposo no se limita a almacenar grasa sino que realmente actúa como una glándula endocrina liberando hormonas (adiponectina, leptina, resistina, RBP4-retinol binding protein-4), citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6) y otras sustancias activas (plasminogen activator inhibitor-1 o PAI-1), que transmiten conjuntamente a los diferentes tejidos del organismo la información respecto a los cambios en masa y estado energético del tejido adiposo y modulan la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo, músculo o hígado, permitiendo un control metabólico coordinado<sup>55</sup>.

La expansión del tejido adiposo, especialmente la grasa visceral, produce una alteración en el patrón de secreción de estas moléculas. Principalmente, se incrementa la liberación de citoquinas inflamatorias, como TNF $\alpha$  e IL-6, que afectan negativamente a la señalización de la insulina<sup>56,57</sup>. TNF $\alpha$  actúa disminuyendo la lipogénesis y aumentando la lipólisis adipocitaria lo cual podría considerarse un mecanismo de retroalimentación para evitar el excesivo acumulo de energía aunque finalmente provoca un mayor aumento en los ácidos grasos libres. Por su parte, la IL-6 es una molécula proinflamatoria que inhibe la señal de la insulina aumentando la expresión de las proteínas SOCS<sup>58,59</sup>. Además, disminuye la liberación de adiponectina, que aumenta la sensibilidad a la insulina en hígado (disminuye la gluconeogénesis) y músculo a través de la AMP quinasa (promoviendo la oxidación de ácidos grasos y disminuyendo la lipogénesis)<sup>56,60</sup>. La adiponectina también contrarresta los efectos proinflamatorios de TNF $\alpha$  en la pared arterial y probablemente protege frente al desarrollo de arteriosclerosis<sup>61</sup>.

El aumento en la liberación de PAI-1 también se ha asociado con un aumento en los procesos de arteriosclerosis<sup>62</sup>.

Por su parte, la leptina aumenta la sensibilidad a la insulina actuando (i) a través del hipotálamo, modificando el apetito y por tanto el flujo de nutrientes, y (ii) directamente sobre el tejido adiposo, músculo, hígado o

células  $\beta$ , aumentando la oxidación de lípidos y disminuyendo su síntesis<sup>63-65</sup>.

Como se ha comentado, los factores circulantes liberados por el tejido adiposo modulan la función del endotelio vascular, constituyendo un nexo entre el aumento del riesgo vascular característico del síndrome metabólico y los mecanismos de resistencia a la insulina<sup>60,66</sup>. Estos factores circulantes también reclutan y activan células inflamatorias que pueden perpetuar un entorno inflamatorio sistémico que afecta de manera importante la función vascular, aumentando el riesgo de aterogénesis y deteriorando la sensibilidad a la insulina<sup>67</sup>.

### 1.3-1.2. Ácidos grasos y resistencia a la insulina

La concentración plasmática de ácidos grasos libres refleja un balance entre su liberación (lipólisis intravascular de lipoproteínas ricas en triglicéridos y la lipólisis de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo) y su captación (fundamentalmente reesterificados en el tejido adiposo e hígado y oxidados en el músculo esquelético, corazón, hígado y otros tejidos). En el periodo de ayunas, la concentración de ácidos grasos libres depende principalmente de su entrada en la circulación debida a la lipólisis, pero tras la ingesta depende mayoritariamente de la tasa de captación por el tejido adiposo.

En descendientes de pacientes con DM2, un parámetro metabólico comúnmente alterado es la concentración plasmática de ácidos grasos, que está aumentada respecto a los controles<sup>68</sup>. En estos individuos, la resistencia a la insulina se correlaciona con los niveles de ácidos grasos en plasma, y no con otros indicadores del estatus metabólico. Esta correlación negativa con la sensibilidad a la insulina todavía es más evidente si se considera los lípidos intramiocelulares.

La elevación de ácidos grasos plasmáticos en pacientes con resistencia a insulina se conoce desde hace décadas<sup>69</sup> aunque el mecanismo que se postulaba era incorrecto. Estudios de resonancia magnética nuclear realizados en voluntarios sanos han demostrado que los ácidos grasos inducen resistencia a insulina en músculo esquelético inhibiendo la activación del transporte de glucosa mediado por insulina<sup>70,71</sup>, y no mediante la inhibición de la piruvato deshidrogenasa<sup>72</sup> o la glucógeno sintasa<sup>73</sup>.

En condiciones normales, la estimulación de la actividad GLUT-4 por insulina en músculo esquelético ocurre mediante la fosforilación de IRS-1 que le permite unirse y activar a PI-3-quinasa y ésta a su vez a GLUT-4<sup>71</sup>.

Una elevación de los ácidos grasos plasmáticos en humanos suprime la activación de PI-3-quinasa mediada por IRS-1<sup>71</sup>. Estudios en ratas demuestran que la infusión de metabolitos lipídicos activa la proteína quinasa C (PKC)- $\theta$ , quien a través de una cascada de serina-treonina quinazas, elimina la fosforilación de tirosinas en IRS-1 mediada por insulina y finalmente resulta en una disminución del 50% en la estimulación de la actividad PI-3-quinasa<sup>74</sup>. Además, ratones *knock out* para PKC- $\theta$  están protegidos frente a la resistencia a la insulina mediada por lípidos en músculo esquelético<sup>75</sup>.

Estos hallazgos sugieren que mecanismos similares intervienen en resistencia a la insulina inducida por lípidos en el hígado, donde la acumulación de metabolitos lipídicos intracelulares activa una cascada de serina quinazas en la que interviene PKC- $\epsilon$ , y que provoca una disminución en la fosforilación de tirosinas en IRS-2, un mediador clave en la acción de la insulina en el metabolismo hepático<sup>76,77</sup>. Estudios recientes sugieren que el diacilglicerol, un conocido activador de PKC- $\epsilon$ , podría ser el mediador de este efecto<sup>78</sup>.

### 1.3-1.3. Inflamación y resistencia a la insulina

Existe una estrecha conexión entre la resistencia a la insulina y las clásicas rutas de señalización de inflamación. De hecho, altas dosis de salicilatos pueden disminuir la hiperglucemia y la resistencia a la insulina en diabetes y obesidad<sup>79,80</sup> a través de un bloqueo de la actividad IKK<sup>81</sup>. De esta forma no podrá fosforilar a I $\kappa$ B evitando que este permita la translocación al núcleo del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). De hecho, las citoquinas inflamatorias liberadas por el tejido adiposo alteran la actividad de IKK y por tanto de NF $\kappa$ B<sup>80</sup>. El mecanismo de modulación de la acción de la insulina a través de la ruta NF $\kappa$ B/IKK todavía no se conoce con exactitud, pero numerosos trabajos sugieren que la activación ligera pero crónica del sistema inmune participa en la etiología de la DM2. Además se ha demostrado que elevados niveles de marcadores de inflamación como ácido siálico, inmunoglobulinas séricas y células blancas se asocian con el riesgo de desarrollar DM2<sup>82-87</sup>.

La acumulación de ácidos grasos en células de músculo esquelético es uno de los mecanismos de aparición de resistencia a insulina en este tejido. Se ha postulado que en este fenómeno intervienen procesos inflamatorios ya

que la disrupción genética de IKK $\beta$  revierte la resistencia a la insulina a través de un aumento en la fosforilación de tirosinas de IRS-1 y activación de su ruta de señalización<sup>88</sup>.

Esto sugiere que IKK podría ser una importante diana para el desarrollo de nuevos fármacos para la terapia de la resistencia a la insulina, especialmente en casos que cursen con una expansión del tejido adiposo visceral, que como hemos comentado, provoca la liberación de adipocinas proinflamatorias.

#### **1.3-1.4. Metabolismo mitocondrial**

La frecuente acumulación de triglicéridos en depósitos ectópicos sugiere que existe un defecto en la oxidación mitocondrial de lípidos en pacientes con DM2.

La pérdida de función mitocondrial predispone a una acumulación lipídica intramiocelular que como se ha descrito es una causa de la resistencia a la insulina<sup>89</sup>.

Se ha sugerido que un defecto heredado en la fosforilación oxidativa mitocondrial podría causar la acumulación lipídica<sup>90</sup>. De hecho, la expresión de PGC1 (PPAR $\gamma$  co-activator 1), un factor de transcripción de genes implicados en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos y en la síntesis de ATP, está disminuida en individuos con resistencia a la insulina y DM2<sup>91,92</sup> así como en individuos jóvenes insulinoresistentes no obesos descendientes de pacientes con DM2.

Un mecanismo similar podría relacionar la pérdida de función mitocondrial asociada al envejecimiento con la resistencia a la insulina asociada a la edad.

Además, la oxidación mitocondrial está implicada en el aporte energético necesario para la función  $\beta$  pancreática, por lo que la disfunción mitocondrial se ha asociado con alteraciones en la secreción de insulina<sup>93</sup>.

#### **1.3-2. Secreción de insulina: Disfunción de la célula $\beta$ pancreática**

La glucosa es rápidamente captada por el transportador GLUT-2 en las células  $\beta$  pancreáticas, tras lo cual sufre una fosforilación vía glucoquinasa que constituye el paso limitante del metabolismo  $\beta$  pancreático de la glucosa.

La posterior degradación lleva a la producción de piruvato que entra en la mitocondria y es metabolizado para producir ATP. Este ATP generará la energía necesaria para la despolarización de la membrana celular y para la liberación de insulina. El ratio ADP/ATP activa a la proteína SUR1 (**sulphonylurea receptor 1**) que cerrará el canal de potasio adyacente llamado KIR6.2 (**potassium-K<sup>+</sup> inward rectifier 6.2**) alterando así el potencial de membrana y, como consecuencia, abriendo los canales de calcio, lo que dispara la liberación de los gránulos de insulina previamente formados. En condiciones normales, la secreción de insulina por la célula  $\beta$  es un proceso complejo modulado por numerosas variables como la naturaleza y cantidad del secretagogo, la ruta de administración, la concentración de glucosa en el momento del estímulo o el grado de sensibilidad a la insulina<sup>94-96</sup>. La glucosa es el estímulo principal para la secreción de insulina, aunque existen otros:

- Aminoácidos
- Hormonas tales como: adrenocorticoides, glucocorticoides, tiroxina, estrógeno, ACTH, hormona del crecimiento
- Estimulación vagal
- Sulfonilureas, que actúan cerrando los canales de potasio y por tanto aumentando la secreción de insulina. Este efecto lo producen también a bajas concentraciones de glucosa por lo que existe un riesgo potencial de hipoglucemia
- Cuerpos cetónicos

Para mantener constante la tolerancia a la glucosa, cuando la sensibilidad a la insulina varía debe existir una adaptación proporcional en la liberación de insulina, ajustándose a la función hiperbólica descrita en la **figura 1**. Aunque el mecanismo de esta adaptación no se conoce completamente parece debida a cambios en la capacidad secretora de la célula  $\beta$  y no en su sensibilidad a la glucosa<sup>27,94</sup>.

La insulina pancreática se secreta directamente en la circulación portal y es transportada al hígado, donde se degrada el 50% de la insulina. El aclaramiento hepático de la insulina depende de la unión de ésta a su receptor de forma que los factores que aumenten la degradación del receptor o que disminuyan su expresión pueden causar un aumento en la insulina disponible para tejidos periféricos. La circulación periférica transporta entonces la insulina hasta otros tejidos y finalmente al riñón, donde se degrada otro 25% y se produce la excreción.

Los ácidos grasos libres liberados por parte del tejido adiposo visceral son drenados directamente a la porta y provocan una reducción en el aclaramiento hepático de insulina, lo cual podría considerarse como un mecanismo de adaptación para generar hiperinsulinemia periférica y compensar la resistencia periférica a insulina inducida por los propios ácidos grasos libres. Este mecanismo podría aliviar en parte el estrés impuesto por la resistencia a la insulina en las células  $\beta$  pancreáticas<sup>97</sup>.

En estudios controlados en idénticas condiciones de glucemia se ha demostrado que la secreción de insulina es marcadamente inferior en pacientes con DM2 que en individuos no diabéticos con similares características antropométricas<sup>98</sup>. A pesar de ello, la concentración de insulina basal o tras la ingesta puede estar aumentada en pacientes, especialmente en pacientes obesos hiperglucémicos debido al aumento en la glucosa plasmática.

La hiperglucemia en sí misma deteriora la función  $\beta$  pancreática; pero incluso antes de la instauración de la hiperglucemia se han demostrado defectos en la secreción de insulina, posiblemente de origen genético<sup>99</sup>, en individuos con predisposición a la DM2. Factores como la obesidad, enfermedades agudas o el envejecimiento pueden hacer que se manifieste o agrave este defecto, desencadenando la instauración de la diabetes<sup>98</sup>. En indios Pima, un grupo conocido por su resistencia a la insulina, se demostró que una secreción de insulina disminuida determinaba la transición de un estado normal a un estado de IG; por otro lado, los individuos que eran capaces de aumentar progresivamente su secreción de insulina, no evolucionaban hacia una diabetes manifiesta<sup>100</sup>.

Por tanto, independientemente de la etiología de la resistencia a la insulina, la evolución hacia la DM2 manifiesta dependerá de la distinta capacidad de adaptación  $\beta$  pancreática que estará condicionada por factores genéticos y adquiridos.

El deterioro en la función  $\beta$  pancreática se manifiesta en muchos procesos como la disminución en la respuesta de insulina a glucosa intravenosa<sup>101-103</sup> y en la habilidad de glucosa para potenciar la respuesta de insulina a otros secretagogos como la arginina<sup>95,96</sup>, hormonas como secretina<sup>104</sup>, un  $\beta$ -adrenérgico como el isoproterenol<sup>104</sup> y sulfonilureas como la tolbutamida<sup>105</sup>.

### **1.3-2.1. Glucotoxicidad y función $\beta$ pancreática**

Este término apareció tras la comprobación de que la hiperglucemia podía por sí misma disminuir la secreción de insulina debido a la generación de un daño irreversible y progresivo en los mecanismos de producción de insulina<sup>106,107</sup>. De hecho, el deterioro de la secreción de insulina es la progresión habitual en la mayoría de pacientes, que terminarán con una deficiencia en insulina más o menos severa tras diez años de diabetes<sup>108</sup>.

En las células  $\beta$ , el metabolismo oxidativo de la glucosa produce especies reactivas de oxígeno (ROS), normalmente detoxificadas por la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa<sup>106</sup>. La hiperglucemia sostenida produce numerosas ROS en células  $\beta$ , con el consecuente daño a los componentes celulares, como por ejemplo el factor PDX-1 (pancreas duodenum homeobox-1), un regulador de la actividad del promotor de la insulina, lo cual se ha propuesto como un importante mecanismo de disfunción  $\beta$  pancreática<sup>106</sup>. Además, la acumulación de ROS en la mitocondria resulta en una activación de la proteína UCP2 que conlleva un aumento en el flujo de protones a través de la membrana mitocondrial interna, reduciendo la fuerza electromotriz y por tanto la producción de ATP que promueve la activación de los canales  $K_{ATP}$ , la hiperpolarización de la membrana y la inhibición de la secreción de insulina.

Por otro lado, la producción de ROS provoca un aumento en la actividad de NF $\kappa$ B que induce la apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas.

### 1.3-2.2. Lipotoxicidad y función $\beta$ pancreática

Tras el concepto de glucotoxicidad, se ha propuesto más recientemente el de lipotoxicidad. Este término se ha introducido brevemente al hablar de la etiología de la resistencia a la insulina pero también desempeña un papel importantísimo en el deterioro de la función  $\beta$  pancreática.

El efecto agudo de los ácidos grasos es promover la secreción de insulina aumentando la respuesta pancreática a distintos secretagogos<sup>109</sup> pero tras 24 horas la inhiben<sup>110</sup>.

En presencia de glucosa, la oxidación de ácidos grasos en células  $\beta$  está inhibida y se produce una acumulación de acyl coenzima A de larga cadena<sup>111</sup>. Este mecanismo forma parte del proceso normal de secreción de insulina. No obstante los acyl coenzima A de larga cadena pueden por sí mismos disminuir la secreción de insulina abriendo los canales de potasio de las células  $\beta$  y/o aumentando la expresión de UCP2. Un tercer mecanismo podría ser la apoptosis de células  $\beta$  posiblemente debida a la generación de óxido nítrico o a la síntesis de ceramidas inducida por ácidos grasos o

triglicéridos. Los fenómenos de lipotoxicidad también podrían promover la formación de islotes amiloides que a su vez ejercen un efecto citotóxico aumentando la producción de radicales libres<sup>112,113</sup>.

## **1.4- GENÉTICA DE LA DIABETES TIPO 2**

En los últimos años se han realizado numerosos avances en la identificación de los genes responsables de diabetes monogénicas con un patrón de herencia mendeliana como las MODY, diabetes secundarias a síndromes genéticos y diabetes originadas por alteraciones en el ADN mitocondrial.

El componente genético de la DM2 es indudable, debido a evidencias como (i) el patrón de herencia observado en familias con diabetes monogénicas<sup>114</sup>, (ii) la alta prevalencia de DM2 en determinados grupos étnicos y su modificación por la “mezcla” genética<sup>115,116</sup>, (iii) la diferencia en la tasa de concordancia entre gemelos monozigóticos o dizigóticos<sup>117,118</sup> y (iv) por los resultados de numerosos estudios de ligamiento (revisado por Florez y col.<sup>119</sup>)

No obstante, a pesar de estas evidencias, todavía no se han identificado los principales genes responsables<sup>120,121</sup>. Probablemente, la extraordinaria dificultad encontrada para identificar estos genes esté originada por dos hechos:

(i) El componente genético de las formas más comunes de DM2 es complejo e implica la interacción de múltiples genes y factores ambientales.  
(ii) Cualquier factor genético o ambiental que altere los mecanismos moleculares involucrados en el control de la glucemia puede desembocar en un fenotipo que diagnosticamos como DM2, por lo que es una patología enormemente heterogénea. Por ejemplo, el tratamiento con glucocorticoides o la sobrecarga de hierro pueden ocasionar un estado de hiperglucemia crónica, difícilmente distinguible de la DM2. Igualmente individuos portadores de variantes responsables de diabetes monogénicas son ocasionalmente diagnosticados como DM2 general siendo adultos<sup>121</sup>.

Todo esto sugiere que el avance en el conocimiento de los condicionantes moleculares de esta enfermedad requiere el estudio de subgrupos de pacientes más homogéneos tanto en sus características clínicas como en sus condicionantes ambientales. Este hecho aparentemente sencillo conlleva actualmente una gran dificultad debido a la imprecisión para valorar en las poblaciones de estudio el efecto de la dieta, actividad física y otros factores

ambientales que pueden atenuar e incluso enmascarar los efectos de una determinada variante genética<sup>121</sup>.

A pesar de estas dificultades, el estudio del genoma humano ha permitido identificar algunos de estos genes de susceptibilidad para DM2. Principalmente esto se ha conseguido aplicando dos estrategias: (i) La aproximación del gen candidato, basada en el estudio de genes con un probable papel en la enfermedad en base al conocimiento de su función. Para ello se comparará la prevalencia de un determinado alelo, genotipo o haplotipo entre los individuos afectados y sanos no relacionados, en un estudio caso-control; (ii) El análisis de ligamiento, basado en que miembros de una familia que compartan un fenotipo también compartirán las regiones cromosómicas que flanqueen el gen responsable de dicho fenotipo.

Los estudios realizados mediante análisis de ligamiento sugieren que existen *loci* en las regiones 1q21-24, 1q31-q42, 2q, 5q, 8p, 9q21, 10q23, 11p15, 11q13-14, 12q12, 19q13 y 20q11-q13 que contienen genes implicados en la susceptibilidad a la DM2 o rasgos metabólicos cuantitativos asociados a la enfermedad<sup>122,123</sup>.

La posterior clonación posicional ha permitido identificar como genes implicados en la susceptibilidad de la DM2 a factores de transcripción como HNF4 $\alpha$ <sup>124,125</sup> y TCF7L2<sup>126</sup> y principalmente a la calpaina-10 (CAPN10)<sup>127,128</sup>.

La calpaina-10 es una cisteína-proteasa expresada ubicuamente y codificada por el gen *CAPN10* localizado en el cromosoma 2q37. Variantes en este gen podrían afectar a la sensibilidad a la insulina<sup>129</sup>, a su secreción<sup>130</sup>, o a la relación entre ambas<sup>131</sup>.

El gen *EPP1* situado en el cromosoma 6q se ha asociado recientemente a DM2 y a obesidad, sugiriendo que podría intervenir en alteraciones moleculares comunes a ambas patologías<sup>132-135</sup>, aunque otros estudios no han confirmado esta asociación<sup>133,136-140</sup>.

La estrategia del gen candidato ha permitido identificar genes de susceptibilidad en distintas poblaciones, principalmente PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) y KIR6.2 (Potassium inward rectifier 6.2; *KCNJ11*)

PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción activado por ciertos ácidos grasos, prostanoides y tiazolidinedionas<sup>141-143</sup>. La isoforma  $\gamma 1$  se expresa en la mayoría de tejidos, mientras que la  $\gamma 2$  es específica del tejido adiposo, donde tiene un papel fundamental en la regulación de la diferenciación adipocitaria<sup>144</sup>. El polimorfismo Pro12Ala en PPAR- $\gamma$  es hasta la fecha la variante que más robustamente se ha asociado con DM2. El alelo

minoritario es el correspondiente a la alanina y se asocia con una mayor sensibilidad a la insulina y con una reducción del riesgo de DM2 entre 21 y 27%<sup>145-150</sup>.

La variante Glu23Lys en KIR6.2 se ha asociado con DM2. El alelo mutado provoca una disminución en la secreción de insulina aumentando un 25% el riesgo de esta enfermedad<sup>151</sup>. Un reciente análisis de haplotipos refuerza la implicación de variantes en este gen en DM2<sup>152</sup>. No obstante la proximidad de este gen con el gen *SURI* (**S**ulfonylurea **r**eceptor-1) también asociado a DM2<sup>151</sup> y el desequilibrio de ligamiento entre variantes de ambos genes, dificulta el estudio de la contribución de cada uno de ellos independientemente.

Respecto al sustrato del receptor de la insulina, el polimorfismo Gly972Arg en IRS-1 está asociado con DM2<sup>145</sup> posiblemente a través de una disfunción  $\beta$  pancreática<sup>153,154</sup>.

El polimorfismo Gly483Ser en PGC1 $\alpha$  también parece estar asociado a DM2 por mecanismos poco esclarecidos<sup>155</sup>.

El alelo de clase III de VNTR que consiste en una repetición minisatélite muy polimórfica situada en las proximidades del gen de la insulina (cromosoma 11p15) se ha relacionado con una disminución en la expresión del gen de la insulina cuando el alelo es transmitido por el padre. Se ha propuesto que este alelo podría estar asociado con un retraso en el crecimiento intrauterino y con DM2<sup>156,157</sup>. Este hecho señala la posible influencia del fenómeno de *imprinting* materno en la DM2.

Como se ha comentado anteriormente, está aceptado que la contribución de las variantes en estos genes no justifica completamente el componente genético de la enfermedad, por tanto es necesario identificar otros genes implicados. Para la selección de nuevos genes candidatos se siguen principalmente dos criterios:

I.- Los genes implicados en formas de diabetes monogénicas altamente penetrantes son buenos genes candidatos para DM2<sup>158</sup>. Este criterio se basa en que si mutaciones raras con gran repercusión funcional en una determinada proteína provocan fenotipos extremos, como diabetes monogénicas, variantes más sutiles pero frecuentes que afecten a la estructura, función o expresión de esta proteína, podrían determinar la susceptibilidad a DM2 y viceversa.

Esta aproximación hasta ahora ha funcionado en algunos genes como la isoforma  $\gamma 2$  del factor PPAR $\gamma$ , KIR6.2 o el factor de transcripción HNF4 $\alpha$ <sup>151,159-163</sup>.

II.- Otro criterio se basa en el creciente conocimiento de los mecanismos de secreción y acción de la insulina en los distintos tejidos, expansión del tejido adiposo etc. Alteraciones en genes implicados en estos mecanismos repercutirán en la homeostasis energética del organismo y en la susceptibilidad a distintas enfermedades metabólicas. Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que una alteración en el metabolismo de los ácidos grasos es un factor común a muchos fenómenos característicos de la diabetes tipo 2, como son la resistencia periférica a insulina, el aumento de la gluconeogénesis hepática, pérdida de secreción de insulina inducida por glucosa y obesidad. Más aún, independientemente de la causa original de la hiperglucemia, la glucolipototoxicidad contribuye a la pérdida de función  $\beta$  pancreática. Por tanto, genes implicados en la homeostasis lipídica parecen buenos candidatos para condicionar la susceptibilidad a resistencia a insulina y DM2. Este segundo criterio es el que se ha empleado para la selección de nuestros genes candidatos, *SREBF1* e *INSIG2*.

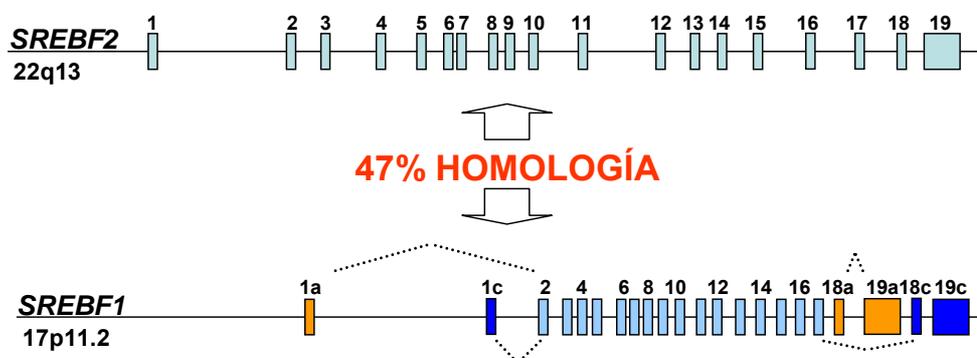
## **1.5- PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ELEMENTO DE RESPUESTA A ESTEROLES (SREBP)**

### **1.5-1. Caracterización y estructura**

Las proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBPs; Sterol-Regulatory Element Binding Proteins; MIM #184756) constituyen una familia de factores de transcripción que coordinan el metabolismo lipídico del organismo. Fueron clonados independientemente por dos grupos trabajando en la diferenciación adipocitaria<sup>164</sup> y en el metabolismo del colesterol por su capacidad de unirse a elementos de respuesta a esteroides "SRE" presentes en el promotor de genes implicados en la síntesis y captación de colesterol<sup>165</sup>.

La familia SREBP está constituida por tres miembros: SREBP1a, SREBP1c y SREBP2. En humanos, SREBP2 está codificado por el gen *SREBF2*, localizado en el cromosoma 22q13. Los otros dos miembros, SREBP1a y 1c son productos de un gen común (*SREBF1*) localizado en el cromosoma

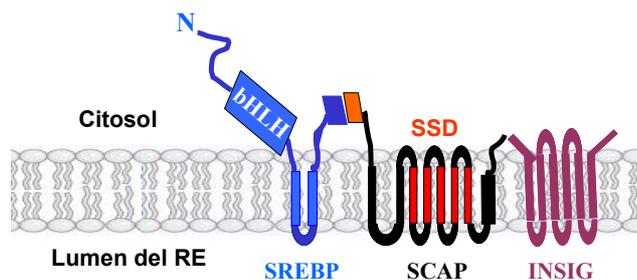
17p11.2. Los genes *SREBF1* y *SREBF2* humanos tienen un 47% de homología. Debido a la existencia de dos promotores independientes y al uso de distintos sitios de inicio de la transcripción, las isoformas SREBP1a y 1c difieren en su primer exón, que codifica el dominio ácido de transactivación que debe interactuar con coactivadores de la transcripción. Este exón codifica 24 aminoácidos más en la forma -1a, lo que la hace mucho más activa transcripcionalmente comparado con la isoforma -1c<sup>166</sup>. En humanos, estas isoformas también difieren en sus extremos 3' por la existencia de un procesamiento alternativo, aunque la importancia de esta divergencia es desconocida por el momento (**figura 4**)<sup>166</sup>.



**Figura 4: Estructura y localización cromosómica de los genes *SREBF1* y *SREBF2*.** El gen *SREBF1* produce las isoformas SREBP1a y SREBP1c por el uso de distintos promotores y por procesamiento alternativo en su región 3'. Los exones específicos de la isoforma 1a se muestran en naranja, y los específicos de la isoforma 1c en azul oscuro.

Los SREBPs son sintetizados como formas precursoras inactivas que se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplásmico (RE) y a la membrana nuclear en una disposición de horquilla. Están organizados en tres dominios: (i) el dominio aminoterminal que está orientado hacia el citosol y consta de unos 480 aa, en los que está la región ácida aminoterminal y una región básica hélice-bucle-hélice (bHLH) de dimerización y unión al ADN; (ii) el segundo dominio tiene unos 90 aa y consiste en dos hélices transmembrana hidrófobas que están unidas por un bucle de unos 30 aa que se proyectan hacia el lumen del RE y (iii) el tercer dominio es la región reguladora carboxiterminal de unos 590 aa que se encuentra orientada hacia el citosol<sup>167-169</sup>. Este dominio carboxiterminal

interacciona con la proteína SCAP (SREBP cleavage-activating protein; #MIM 601510) que actúa como sensor del nivel de esteroides y como “escolta” para SREBP durante su activación postraduccional. A su vez, el complejo SREBP-SCAP interacciona con las proteínas INSIG (Insulin induced gene; MIM # 608660) que lo retendrán en el RE (**figura 5**).



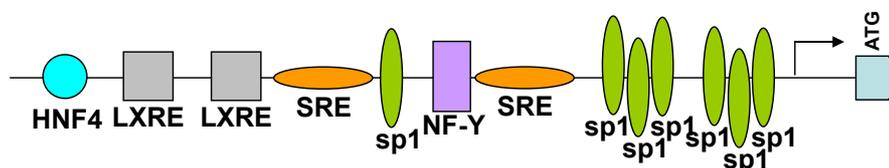
**Figura 5:** Representación de la disposición en la membrana del retículo endoplásmico (RE) de las proteínas implicadas en el transporte y maduración de los factores SREBP.

## **1.5-2. Regulación de SREBP1**

La regulación de los SREBPs se efectúa a varios niveles: (i) transcripción; (ii) activación proteolítica; (iii) modificaciones postraduccionales; (iv) degradación y (v) estabilidad del ARNm. Salvo la regulación a nivel de estabilidad de ARNm que sólo se ha descrito para SREBP1, estos mecanismos son comunes a las tres isoformas, aunque los estímulos y mediadores de la regulación son específicos de cada una de ellas.

### **1.5-2.1. Regulación de la expresión de SREBP**

A nivel del promotor, un fragmento de 1,5 Kb en la región 5' del sitio de iniciación de la transcripción de SREBP1c es capaz de conferir respuesta a insulina, AMP cíclico y ácidos grasos poliinsaturados (**figura 6**)<sup>170</sup>. En este promotor podemos identificar entre otros, sitios de unión NF-Y, elementos “SRE” (lo que apunta a una posible autorregulación de SREBP1c), cajas E y sitios Sp1<sup>171</sup>.



**Figura 6: Esquema de la estructura básica del promotor de SREBP1c humano.** En la figura se muestran los principales elementos de unión implicados en la regulación del gen. En la mayoría de tejidos humanos SREBP1c es la isoforma predominante, variando la expresión de relativa de SREBP1c y SREBP1a entre 3:1 en adipocitos y 10:1 en el hígado. Los niveles de SREBP1c son especialmente elevados en hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, glándula adrenal y cerebro. Por su parte, la isoforma SREBP1a se expresa preferentemente en líneas celulares y en tejidos con alta capacidad de proliferación como bazo o intestino<sup>172</sup>. Estas diferencias deben tenerse en cuenta al analizar los trabajos presentes en la bibliografía, realizados muchas veces en líneas celulares que como hemos comentado tienen invertida la relación SREBP1c/1a respecto a los tejidos *in vivo*.

La primera evidencia de la regulación transcripcional de SREBP1c se obtuvo en ensayos de ayuno/ingesta en roedores, demostrando que estos cambios nutricionales regulan la expresión de SREBP1c en hígado<sup>173</sup>, tejido adiposo<sup>174</sup> y músculo<sup>175,176</sup> mientras que provocan sólo ligeros efectos en SREBP1a y SREBP2. Así, la expresión de SREBP1c disminuye durante el ayuno pero aumenta marcadamente cuando los animales son realimentados con una dieta rica en carbohidratos.

Posteriores experimentos en adipocitos aislados<sup>174</sup> y en hepatocitos<sup>177</sup> muestran que SREBP1c es inducido por insulina. La expresión de SREBP1c en hígado de ratas tratadas con estreptozotocina (STZ) está disminuida, mientras que el tratamiento con insulina la normaliza<sup>178</sup>. La insulina también induce la expresión de SREBP1c en tejido adiposo y músculo de humanos en ensayos hiperinsulinémicos euglucémicos<sup>179,180</sup>. Los efectos de la insulina sobre la transcripción de SREBP1c son opuestos a los que ejerce el glucagón vía cAMP<sup>181</sup>.

El mecanismo de acción de la insulina implica al menos dos rutas de señalización intracelular. La ruta dependiente de PI3 quinasa (**phosphatidylinositol 3-kinase**) que controla la mayoría de acciones metabólicas de la insulina, y la ruta dependiente de las MAP-quinasa (**mitogen-activated protein kinase**) que controla los efectos de la insulina sobre la proliferación y diferenciación celular<sup>182</sup>.

Los efectos de la insulina sobre la expresión de SREBP1c en hígado están mediados principalmente por la ruta PI3 quinasa<sup>183,184</sup>. El efector final de la ruta no está completamente identificado pero tanto PKB/Akt<sup>184,185</sup> como PKC $\lambda$ <sup>186</sup> podrían estar implicados.

Respecto a la expresión de SREBP1c en otros tejidos existen trabajos en la bibliografía<sup>187,188</sup> que demuestran que en líneas celulares L-6 procedentes de músculo esquelético la inducción de SREBP1 por insulina podría estar mediada por la ruta MAPK. En cambio, en células 3T3-L1 provenientes de tejido adiposo la inducción de SREBP1 por insulina es mediada por la ruta PI3K.

SREBP1c también es activado por el factor LXR $\alpha$ , un receptor nuclear de hormonas altamente expresado en el hígado y activado por oxysterol<sup>189,190</sup>. LXR $\alpha$  ejerce su inducción a través de los sitios de unión RXR/LXR en el promotor de SREBP1c<sup>191,192</sup>. Estos sitios no sólo son importantes para la regulación por LXR $\alpha$ , sino que son también necesarios para la completa inducción de SREBP1c por insulina<sup>193</sup>. De hecho, en ratones *knock out* para ambas isoformas de LXR ( $\alpha$  y  $\beta$ ), la inducción de la expresión de SREBP1c por insulina está suprimida. Esto sugiere que la insulina podría inducir SREBP1c aumentando la actividad de LXR $\alpha$ , posiblemente a través de la generación de algún ligando endógeno<sup>193</sup>. Además, se ha demostrado que la insulina aumenta la expresión de LXR al menos a nivel transcripcional<sup>194</sup>. Sin embargo, la inducción de SREBP1c por una dieta rica en carbohidratos no se modifica en esos ratones por lo que la implicación de la vía LXR está aún poco clarificada<sup>191</sup>.

Los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen la expresión de SREBP1c a nivel transcripcional posiblemente antagonizando la regulación por LXR<sup>195</sup> y como se describirá posteriormente a través de la desestabilización de su ARNm. Por el contrario los ácidos grasos saturados aumentan específicamente la expresión de SREBP1c en hígado de ratones<sup>196</sup>.

El papel de la glucosa en la regulación de SREBP1c ha sido muy discutido y parece depender del modelo de estudio. Mientras la glucosa podría inducir la expresión de SREBP1c en células H2-35 derivadas de hepatocitos<sup>197</sup>, en miotubos<sup>198</sup> y en hígado de ratones diabéticos tratados con STZ<sup>199</sup>, este efecto no se ha observado en ratas diabéticas tratadas con STZ<sup>199</sup> ni en cultivo primario de hepatocitos de rata<sup>170,177,200</sup>.

Los andrógenos<sup>201,202</sup> y la progesterona<sup>203</sup> también ejercen un efecto en la inducción de SREBP1c lo que podría justificar la inducción de genes lipogénicos en líneas celulares tumorales.

Por último, la transcripción de SREBP1c es suprimida por AMPK<sup>204</sup> lo que podría justificar la disminución en la expresión de FAS, un conocido gen diana de SREBP1c, en hepatocitos de rata tras una activación prolongada de AMPK<sup>205</sup>.

Respecto al promotor de SREBP1a, sólo se ha demostrado que está regulado principalmente a través de elementos Sp1<sup>206</sup>. La transcripción de SREBP2 es inducida por la disminución de los niveles de esteroides, sugiriendo que la transcripción de SREBP2 podría estar mediada por mecanismos de feedback positivo, en el que la forma madura se une a los elementos SRE de su propio promotor e induce su expresión<sup>207</sup>. Para SREBP1a esto sólo se ha demostrado en células en cultivo, pero no en hígado *in vivo*<sup>172</sup>.

### 1.5-2.2. Procesamiento: SREBP-SCAP-INSIG

#### 1.5-2.2.1. Descripción del mecanismo

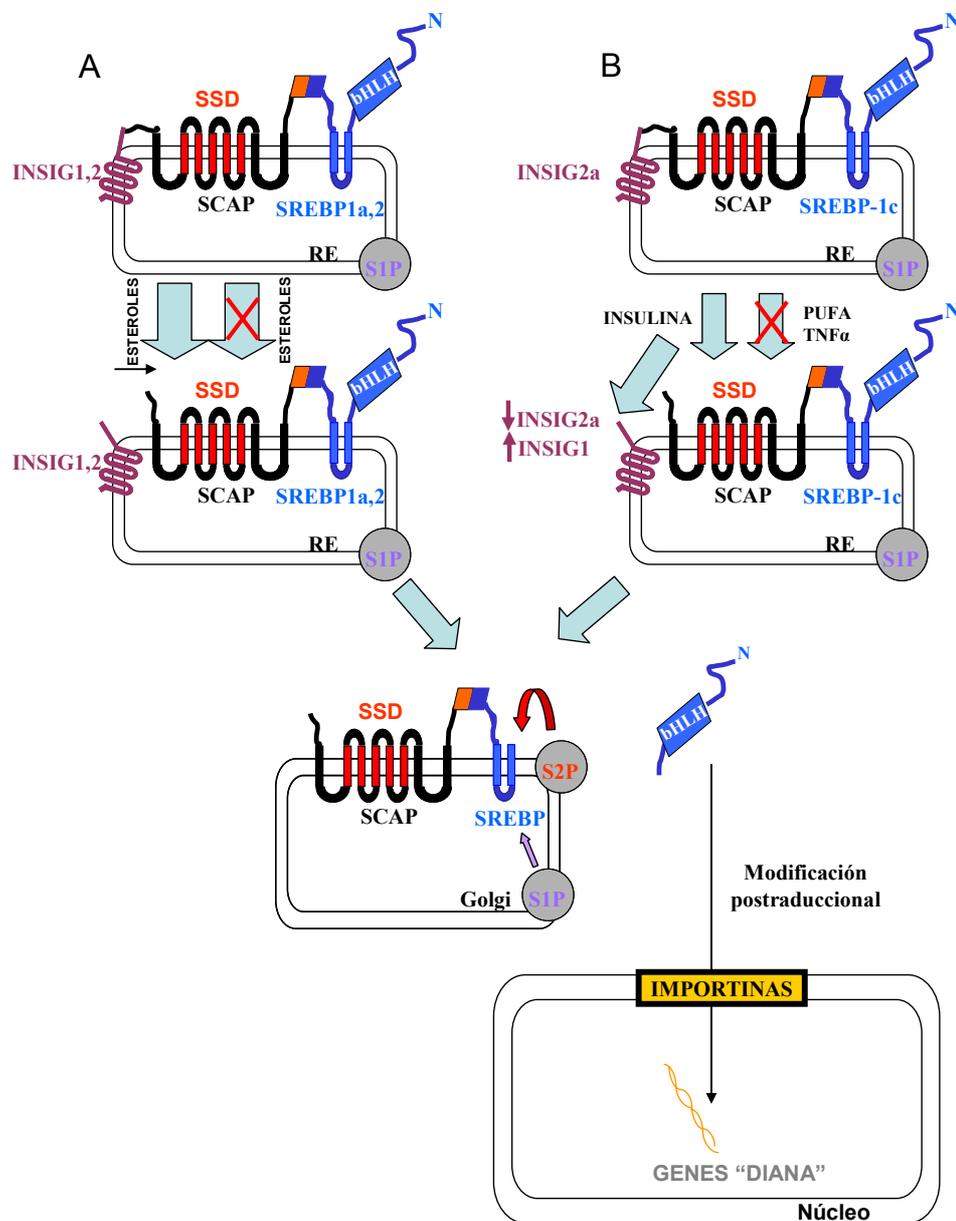
Los factores SREBP son sintetizados como una forma precursora inactiva anclada a la membrana del RE y a la membrana nuclear. Esta forma precursora interacciona a través de su dominio carboxiterminal con la proteína SCAP (SREBP cleavage-activating protein), otra proteína de membrana del RE. SCAP consta de 1276 aminoácidos<sup>208</sup> distribuidos en dos dominios<sup>209</sup>: un dominio aminoterminal de 703 aa, constituido por ocho hélices transmembrana hidrófobas unidas por bucles hidrofílicos que se proyectan a cada lado de la membrana, y el dominio carboxiterminal citosólico de 546 aa que interacciona con SREBP a través de una repetición de cinco copias del motivo triptófano-aspartato característico de la familia WD<sup>210</sup>. Las hélices 2-6 constituyen el dominio sensor de esteroides (SSD; sterol-sensing domain)<sup>208,209</sup>.

En presencia de esteroides, el complejo SCAP-SREBP interacciona con proteínas de la familia INSIG y es retenido en el RE. Ante una disminución de los niveles de esteroides, SCAP sufre un cambio conformacional que le libera de su unión con las proteínas INSIG, de forma que SCAP y SREBP migran al complejo de golgi a través de vesículas (recubiertas de proteínas COP-II). Estas vesículas también contienen una serina-proteasa inactiva de la familia subtilisina (Site-1 protease; SP1). Una vez incorporadas en la membrana de golgi, la proteasa SP1 se activa<sup>211</sup> y corta SREBP en el medio de su bucle hidrófilo luminal. Tras este corte, SP2, una metaloproteasa transmembrana dependiente de zinc, que posiblemente reside en golgi de forma constitutiva, vuelve a cortar a SREBP en la región intramembrana del

lado citoplasmático<sup>212,213</sup>. Este proceso denominado “RIP” (regulated intermembrane proteolysis) libera la región aminoterminal (68 kDa) denominada "forma madura" que en su región bHLH contiene una novedosa señal de localización nuclear que interacciona directamente con importina, permitiendo su transporte al núcleo<sup>214-217</sup>. Una vez en el núcleo, SREBP puede unirse a “cajas E” (5'- CANNTG-3') como todos los factores bHLH y además a secuencias SRE (sterol-response elements; 5'- TCACCCCCAC-3') debido a la sustitución de una arginina muy conservada en la familia bHLH en su dominio básico, por una tirosina<sup>218</sup>. Además, los SREBPs pueden unirse al elemento “SRE” que puede contener una repetición directa o en tándem de la secuencia de reconocimiento<sup>219</sup> y nunca a secuencias palindrómicas, a las que se unen específicamente los otros bHLH<sup>167,220</sup>.

La acción de los SREBPs inducirá entre otros, los genes implicados en la síntesis y captación de colesterol, restituyendo los niveles de esteroides. Esto induce un cambio conformacional en SCAP que facilita su unión a las proteínas INSIG1 o 2. Esta interacción retiene al complejo SCAP/SREBP en el RE, impidiendo la unión de proteínas COP-II a SCAP, la incorporación del complejo SREBP/SCAP a las vesículas de transporte y su procesamiento en el complejo de golgi. De esta forma provocará una reducción en la transcripción de sus genes diana<sup>167</sup> estableciendo una regulación “feedback” de la síntesis de colesterol (**figura 7**).

La actividad de SP2 no es regulada directamente por los niveles de oxisteroides (o colesterol), ya que este enzima no puede actuar a menos que SP1 haya actuado previamente separando la región bHLH-ZIP de SREBP de la región COOH-terminal reguladora. Esta regulación RIP no es específica de SREBP, sino que también interviene en el procesamiento de otras proteínas transmembrana como péptido  $\beta$  amiloide, APP, o Notch<sup>221</sup>. Tras este proceso, SCAP es reciclado nuevamente hacia el RE, donde “escortará” a una nueva molécula “inmadura” de SREBP, mientras que la forma madura de SREBP es rápidamente degradada tras realizar su acción.



**Figura 7: Representación esquemática del procesamiento de las proteínas SREBP.** A.- Procesamiento general de la familia SREBP en respuesta a la disminución de los niveles de esteroides intracelulares. B.- Procesamiento de la isoforma SREBP1c en hígado de ratón. SP1: Site-1 protease. S2P: Site-2 protease.

A diferencia de SREBP1a y SREBP2, el procesamiento dependiente de la fluctuación en los niveles de esteroides no parece regular SREBP1c *in vivo*, sino que el procesamiento de esta isoforma está regulado por cambios nutricionales<sup>222</sup> inducidos por insulina<sup>223</sup> y metabolitos de la glucosa, como glucosa-6 fosfato<sup>224</sup> e inhibidos por factores como TNF $\alpha$  o los PUFAs<sup>225</sup>. Numerosos trabajos han sugerido que los niveles de INSIG1 e INSIG2 son responsables de la regulación diferencial del procesamiento de SREBP1c y 2 por insulina y esteroides, modulando coordinadamente la retención de SCAP/SREBP en RE o su transporte hacia el complejo de golgi, aunque el mecanismo de esta regulación diferencial todavía no se conoce por completo.

#### 1.5-2.2.2. Proteínas INSIG

Esta familia está compuesta por dos miembros: INSIG1 producido por un gen situado en la región q36.3 del cromosoma 7 humano, e INSIG2 codificado por un gen situado en la región 2q14.1 del cromosoma 2 humano<sup>226-228</sup>.

Las proteínas INSIG1 e INSIG2 humanas constan de 277 y 225 aminoácidos respectivamente que forman seis hélices transmembrana extraordinariamente hidrófobas separadas por pequeños bucles hidrófilos<sup>229</sup>. Sólo las pequeñas regiones amino y carboxiterminales están expuestas al citosol. Las regiones transmembrana de INSIG1 y 2 tienen una homología del 85%; en cambio, la región aminoterminal de INSIG2 es 50 aminoácidos más corta que la de INSIG1, lo cual podría justificar su distinta afinidad por SCAP y por tanto su distinta capacidad para retener los complejos de SCAP-SREBP en el RE.

En ratón se han identificado dos isoformas de INSIG2 (2a y 2b), producidas por el mismo gen a través del uso de distintos promotores. Los transcritos INSIG2a e INSIG2b difieren en su primer exón no codificante, por lo que la proteína que codifican es idéntica. La mayor diferencia entre ellos es su distribución tisular ya que la isoforma INSIG2a se expresa principalmente en el hígado, mientras que INSIG2b es ubicuo y se expresa a bajos niveles en el hígado. La existencia de estas dos isoformas de INSIG2 sólo ha sido descrita en ratones aunque se ha sugerido su posible existencia en humanos<sup>228</sup>.

Parece que las principales diferencias entre las isoformas de INSIG están en la regulación de su expresión<sup>227</sup>. Mientras INSIG1 es estrictamente inducido por SREBP<sup>230-232</sup>, INSIG2 se expresa a bajos niveles pero de manera constitutiva y no parece ser regulado por SREBP<sup>227</sup>. En hígado de ratón la isoforma INSIG2a es inducida por LXR $\alpha$  e inhibida por insulina<sup>223</sup>.

En estado de ayuno, los niveles de insulina circulantes son bajos por lo que los niveles de expresión de SREBP1c en el hígado, y por tanto de INSIG1, serán bajos. En cambio los niveles de INSIG2 (principalmente debidos al mensajero INSIG2a) serán altos. Tras la ingesta, la insulina ejerce un efecto agudo induciendo el procesamiento de la forma madura de SREBP1c mediado a través de la vía PI3K<sup>223</sup>. El mecanismo molecular de la inducción del procesamiento por insulina no se conoce, pero podría deberse a un rápido cambio conformacional que interfiera en la interacción SCAP/INSIG2 o a la degradación de alguna proteína implicada en esta regulación.

Además de este efecto agudo, la insulina disminuye la expresión de INSIG2a en el hígado de ratones mientras que induce INSIG1 a través de SREBP1c<sup>228</sup>, sugiriendo que este recambio promueve específicamente la maduración de la forma SREBP1c tras una exposición prolongada a insulina.

De esta forma, la insulina promueve tanto la expresión de SREBP1c como su procesamiento y liberación de la forma madura. En cambio la vía LXR $\alpha$  induce la expresión de SREBP1c y de INSIG2a en el hígado lo cual paradójicamente impediría el procesamiento de SREBP1c. Esta aparente contradicción sugiere que INSIG2a constituye un mecanismo de seguridad para evitar la estimulación de la lipogénesis mediada por LXR $\alpha$  a través de SREBP1c en periodos de hipoglucemia. La necesidad de insulina para inducir el procesamiento de SREBP1c a corto y largo plazo asegura que la lipogénesis ocurrirá sólo en situaciones de glucemia elevada.

La inducción de la forma precursora de SREBP1c por LXR $\alpha$  tal vez sirva para permitir una rápida respuesta metabólica a la insulina ante la fluctuación en el aporte energético diario.

En otros tejidos, el procesamiento específico de SREBP1c no está tan estudiado pero se ha sugerido que en tejido adiposo también es inducido por insulina<sup>180</sup>.

Estudios de dosis génica de INSIG1 demuestran que sólo en una estrecha ventana en la relación estequiométrica entre INSIG1/SCAP el sistema responde a la regulación por esteroides. Cuando SCAP está en exceso molar en relación a INSIG1 el procesamiento de SREBP es insensible a esteroides.

Con un amplio exceso de INSIG1, SREBP es retenido en el RE incluso en ausencia de esteroides; por el contrario, incluso elevados niveles de INSIG2 requieren de la presencia de esteroides para retener el complejo SCAP/SREBP en el RE<sup>227</sup>.

Concretamente en referencia al procesamiento de la isoforma SREBP1c, la sobreexpresión de INSIG1<sup>233,234</sup> o de INSIG2<sup>234</sup> en hígado de roedores suprime tanto el procesamiento agudo como a largo plazo mediado por insulina. En estos ratones no se observa un aumento de la forma madura de SREBP1c ni de genes lipogénicos en respuesta a insulina.

Este complejo mecanismo de regulación sugiere que variaciones en los niveles de INSIG, SCAP o SREBP, podrían causar un desajuste en estos circuitos homeostáticos alterando la estrecha ventana en la que el procesamiento de SREBP es regulado por cambios en el estatus nutricional y por estímulos hormonales, y de este modo condicionar el desarrollo de patologías como DM2, obesidad o dislipemias.

### 1.5-2.3. Modificación postraduccional y degradación de SREBP

La actividad transcripcional de SREBP y su degradación están reguladas por modificaciones covalentes o por interacciones con otras proteínas.

La primera evidencia indicando que SREBP está modificado postraduccionalmente fue la demostración de que la insulina aumentaba la actividad transcripcional de la forma madura de SREBP1c sobreexpresada en la línea adipocitaria 3T3-L1<sup>174</sup>.

Otros estudios posteriores demostraban que la insulina también aumentaba la actividad de SREBP2 y SREBP1a a través de la ruta MAPK y que este efecto podría estar mediado por la fosforilación de los residuos Ser117 en SREBP1a<sup>235</sup> y Ser432 y Ser455 en SREBP2<sup>236</sup>.

Aunque el residuo Ser117 de SREBP1a también está presente en la isoforma 1c, no se ha demostrado que esta isoforma sea fosforilada a través de esta ruta puesto que los inhibidores de la ruta MAPK no antagonizan el efecto de la insulina en los genes diana de SREBP1c en cultivo primario de hepatocitos de rata<sup>237,238</sup>.

También se ha sugerido que PKB es capaz de fosforilar *in vitro* a la forma madura de SREBP1c, y que la fosforilación por insulina y PKB podría aumentar su actividad transcripcional en cultivo primario de hepatocitos<sup>239</sup>.

En el núcleo, las formas maduras de SREBP son modificadas por ubiquitinación y rápidamente degradadas por el proteasoma 26S<sup>240,241</sup>, considerándose este proceso uno de los mecanismos más importantes en la

regulación de la actividad de estas proteínas. De hecho, en presencia de inhibidores del proteasoma como ALLN (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO) o lactacistina, los SREBPs son estabilizados aumentando la expresión de sus genes diana.

También se ha demostrado que al menos en parte, SREBP es ubiquitinado y degradado como consecuencia de su actividad transcripcional<sup>242</sup>. La ubiquitinación de SREBP1 está regulada por una fosforilación mediada por GSK-3 en los residuos Thr426 y Ser430, lo que permite a la ubiquitina ligasa SCF<sup>Fbw7</sup> unirse a SREBP1 aumentando su ubiquitinación y degradación<sup>243</sup>. Más recientemente se ha descrito que la actividad de SREBP1 está regulada por fosforilación durante el ciclo celular, sugiriendo que SREBP1 puede coordinar la síntesis lipídica, la proliferación y el crecimiento celular<sup>244</sup>.

SREBP2 y SREBP1 también son modificados por SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier) en uno y dos residuos respectivamente. Esta modificación no afecta a la ubiquitinación ni a la estabilidad, sino que reprime su actividad transcripcional<sup>245</sup>.

Por último, la interacción de SREBP1a y SREBP2 con el coactivador transcripcional p300 provoca la acetilación de los SREBPs en residuos de lisina y su estabilización<sup>246</sup>, al disminuir la ubiquitinación. En el caso de SREBP1a la acetilación se ha descrito en el residuo Lys333 situado en su dominio de unión a ADN.

Por tanto estas modificaciones postraduccionales constituyen otro nivel de regulación de los SREBPs, modulando su unión a ADN, su interacción con otras proteínas, y su estabilización/degradación.

#### 1.5-2.4. Interacciones proteína-proteína de SREBP

Además de homo y heterodimerizar, los factores SREBPs necesitan interactuar con otros factores de transcripción como SP-1, NF-Y o CREBP (AMPC response element binding protein) para ejercer su actividad transcripcional correctamente<sup>247-251</sup>.

Parece que los genes con elementos “SRE” en su promotor responden a distintas combinaciones de estos factores de transcripción. Una vez que el complejo estable se ha formado, otros elementos coactivadores de la transcripción como CBP (CREB binding protein)<sup>252,253</sup>, ARC (activated recruited cofactor)<sup>254</sup>, DRIC (vitamin D receptor interacting protein)<sup>254</sup>, PGC1 $\beta$  (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-

**1beta)**<sup>196</sup> o factores asociados a TBP (**TATA box-binding protein**) deben ser incorporados para iniciar la transcripción. Por otro lado, para la actividad transcripcional completa de SREBP es necesaria la acetilación de histonas<sup>255</sup> aunque esto no se ha demostrado para SREBP1c, lo cual podría justificar su menor actividad transcripcional respecto a SREBP1a y SREBP2.

Otra proteína que interacciona con SREBP1c y puede modificar su actividad transcripcional es Twist2, un factor expresado en tejido adiposo e hígado<sup>256</sup> y cuya sobreexpresión disminuye la actividad transcripcional de SREBP1c inhibiendo su unión a sus promotores diana.

En sentido contrario, la interacción de SREBP1 con la proteína HMGB1 (**high mobility group protein-B1**) aumenta su unión a ADN y en ensayos luciferasa aumenta su actividad transcripcional en cultivos celulares<sup>257</sup>.

#### **1.5-2.5. Estabilidad del mensajero**

SREBP1 también es regulado postranscripcionalmente a través de la desestabilización de su ARNm, siendo uno de los mecanismos por los que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) disminuyen su expresión. Los PUFA (*n*-6) y (*n*-3) presentes en la dieta disminuyen los niveles de triglicéridos en sangre y la deposición lipídica intramuscular, mejorando la sensibilidad a la insulina y aumentando la utilización de glucosa extra hepática<sup>258,259</sup>. Se ha descrito que parte de este efecto es debido a una disminución en la expresión de genes lipogénicos ocasionada por una desestabilización del mensajero de SREBP1c. En cultivo primario de hepatocitos de rata, el tratamiento con ácidos grasos 20:4(*n*-6) o 20:5(*n*-3) conjugados a albúmina reduce la vida media del mensajero de SREBP1 en un 50%, efecto mucho más marcado para la isoforma 1c. Aunque el mecanismo de acción de los PUFA a este nivel no es conocido, se ha sugerido que podrían actuar a través del elemento de desestabilización rico en A-U presente en el 3'UTR de SREBP1<sup>260</sup>. Un mecanismo similar se ha sugerido en la regulación por PUFA de otros factores de transcripción implicados en el metabolismo glucolipídico como la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos, ChREBP (**carbohydrate-response element binding protein**)<sup>261</sup>.

#### **1.5-3. Actividad de los factores SREBP**

La familia SREBP en conjunto controla el metabolismo lipídico regulando genes implicados en las rutas de síntesis y captación de colesterol, síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, y genes que controlan el metabolismo glucídico.

Los lípidos además de servir como fuente de energía, forman parte de las membranas celulares, y son precursores de moléculas como hormonas esteroideas, vitaminas, ácidos biliares o eicosanoides que participan en numerosos procesos biológicos tan relevantes como el control del ciclo celular, procesos inflamatorios o rutas de transducción de señal. Por este motivo existe un creciente interés por conocer la función específica de cada isoforma de SREBP en estos procesos.

Aunque la sobreexpresión *in vitro* de las isoformas SREBP1a y 2 es capaz de inducir la expresión de todos los genes “diana” de la familia SREBP, la generación de ratones transgénicos que sobreexpresan sólo una de las tres isoformas ha permitido determinar las funciones específicas de cada una de ellas.

A continuación se describirán algunas de estas funciones en distintos tejidos.

### 1.5-3.1. Hígado

En mamíferos, el hígado es el órgano más activo en la síntesis lipídica. Además de colesterol, el hígado sintetiza grandes cantidades de ácidos grasos no sólo para sus propias membranas, sino también para exportarlos a otros tejidos en lipoproteínas. Los SREBPs participan en ambos procesos<sup>169</sup>. SREBP2 regula la expresión de la mayoría de genes implicados en la síntesis y captación de colesterol como la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzima A (HMGCoA) reductasa o el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLr)<sup>173,262</sup>.

En el hígado, la isoforma SREBP1c participa en la inducción transcripcional por insulina de glucoquinasa, que es necesaria para la utilización hepática de glucosa<sup>181,263</sup>. En el modelo de ratas diabéticas tratadas con STZ la sobreexpresión en hígado de la forma madura de SREBP1c mediante vectores adenovirales mimetiza el efecto de la insulina sobre genes como glucoquinasa o genes lipogénicos como ácido graso sintasa (FAS)<sup>177,264</sup>.

Paralelamente, SREBP1c induce genes imprescindibles para la síntesis, elongación y desaturación de ácidos grasos<sup>265-267</sup>, así como para su incorporación a la síntesis de fosfolípidos<sup>268</sup> y triglicéridos como la glicerol-3-fosfato aciltransferasa<sup>269</sup> (**figura 8**).

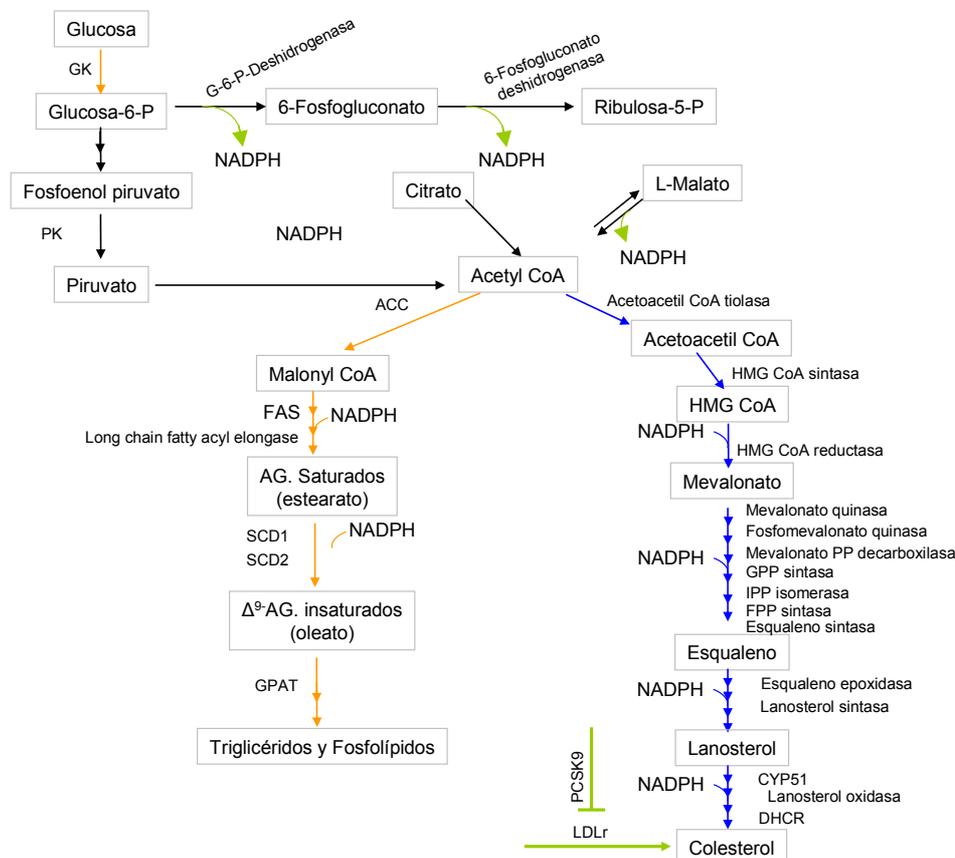
La fluctuación en los niveles de insulina en la transición del estado de ayuno a la ingesta provoca que el hígado adapte su metabolismo de gluconeogénesis/cetogénesis a glucólisis/lipogénesis. El descubrimiento de que la insulina aumenta la expresión de SREBP1c fue la primera evidencia de que este factor podría participar en estos procesos metabólicos<sup>178,181</sup>. Posteriormente se observó que ratones transgénicos que sobreexpresaban SREBP1c no eran capaces de suprimir la lipogénesis en respuesta al ayuno y que ratones en los que se eliminaba SREBP1c sufrían una importante reducción en la respuesta lipogénica a la transición ayuno/ingesta. Esta respuesta era prácticamente eliminada si se suprimían las dos isoformas de SREBP1<sup>166,270</sup>. Curiosamente en estos ratones se observaba un aumento en la expresión de SREBP2 que compensaba en parte la carencia de SREBP1 en la inducción del programa lipogénico.

El factor LXR $\alpha$  induce la expresión de diversos genes implicados en el tráfico y aclaramiento de colesterol<sup>271</sup> así como de genes implicados en la lipogénesis hepática<sup>191,272</sup> ejerciendo este efecto directamente o indirectamente a través de la inducción de SREBP1c. Los oxysterol, derivados hidroxilados del colesterol, actúan como ligandos de LXR $\alpha$  de forma que ante un aumento en la tasa de síntesis de colesterol, la activación de LXR $\alpha$  aumentará paralelamente la síntesis de ácidos grasos, como el oleato, necesarios para la formación de ésteres de colesterol, que neutralizan la concentración de colesterol libre que podría precipitar en forma de cristales<sup>164</sup>. Debido a este efecto, se considera a LXR $\alpha$  como un sensor de los niveles de colesterol.

La participación de SREBP1c en la síntesis de colesterol es minoritaria, pero interviene en la captación de LDLc regulando directamente la expresión del receptor de LDL<sup>273</sup> e indirectamente a través de la inducción de PCSK9 una proteasa implicada en la degradación del propio receptor<sup>274</sup>.

Por último y no por ello menos importante, los SREBPs activan genes como ATP citrato liasa, enzima málico, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, implicados en la generación de NADPH que es necesario para la síntesis de ácidos grasos y colesterol.

Por su parte, la isoforma SREBP1a es mucho más activa transcripcionalmente que la isoforma 1c, y aunque su expresión *in vivo* en hígado es muy minoritaria, parece que es capaz de activar todos los genes regulados por SREBP1c y SREBP2.



**Figura 8: Descripción de las rutas metabólicas inducidas por las proteínas SREBP1c y SREBP2 en hígado.** En naranja se muestran los procesos inducidos predominantemente por SREBP1c, en azul los procesos inducidos predominantemente por SREBP2 y en verde los inducidos por ambos.

### 1.5-3.2. Tejido adiposo

El Dr. Bruce M. Spiegelman en la Universidad de Harvard (Boston, EEUU) demostró que la forma madura del factor SREBP1, también llamado ADD-1 (**adipocyte differentiation and determination factor-1**) desempeña un papel en la diferenciación y en la expresión génica en adipocitos de rata a través de la producción de ligandos endógenos para PPAR $\gamma$ <sup>275</sup> y/o induciendo la propia transcripción de este factor<sup>276</sup>.

SREBP1c es el transcrito predominante en el tejido adiposo de ratón y humano, excediendo al de SREBP1a en dos o tres veces. Por el contrario, la expresión de SREBP2 en este tejido es muy baja<sup>172</sup>.

Recientemente se ha demostrado que SREBP1c regula directamente la expresión de GLUT-4 en tejido adiposo durante la transición ayuno/ingesta o en ratas diabéticas por STZ tratadas con insulina<sup>277</sup>.

SREBP1c también se ha implicado en la inducción directa o indirecta de genes específicos de tejido adiposo como la proteína de unión a ácidos grasos aP2 (fatty acid-binding protein aP2), adiposina y lipoproteína lipasa<sup>275</sup> y de otros enzimas necesarios para la lipogénesis adipocitaria como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ATP-citrato liasa, acetil coenzima A carboxilasa, ácido graso sintasa, y glicerol 3-fosfato acil transferasa. También participa en la expresión en el tejido adiposo del receptor de LDL o de la leptina<sup>174,278</sup>.

La disrupción específica de SREBP1a y 1c en ratón es compensada en el hígado por un marcado aumento en SREBP2 pero no en adipocitos<sup>279</sup>.

La sobreexpresión selectiva de SREBP1a en tejido adiposo, utilizando el promotor aP2, aumenta la tasa de síntesis de ácidos grasos en el tejido adiposo, desencadenando una hipertrofia adipocitaria, un aumento del flujo de ácidos grasos hacia el hígado y esteatosis hepática<sup>280</sup>.

Sorprendentemente, la sobreexpresión de SREBP1c (ADD1) en tejido adiposo inhibe la diferenciación adipocitaria resultando en un síndrome lipodistrófico con pérdida de tejido adiposo y aumento de la deposición grasa en el hígado probablemente debido a una desviación de ácidos grasos libres hacia este órgano y al estado de hiperinsulinemia que favorecería la lipogénesis *de novo* hepática<sup>280</sup>.

No obstante, aunque los modelos animales y celulares utilizados ofrezcan resultados contradictorios, está ampliamente aceptado que SREBP1c juega un papel fundamental en la lipogénesis y en la diferenciación del tejido adiposo.

### 1.5-3.3. Músculo esquelético

A diferencia de otros tejidos con elevados niveles de expresión de SREBP1c, el músculo no es un tejido altamente lipogénico. No obstante, existen depósitos de triglicéridos que varían en distintas condiciones fisiopatológicas<sup>281-286</sup> como por ejemplo el entrenamiento físico, que conlleva un aumento de la expresión de SREBP1c y de la síntesis de triglicéridos<sup>287</sup>. Por otro lado, una desregulación en el metabolismo lipídico muscular con disminución en la oxidación de ácidos grasos y elevación en la deposición lipídica se ha asociado con la resistencia a insulina en DM2 y obesidad. Se ha descrito que SREBP1 podría participar en este fenómeno

aumentando la expresión de genes como la ácido graso sintasa (FAS) y citrato liasa<sup>198,288</sup>. A pesar de estas evidencias, la regulación y actividad de SREBP1c en músculo está mucho menos estudiada que en hígado o tejido adiposo.

#### 1.5-3.4. Tejido endotelial vascular

El tejido endotelial vascular interviene activamente en la vasodilatación a través de efectos combinados de moléculas como el óxido nítrico, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio-2 (endothelial-derived hyperpolarizing factor-2) y la prostaciclina I 2 (PGI<sub>2</sub>; **prostaglandin I 2**), sintetizada en este tejido por la COX-2 (ciclooxigenasa-2, forma inducible de la ciclooxigenasa)<sup>289,290</sup>.

Los niveles de colesterol regulan de forma dosis dependiente la expresión de COX-2 en el endotelio vascular a través de la familia SREBP. Una disminución de los niveles de colesterol provoca la activación de SREBP induciendo COX-2 y la síntesis de PGI<sub>2</sub>. Por tanto COX-2 es el primer gen vascular encontrado sin un claro papel en el metabolismo lipídico que es transactivado por SREBP, y sugiere que los elevados niveles de LDLc además de ser un importante factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular<sup>291</sup> también están asociados con un deterioro en la capacidad de vasodilatación endotelial a través de una disminución en la producción de PGI<sub>2</sub> asociada al bloqueo de la ruta SREBP<sup>292</sup>.

Por otro lado, en lesiones ateroscleróticas y otros lugares con signos de inflamación crónica, es frecuente la aparición de lípidos oxidados como Ox-PAPC (**Oxidized-1- palmitoyl-2- arachidonyl -sn- glycerol-3-phosphorylcholine**) que activa a las células endoteliales para sintetizar factores quimiotácticos como IL-8 (**interleukin-8**). El óxido nítrico generado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en combinación con el radical superóxido parecen activar a SREBP que a su vez es el mediador en la activación de IL-8<sup>293-295</sup>.

Aunque se conoce poco de estos mecanismos de activación de SREBP en el endotelio vascular, se ha postulado que podría implicar la formación de especies reactivas como superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que podrían inducir la activación de proteasas vía nitrosilación de residuos de cisteína o tirosina<sup>296,297</sup> o alterar la integridad de las membranas celulares por fenómenos de peroxidación lipídica favoreciendo la depleción del colesterol celular y la activación general de los SREBP<sup>298</sup>.

El descubrimiento de estas nuevas rutas de activación abre un nuevo campo de estudio en el papel de SREBP en la homeostasis vascular y en procesos inflamatorios mediados por óxido nítrico.

Además trabajos recientes sugieren que IL-8 es capaz a su vez de estimular la activación de SREBP1 y SREBP2 de forma específica, lo cual podría tener una función específica en procesos de angiogénesis<sup>293</sup>.

### 1.5-3.5. Sistema nervioso

La mielinización del sistema nervioso periférico por las células de Schwann implica la activación de un variado número de genes que coordinan la formación de la vaina alrededor de los axones<sup>299</sup>. Entre ellos están los factores SREBP1 y 2, que inducen la expresión de genes necesarios para la síntesis de los lípidos y colesterol requeridos para este proceso. Recientemente se ha demostrado que los factores Egr2/Krox20 (**early growth response 2**), claves en el proceso de mielinización de nervios periféricos, actúan sinérgicamente con SREBP en esta inducción<sup>300</sup>.

La formación de la vaina de mielina es crítica para la conducción rápida de las señales nerviosas en neuronas motoras y sensitivas. La disrupción del proceso de mielinización provoca neuropatías periféricas como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o el síndrome de Dejerine Sottas<sup>301,302</sup>.

### 1.5-3.6. Páncreas

SREBP1c está implicado en la activación por LXR $\beta$  de la expresión del gen de la insulina<sup>303</sup> y en su secreción en células INS-1, procedentes de insulinoma de rata. Por tanto, la expresión de SREBP1c en condiciones normales podría participar en la secreción de insulina *in vivo*. No obstante, un creciente número de trabajos sugieren que la sobreexpresión anómala de SREBP1 podría provocar un deterioro funcional de la célula  $\beta$ . Se ha demostrado que SREBP1c puede alterar la señalización de insulina, inhibiendo IRS-2, el mayor mediador de señal de insulina en células  $\beta$ <sup>304</sup>. De hecho la sobreexpresión de SREBP1c en células  $\beta$  bajo el promotor de insulina se ha utilizado en ratones transgénicos como modelo de lipotoxicidad por generación de ácidos grasos endógenos. Estos ratones presentan disminución en la secreción de insulina *in vivo* debida a la depleción de ATP causada por un aumento de la lipogénesis y por una inducción directa de UCP2. También presentan pérdida de masa de las

células  $\beta$  posiblemente debida a la supresión de IRS-2 y PDX-1<sup>304</sup>. En células INS-1 e islotes pancreáticos de rata se ha demostrado que los fenómenos de glucolipototoxicidad generan un estrés en el retículo endoplásmico de la célula  $\beta$  que provoca la activación de SREBP1 y secundariamente la acumulación lipídica, disminución de la secreción de insulina estimulada por glucosa, apoptosis y disminución en la expresión de genes como IRS-2, Bclx1 o Pdx1<sup>305</sup>.

Además, SREBP1c tiene un efecto directo induciendo la granofilina, un componente crucial de la maquinaria de ensamblaje de las vesículas que contienen insulina a la membrana plasmática de las células  $\beta$  pancreáticas y de su exocitosis. Recientemente se ha demostrado expresando granofilina en islotes mediante vectores adenovirales o en ratones transgénicos que sobreexpresan SREBP1c específicamente en células  $\beta$ , que una estimulación de esta ruta disminuye la secreción de insulina estimulada por potasio (KSIS). La disminución o la supresión de los niveles de SREBP1c o de granofilina restituían la KSIS. Por tanto independientemente de su implicación en fenómenos de  $\beta$  lipotoxicidad, SREBP1c podría participar directamente en la alteración en la secreción de insulina<sup>306</sup>. La activación de SREBP1c disminuye la expresión de otros componentes de la maquinaria secretora de insulina, como syntaxina-1a o Munc18-1 aunque estos fenómenos están peor caracterizados<sup>306</sup>.

La disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) característica de la DM2 es debida a la disminución en el ratio ATP/ADP debido al deterioro en el metabolismo de glucosa y a la disminución en la producción de insulina en células  $\beta$ <sup>307</sup>. En modelos de DM2 también pueden existir alteraciones en la fase de secreción de insulina a través del deterioro en la secreción de insulina estimulada por potasio (KSIS). SREBP1c podría estar implicado en ambos fenómenos ya que un excesivo aumento en su expresión puede contribuir a alteraciones en la producción de ATP conduciendo a un deterioro en la GSIS, y a su vez a un aumento en la expresión de granofilina, conduciendo a una atenuación en la KSIS.

Aunque todavía se necesitan más estudios para conocer su verdadera función en la homeostasis  $\beta$  pancreática, parece claro que SREBP1c es un factor importante en el control de la expresión y secreción de insulina, así como en fenómenos de glucolipototoxicidad y disfunción  $\beta$  pancreática.

#### **1.5-4. Implicaciones fisiopatológicas del factor SREBP1**

Los datos de la expresión de SREBP1 *in vivo* en individuos con cuadros de resistencia a la insulina son complejos.

La acumulación de lípidos intrahepáticos es una característica común a muchos individuos con obesidad y/o resistencia a la insulina. Aunque por limitaciones obvias no se dispone de datos suficientes respecto a la expresión de SREBP1c en hígado humano, la expresión del mensajero de SREBP1c está aumentada<sup>308,309</sup> en modelos de ratones ob/ob, obesos, resistentes a insulina e hiperinsulinémicos. Esto inevitablemente plantea una paradoja ya que en estos ratones existe una profunda resistencia a la insulina en hígado en relación con la inhibición de la producción de glucosa; en cambio la insulina continúa activando la expresión de SREBP1c. Esto podría explicarse por el hecho de que en la ruta de señalización de la insulina, la transcripción de SREBP1c es dependiente de IRS-1, cuya expresión no está disminuida en este modelo; en cambio, IRS-2 cuya expresión si está disminuida, es el mediador de los efectos de la insulina sobre la producción de glucosa. Por tanto la elevación de SREBP1c aumenta la expresión de genes lipogénicos, la síntesis de ácidos grasos y acelera la acumulación de triglicéridos<sup>308,309</sup>. También se ha descrito que SREBP1c puede ejercer una acción reprimiendo específicamente la transcripción de IRS-2 provocando una mayor inhibición de la vía PI3K en el hígado<sup>310</sup> característica de los estados de resistencia a la insulina.

El estado de resistencia a insulina también favorece la producción de VLDL ya que en condiciones normales, la insulina ejerce un efecto inhibitorio agudo sobre el gen MTP (**m**icrosomal **t**riglyceride transfer **p**rotein), el enzima que cataliza el empaquetamiento de los triglicéridos y las proteínas apoB100 en la formación de las VLDL<sup>311-313</sup>.

La producción de VLDL por el hígado está regulada principalmente a nivel de disponibilidad de ácidos grasos<sup>314</sup>, mayoritariamente ácidos grasos libres plasmáticos, que previamente serán esterificados y almacenados como triglicéridos citoplasmáticos. Además existen otras fuentes de ácidos grasos para la producción de VLDL que son la lipogénesis *de novo* y la lipólisis intracelular de lipoproteínas captadas por el hígado<sup>315-318</sup>.

La hiperinsulinemia crónica y la ingestión de carbohidratos estimula la lipogénesis *de novo* a través de la inducción por SREBP1c de enzimas como acetil-coA-carboxilasa (ACC) en el hígado. A pesar de la disminución en la señalización de la insulina a través de IRS-2, la hiperinsulinemia compensatoria continúa activando SREBP1c a través de IRS-1, y por tanto

aumenta la disponibilidad de triglicéridos para la formación y secreción de VLDL.

La contribución de los ácidos grasos sintetizados *de novo* a la fracción de ácidos grasos de las VLDL es minoritaria. No obstante la lipogénesis es un importante marcador de la reesterificación de ácidos grasos *versus* su oxidación<sup>319</sup> y existe una importante correlación entre la lipogénesis *de novo* y la secreción de VLDL<sup>320</sup>. La elevación de malonil-coA, que es el producto de la ACC, el enzima que cataliza el paso limitante en la lipogénesis hepática, inhibe la actividad CPT-1 provocando una desviación de los ácidos grasos de las rutas oxidativas y su entrada a la ruta de reesterificación<sup>321,322</sup>.

Por tanto una sobreexpresión de SREBP1c se asociaría con la inducción de la lipogénesis hepática, una disminución en la oxidación de ácidos grasos y la producción de partículas VLDL ricas en triglicéridos, que favorecería el aumento de riesgo aterogénico y la acumulación de lípidos intrahepáticos, características de estados de resistencia a la insulina

Respecto al tejido adiposo, la expresión de SREBP1c está disminuida en obesos respecto a controles no obesos, y más disminuida en obesos diabéticos<sup>179,180</sup>. Estos trabajos corroboran la demostración de que en tejido adiposo de ratones ob/ob y de obesos con progresión hacia diabetes, la expresión de SREBP1c también está disminuida<sup>323,324</sup>. Esta disminución en la expresión de SREBP1c se ha justificado comúnmente por la resistencia a la insulina. De hecho, la pérdida de peso en pacientes obesos se ha asociado con un aumento en la sensibilidad a la insulina y consecuentemente con un aumento en la expresión de SREBP1c en tejido adiposo<sup>179,180,325-327</sup>. Además el factor TNF $\alpha$  liberado por el tejido adiposo de obesos y que se ha relacionado con la resistencia a la insulina asociada a obesidad, bloquea la inducción provocada por insulina en la expresión y procesamiento de SREBP1c en tejido adiposo<sup>180</sup>. Posiblemente este efecto se deba al bloqueo de la ruta de señalización de insulina provocado por TNF $\alpha$ , aunque otros grupos sugieren que la apoptosis inducida por este factor en hepatocitos podría favorecer el procesamiento de SREBP1<sup>328</sup>.

En músculo esquelético, la expresión de SREBP1c está ligeramente disminuida en pacientes con DM2 pero no en obesos<sup>179,180</sup>. Por tanto, las rutas por las que la insulina estimula la expresión de SREBP1 podrían ser distintas en adipocitos y en células del tejido muscular esquelético<sup>179,180,325-327,329</sup>.

Los estados de resistencia a insulina se caracterizan por un bloqueo de la ruta PI3K. No obstante, la hiperinsulinemia compensatoria puede continuar activando otras rutas de señalización como MAPK. Esto justificaría la disminución en la expresión de SREBP1 y en la deposición lipídica en adipocitos de pacientes con DM2 donde la expresión de SREBP1c está mediada por la ruta PI3K, y favorecería la expresión de SREBP1 y el depósito de ácidos grasos en tejidos en los que la inducción de este factor por insulina está mediada por la ruta MAPK como el músculo esquelético. De hecho, como se ha comentado previamente, en músculo esquelético los niveles de SREBP1 no están tan drásticamente disminuidos en estados de resistencia a la insulina<sup>179</sup>.

En resumen, la expresión de SREBP1c en estados de resistencia a insulina tiende a estar alterada en distintos sentidos en función del tejido (tejido adiposo, músculo o hígado). El mecanismo molecular de este hecho no está del todo esclarecido pero podría deberse a diferencias en la sensibilidad de cada tejido al efecto de la resistencia a la insulina sobre la expresión de SREBP1c o podría existir un mecanismo de regulación por insulina distinto en cada tejido.

Este mecanismo reforzaría la idea de que la hiperinsulinemia compensatoria sostenida no es simplemente un marcador de resistencia a la insulina sino que puede tener efectos directos creando un círculo vicioso que deteriore la homeostasis glucolipídica. SREBP1c parece desempeñar un papel en la divergencia entre procesos mediados por insulina.

### **1.5-5. Estudios genéticos previos de la ruta INSIG / SCAP / SREBP1**

Estudios genéticos previos demuestran la contribución de los SREBPs al desarrollo de patologías metabólicas. Estudios de rastreo genómico han relacionado la región 17p11, que incluye el locus del gen *SREBF1*<sup>330</sup>, con concentraciones de leptina en plasma en familias obesas americanas<sup>331</sup> y con alteraciones en IMC en un análisis combinado en cuatro grupos étnicos<sup>332</sup>. Un meta-análisis realizado en cuatro rastreos genómicos en europeos demostró una asociación entre la región 17p11.2 y q22 con DM2<sup>333</sup>.

En el estudio de Védie y colaboradores<sup>334</sup>, se observó que la variante -36delG en la región 5'UTR1a de *SREBF1* estaba asociada con un perfil lipídico aterogénico en hombres con elevado riesgo cardiovascular. Esta misma variante parecía influir en la respuesta del perfil lipídico de pacientes

(mayoritariamente varones) tratados con fluvastatina<sup>335</sup>. En un estudio similar se demostró que los portadores del alelo-G en la variante 2386G>A situada en la región carboxiterminal de SCAP, presentaban un mayor descenso en los niveles de colesterol total y triglicéridos en respuesta al tratamiento con simvastatina, mientras que la variante -36delG en la región 5'UTR1a de *SREBF1* parecía no tener influencia, en un estudio realizado mayoritariamente en mujeres<sup>336</sup>.

Otro estudio en pacientes infectados con VIH-1 demostró que los portadores del alelo C para la variante rs2297508 en el exón 18c del gen *SREBF1* tenían mayor riesgo de desarrollar hiperlipoproteinemia en respuesta a la terapia antiretroviral (HAART)<sup>337</sup>.

Más recientemente mediante estudios de asociación y caso-control<sup>338</sup> realizados en población francesa se demostró que esta misma variante rs2297508 estaba asociada con obesidad en dos grupos independientes de pacientes (odds ratio = 1.5 [1.17–2.00];  $P=0.006$  y  $P=0.02$  respectivamente). Esta variante también se asoció con un aumento del riesgo de desarrollar DM2, y al igual que las variantes -36delG y -150G>A en la región 5'UTR1a de *SREBF1* con una hipertrigliceridemia en varones obesos<sup>338</sup>.

Paralelamente el grupo del Dr. Stephen O'Rahilly en la Universidad de Cambridge describió que un frecuente polimorfismo (rs11868035) localizado en la región intrónica situada entre los exones 18c y 19c de *SREBF1* estaba asociado con el riesgo de desarrollar DM2 en varones pero no en mujeres (odds ratio = 1.42 [1.11–1.82],  $P=0.005$ ), y con niveles de colesterol plasmático<sup>339</sup>. Posteriormente, este mismo grupo confirmó la asociación de dicha variante así como de otras variantes intrónicas con DM2<sup>340</sup>.

Por tanto la dislipemia asociada a *SREBF1* parece desarrollarse en determinados contextos fisio-patológicos, sugiriendo que para su expresión fenotípica son necesarias interacciones gen-gen y/o gen-ambiente.

Aunque todavía no existen datos respecto a la implicación de variantes del gen *INSIG2* en patologías metabólicas humanas, la región cromosómica en la que se encuentra dicho gen ha sido asociada con obesidad<sup>341,342</sup>. Además estudios genéticos en ratones identifican a *INSIG2* como gen candidato de susceptibilidad para la alteración en los niveles de colesterol, ácidos grasos libres, lesiones aórticas o adiposidad<sup>343</sup>.

## **2.HIPÓTESIS**



Nuestra hipótesis se basa en que variantes en el factor *SREBF1* o en genes que lo regulan, como *INSIG2* podrían provocar una alteración en la actividad de SREBP1. Esta actividad anómala de SREBP1 podría estar asociada a un incremento en enfermedades metabólicas como la DM2 tanto por una ganancia como por una pérdida de función. Una ganancia de función provocaría un aumento en la síntesis y acumulación de lípidos en distintos tejidos como el hígado, páncreas o músculo, fenómeno que ha sido implicado en el desarrollo de resistencia a la insulina mediante diversos mecanismos como competición por sustrato, antagonismo con la señalización de insulina o lipotoxicidad<sup>344</sup>.

Por otro lado, considerando a SREBP1c como un factor de transcripción clave en las acciones genómicas de la insulina en el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, una pérdida de función podría provocar un estado de resistencia a la insulina, por una deficiente expansión del tejido adiposo y por una disminución en la inducción hepática de glucoquinasa o de genes lipogénicos.

Por todo ello consideramos a *SREBF1* y a los genes implicados en su regulación, como *INSIG2*, interesantes candidatos que podrían condicionar la susceptibilidad a patologías metabólicas como la DM2.



## **3.OBJETIVOS**

Objetivos

**Objetivo1**

Crear una genoteca de pacientes diabéticos tipo 2, pacientes con obesidad mórbida, pacientes con síndrome metabólico, controles sanos e individuos de población general valenciana.

**Objetivo2**

Realizar un rastreo molecular del gen *SREBF1* para investigar la posible existencia de mutaciones y/o polimorfismos en pacientes con diabetes tipo 2, estudiando las posibles características clínicas de los pacientes portadores de las mismas para establecer una correlación fenotipo/genotipo, así como su asociación con el riesgo de DM2.

**Objetivo3**

Estudiar la asociación entre variantes frecuentes del gen *INSIG2* y el riesgo de diabetes tipo 2, así como la correlación fenotipo/genotipo en los portadores de dichas variantes.

**Objetivo 4**

Investigar en distintos modelos experimentales si alguna de las mutaciones identificadas en *SREBF1* y en la región promotora de *INSIG2* modifica funcionalmente a dichos genes. En caso afirmativo, elucidar el mecanismo molecular por el que se produce esta modificación.



## **4.MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4.1- PACIENTES Y CONTROLES**

### **4.1-1. Grupos de población estudiados**

En este estudio se analizaron muestras de: (i) diabéticos tipo 2 no emparentados, de edad inferior a 79 años y glucemia en ayuno  $\geq 7.0$  mM (126 mg/dl); (ii) individuos con obesidad mórbida ( $IMC > 40$  Kg/m<sup>2</sup>); (iii) pacientes diagnosticados como “Síndrome metabólico” según el criterio del NCEP:ATP III (National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III)<sup>345</sup> basado en la manifestación de tres o más de estas características: elevación en la glucemia basal ( $GB \geq 110$  mg/dl), hipertensión arterial ( $HTA \geq 130/85$  mmHg), niveles altos de triglicéridos ( $TG \geq 150$  mg/dl), disminución en el colesterol-HDL (HDL-c  $< 40$  mg/dl en hombres y  $< 50$  mg/dl en mujeres), obesidad central valorada en función del perímetro de la cintura ( $\geq 102$  cm en hombres y en mujeres  $\geq 88$  cm); (iv) controles no diabéticos no insulino-resistentes y (v) muestras de población general valenciana cedidas por el Centro de Transfusiones de la Generalitat Valenciana

La extracción de muestras de sangre de pacientes y controles no diabéticos así como su diagnóstico se realizó en el Servicio de Endocrinología del Hospital Dr. Peset (Valencia). El estudio fue aprobado por el comité de ética de dicho hospital. Tanto los pacientes como los controles incluidos en el estudio dieron su consentimiento informado.

Las determinaciones bioquímicas y hormonales se realizaron tras el ayuno nocturno e incluyeron: glucosa basal, insulina basal, resistencia a insulina (índice HOMA), hemoglobina glicosilada (HbA1c) y perfil lipídico (colesterol total, HDLc, LDLc, VLDL y triglicéridos). En el estudio también se determinó el peso corporal, la altura, el índice cintura/cadera y la presión arterial.

### **4.1-2. Obtención ADN genómico**

El ADN genómico se obtuvo a partir de 5 ml de sangre completa recogida en EDTA. Para su obtención primero se realizó una centrifugación a 465g (2000rpm) durante 20 min a temperatura ambiente y con fuerza de

desaceleración mínima. La parte superior, correspondiente al suero, se eliminó y la interfase que contenía las células blancas se colocó en un tubo de 50ml en el cual se continuó la purificación.

Las glóbulos rojos fueron lisados añadiendo 30mL de solución de lisis (SL) compuesta por 0,9% NaCl y 0,1% nonidet P-40, agitando fuertemente durante 2min hasta disgregar la masa celular. Tras esta agitación inicial se incubó 5min a temperatura ambiente y se agitó nuevamente durante 1min.

Las muestras se centrifugaron durante 40min a 1500g a temperatura ambiente con fuerza de desaceleración intermedia. El sobrenadante se eliminó por decantación y el precipitado se lavó en 30ml de SL mediante una agitación enérgica durante 2min tras lo cual se centrifugó nuevamente. Después se realizó otro lavado en idénticas condiciones.

El precipitado de células blancas obtenido se lisó vorteadando enérgicamente durante 1min. Tras la lisis se añadió 0,8mg de proteinasa K en 3,5ml de solución NLB (400mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8,2 y 0,2%SDS) y se incubó 18h a 37°C.

Tras esto, se añadió 0,4mg de proteinasa K y se incubó a 50°C durante 1h 30min. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 1270µl de acetato amónico 7,5M a 4°C para precipitar las proteínas. Tras una incubación de 10min a 4°C se centrifugó 60min a 4000rpm a 4°C con baja fuerza de desaceleración.

El sobrenadante se decantó en un tubo de 50ml limpio donde se precipitó el ADN añadiendo 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C (generalmente 12,5ml de etanol a 5ml de sobrenadante).

El ADN precipitado se recuperó mediante una pipeta de vidrio con la punta doblada a la llama, se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire.

Una vez seco, el ADN se disolvió por volteo a 4°C durante 24-48 horas en 1ml de tampón TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0)

## **4.2- ESTUDIO DEL GEN *SREBF1***

### **4.2-1. Amplificación del gen *SREBF1* mediante PCR**

El gen *SREBF1* se amplificó a partir de ADN genómico utilizando oligonucleótidos específicos diseñados mediante el programa Primer Express V 2.0 (Applied Biosystems Foster City, CA. EEUU), de acuerdo con las secuencias publicadas previamente<sup>330</sup> para incluir las secuencias codificantes y las regiones de unión intrón-exón (**tabla 3**).

Exón	Amplicon	Oligo directo	Oligo reverso
1c	1	TCAACGGCTTCAAAAATCCG	GAGGCATTGTATAAAGGGCTGG
2	1	CCTCACTCACGCACCCTCTT	AATGGAGTGGGTGCAGGC
	2	CCTGCACCCACTCCATTGA	GTCCCCTCCCGCCACA
3	1	GCAGCCCCATGCTTTATTTCT	GCTTGGCTGTAAGCTGTGTGTCT
4	1	TTACAGCCAAGCCTCTCCCA	CTTATGCCCTGCCACGT
5	1	CACATGCCACCTGGTAACA	TGCAGGCCTCTCCACACC
6	1	CCACACCGTGCAGCTGAATA	GAGGTGGAGCAAGGCTAGAGAAG
7	1	TGTTCCCTTCGGCCCA	CAGGGCCCAACCTTGCT
8	1	ACCCACCCAGGCAAAGC	CCGGTCCCACCTCTGCT
9	1	AGCTTCCCCTCTGTCCATAGATG	GGAACAAGGGTTGACACCCA
10	1	GCTGCTCTGACCTCACTTTTCTC	TGAGGTTCCAGAGGAGGCTACA
	2	GTAGCCTCCTCTGGAACCTCATC	CCACGCTCAGTCCTACCCAT
11	1	TGCCTGTGCTCCACCCA	CCCAACCCACTCACTGTCAGA
12	1	CAGCGTTTCTTCTGAGCAG	AAGAGAGCACCTGGGTTCCC
13	1	TCTCCACAGTGGACCCCT	ACTTACTTGTCCCATCAGCTGA
14	1	TAGGACCCCTGCCATCTGTT	GGAGCTGAGAAGGGAGCCA
15	1	TCCCTTCTTGCAGGCGTA	AGGAACCTGCCGTGCACT
16	1	ACTGGTCTGACTGGCACTCTTCT	TCACCTTGTAATGGAGCTGC
17	1	CAGGCCGTGCAGCTGTT	CACTCACCCCTCCGCATGG
18	1	TGTCTTCACTGATGGATGTGC	CTAACAAACAACATCGGGAAGAG
19c	1	GCTGTGTCAACCCTTAGGCG	GAGGAGGCTTCTTTGCTGTGA
	2	CTGCCGCCACACTGGAG	GAGTAAAAAACAGTCATTGCATTGAGA

Tabla 3: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el rastreo molecular del gen *SREBF1* mediante SSCP

Las reacciones de amplificación por PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 10min a 95°C seguida de cuarenta ciclos de 15 seg a 95°C y 1min a 60°C. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25µl conteniendo 750mM Tris-HCl (pH = 9), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 200mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, 0,001% BSA, 0,2mM dNTPs, 300nM de cada oligonucleótido, 1U Netzyme<sup>®</sup> ADN polimerasa y 50ng de ADN genómico. Los distintos productos de PCR se analizaron mediante la técnica SSCP (single-strand conformation polymorphism).

#### **4.2-2. Rastreo molecular del gen *SREBF1* mediante SSCP**

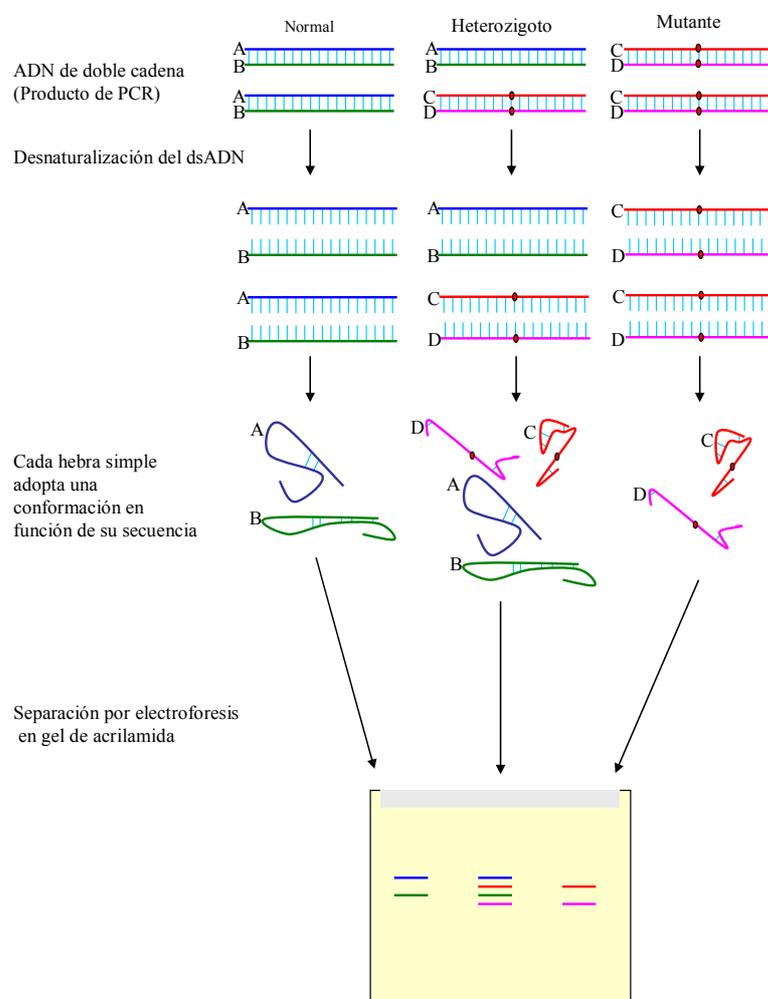
Esta técnica se basa en el hecho de que si se desnaturaliza el ADN amplificado por PCR y se deja renaturalizar mientras se realiza una electroforesis, además de la banda correspondiente a la doble cadena, se obtendrán bandas correspondientes a las distintas conformaciones secundarias de las cadenas sencillas, que variarán en función de la secuencia y longitud de dichas cadenas. Si dicha longitud es adecuada (150-250pb) un cambio en una única base puede alterar la conformación secundaria de las cadenas simples y por tanto su migración (**figura 9**). De este modo, al hacer

una tinción con nitrato de plata podrán ser visualizadas las bandas resultantes de esas conformaciones alteradas.

Los productos de PCR fueron diluidos diez veces en el tampón de desnaturalización de SSCP (95% formamida, 0.025% azul de bromofenol y 0,025% xylene cyanol), y desnaturalizados 10 minutos a 95°C. Esta desnaturalización es seguida de un rápido enfriamiento en hielo. Alícuotas de cada reacción fueron cargadas en un gel no desnaturalizante de acrilamida al 12% (acrilamida N-N'-bisacrilamida 29:1). Para la identificación del mayor número posible de polimorfismos se utilizaron distintas condiciones de electroforesis (con o sin 5% de glicerol, migración a 21°C o a 4°C). La electroforesis se realizó en tampón TBE1x a 800V/0,35mA/ 028W durante 12h. Tras la electroforesis las distintas bandas se visualizaron mediante revelado por tinción de plata que se realizó siguiendo los siguientes pasos: (1) Se fijó el gel 10 minutos en etanol al 10% y se lavó con agua destilada (2) Se incubó durante 3min en ácido nítrico al 65% para realizar la oxidación y se lavó con agua destilada (3) Posteriormente se incubó con 12mM (2,02g/L) de nitrato de plata durante 20min (4) Tras este paso se eliminó la plata y se lavó con agua destilada dos veces. (5) Posteriormente se añadió el revelador [29,6g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 540μl/l formaldehído] agitando rápidamente y eliminando el revelador (6) Una vez eliminado el revelador oscurecido se añadió revelador nuevo agitando suavemente hasta la visualización de las bandas (7) Como último paso, la reacción se detuvo incubando con ácido acético no glacial al 10% durante 5 minutos.

Los productos que presentaban un patrón de migración alterado se secuenciaron en la unidad de secuenciación del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC) mediante el método descrito por Sanger y colaboradores<sup>346</sup> con el kit *v2.0 BigDye terminator cycle sequencing* y un secuenciador ABIPrism 3100 (Applied Biosystems Foster City, CA, EEUU) con los mismos oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR.

En el caso de las variantes encontradas en la región 3'UTR de la isoforma SREBP1c se aislaron clones para su secuenciación. Esto se debió a que las variantes 3'UTR+208delCC y 3'UTR+334delTTT presentan una elevada heterozigosidad y se encontraban en un alto desequilibrio de ligamiento, de forma que al secuenciar directamente, la señal del alelo normal y delecionado se superponían, dificultando su interpretación.



**Figura 9: Esquema de la técnica SSCP.** La secuencia a estudiar (150-250pb) se amplifica por PCR y el ADN de doble cadena (dsADN) obtenido es desnaturalizado. La conformación adoptada por las cadenas simples dependerá de las interacciones entre bases de la misma cadena, por lo que probablemente una alteración en la secuencia modificará suficientemente el ratio tamaño/carga como para ser distinguida en una electroforesis a través de una matriz retardante.

Para evitarlo, se clonaron los productos de PCR de las muestras que presentaban patrones de migración anómalos por SSCP en el vector pGEMTEasy (Promega, Madison, WI. EEUU). La ligación resultante se transformó mediante electroporación en *E.coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes

que se sembraron en placas de LB-ampicilina. Distintas colonias individuales fueron crecidas en minicultivos de 4ml de LB-ampicilina. Los plásmidos amplificados por cada clon se purificaron mediante minipreps (Marligen Biosciences) y se secuenciaron como se ha descrito previamente.

#### **4.2-3. Nomenclatura de las mutaciones y polimorfismos**

Todas las mutaciones y polimorfismos se han descrito siguiendo la nomenclatura recomendada en [<http://www.hgvs.org/mutnomen>]<sup>547</sup>. Cuando se ha considerado necesario en el texto se ha utilizado una nomenclatura adicional de dichas variantes que facilite la interpretación de los resultados. Como referencia se utilizó la secuencia NM\_004176.3, correspondiente al ADNc de SREBP1 depositada en *GeneBank*.

#### **4.2-4. Genotipado de SNPs y deleciones en SREBF1**

Los SNPs del gen *SREBF1* seleccionados para el estudio de asociación se genotiparon mediante la técnica de minisequenciación o SnapShot. Brevemente, la técnica consiste en una primera amplificación de un fragmento de PCR que incluye el SNP de interés y una posterior reacción de secuenciación donde se utiliza un oligonucleótido como cebador que queda exactamente en la posición anterior al SNP. La minisequenciación consiste en la incorporación de un único ddNTP que porta un marcador fluorescente. Es por ello que la purificación del producto de PCR es un paso importante para evitar la contaminación con dNTPs en la reacción de minisequenciación, que alargaría la reacción unas pocas bases más allá de la posición problema haciendo imposible la detección del SNP por el programa de análisis.

El sistema está ideado para la detección simultánea de diferentes SNPs en cada muestra. Así, tanto la amplificación de los diferentes productos de PCR como la propia reacción de minisequenciación son de tipo multiplex (en ambos casos se amplifican una serie de productos diferentes en la misma reacción).

La detección y análisis de la minisequenciación se basa en los diferentes tamaños de los productos correspondientes a cada SNP que se introducen gracias a diferencias en el tamaño de las colas con las que se sintetizan los oligonucleótidos de la reacción.

El ADN genómico se amplificó por multiplex PCR (Qiagen<sup>®</sup> multiplex PCR kit, Qiagen<sup>®</sup>) de forma que se amplificaran específicamente los fragmentos

correspondientes a todos los polimorfismos estudiados en *SREBF1*. Los oligonucleótidos se diseñaron mediante el programa Primer3 software Release 1.0b ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) para (1) amplificar cada SNP independientemente, (2) amplificar una secuencia suficientemente amplia alrededor de cada SNP para permitir la reacción de minisequenciación y (3) que los distintos fragmentos tuvieran tamaños distinguibles en un gel de agarosa. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **tabla 4**.

OLIGOS PCR MULTIPLEX		
SNP	OLIGO DIRECTO	OLIGO REVERSO
SREBP1-688C/T	CTTTGGCCACTCCTGTCCTC	GGGCCAGTTACATCACTCTGC
SREBP1-150G/A	CCCCGCTCTCTCAAGGTG	CCTCGTACGGCCCTTCCTA
SREBP1-451C/A	GGAGTAAACGGAGGGTTGGAG	CTGAATGGGGTTGGGGTTAC
SREBP1-435T/C	GGAGTAAACGGAGGGTTGGAG	CTGAATGGGGTTGGGGTTAC
SREBP1-60G/A	CGCTCAACGGCTTCAAAA	CAGGAGACGGAGGCATTGTA
SREBP138G/A	CGCTCAACGGCTTCAAAA	CAGGAGACGGAGGCATTGTA
SREBP1-A1000T	GCAGCTGTTCTGTGTGACC	CTGCTCAGGTCCTGGTTGG
SREBP1-54G/C	CAGCTGATGGATGTGTGAC	TCCCCACTCTCCCACTAAC
SREBP1-rs11868035	CACATGGTTGGGCTGTGTC	CCCAAGCTGTAGCTCCTGTC
OLIGO MINISECUENCIACIÓN		
SNP	OLIGO MINISECUENCIACIÓN	
SREBP1-688C/T	5' tatatatatatatatatatCCCTCCACATGTGCTACTAGCCT 3'	
SREBP1-150G/A	5' atatatatatatattCCCAGTTTCCGAGGAACTTTTTC 3'	
SREBP1-451C/A	5' tatatatatatataTCCCGCCCCCTTCGTT 3'	
SREBP1435T/C-5	5' tatatatatatatatatatatatatatGGTGTGTTGGGCCAGGACTT 3'	
SREBP1-38G/A	5' atatatatatatatatataCCTTGGGGCGTCCAGG 3'	
SREBP1-60G/A	5' CCTTGACAGGTGAAGTCGGC 3'	
SREBP1-A1000T-5	5' atatataTGGGGCCTGCTGCTGG 3'	
SREBP1-54G/C-5	5' tatatatatatatatatatatatatatCCTCCCCAGCACCTAGG 3'	
SREBP1-rs11868035-5	5' tatatatatatatatatatatatatatataCTCCCAGCTCTGTCCCCAT 3'	

**Tabla 4: Oligonucleótidos empleados en la PCR multiplex y en la minisequenciación para el genotipado de las variantes presentes en el gen *SREBF1*.**

Los productos de PCR fueron digeridos con 0,1 unidad de Exonuclease I y 1 unidad de *Shrimp alkaline phosphatase* (USB corporation, Cleveland, EEUU) para eliminar todos los dNTPs y primers. 2µl de los productos de PCR no fluorescente purificados se utilizaron como molde para las reacciones de minisequenciación mediante el sistema SNaPshot® Multiplex–Kit (Applied Biosystems Foster City, CA, EEUU; [www.appliedbiosystems.com/](http://www.appliedbiosystems.com/)) en un termociclador GeneAmp® PCR 9700 (Applied Biosystems). Los productos resultantes se analizaron en un sistema

ABI3730 ADN analyzer (Applied Biosystems) mediante el programa GeneMapper 3.5 software (Applied Biosystems).

Los resultados se confirmaron por secuenciación directa del producto de PCR en un 10% de las muestras.

Las variantes 5'UTR1a-36delG, IVS1-11delTCC, 3'UTR1c+208delCC y 3'UTR1c+334delTTT, en las que hay deleciones de uno o más nucleótidos, se genotiparon mediante análisis del tamaño de fragmentos de PCR en un sistema de electroforesis capilar. Brevemente, la técnica consiste en la amplificación de un fragmento de PCR que incluye el polimorfismo de repetición problema y en el que uno de los dos cebadores lleva incorporado un marcador fluorescente. En función del número de repeticiones del polimorfismo en cuestión, o de la presencia de deleción o inserción, el tamaño del fragmento de PCR variará entre muestras.

Esta técnica se utiliza para la detección simultánea de varios polimorfismos en cada muestra, con lo que la amplificación de los productos de PCR se realiza mediante PCR multiplex. En este caso, se utilizan cuatro marcadores fluorescentes (FAM, NED, VIC y PET) con distinta emisión para diferenciar los distintos polimorfismos. Esta técnica permite, variando los tamaños de los productos de PCR y combinando las marcas fluorescentes, la detección de un elevado número de polimorfismos en una misma muestra.

Para genotipar las deleciones identificadas en el gen *SREBF1* se comenzó realizando una PCR multiplex en las condiciones descritas para los SNPs pero realizando una extensión final de 30 min para evitar diferencias en la longitud de los fragmentos debidas a la incorporación final de nucleótidos de adenosina.

1µl de una dilución 1:4 del producto de PCR resultante y 0,04µl de patrón de tamaños de fragmentos (G500LIZ, Applied Biosystems) se diluyeron en 4,5µl de formamida y se analizaron en un secuenciador ABI3730 ADN analyzer system (Applied Biosystems) de 48 capilares. El análisis se realizó por medio del programa GeneMapper v3.5 (Applied Biosystems).

Los oligonucleótidos utilizados en la PCR multiplex fueron diseñados con el programa Primer3 software Release 1.0b y se recogen en la **tabla 5**.

VARIANTE	OLIGONUCLEÓTIDO	Producto (pb)
SREBP1_36DEL_G-5	CTGAGGCCAGGGCAGGA	164
SREBP1_36DEL_G-3(6FAM)	AAAGCCGCCTCGCTGAAG	
SREBP1_364DEL_3T-5	TTTTCCAAAACAATCGTTGTATCTTT	127
SREBP1_364DEL_3T-3(NED)	CTGAAGATTGTGTGTATCGAGCTG	
SREBP1_238DEL_2C-5(VIC)	GGGGAGGTTTCCTGTTCTGTG	100
SREBP1_238DEL_2C-3	CCAGGCTTTAGGTTGGGGAAT	
SREBP1_ivs1DEL_TCC-5	TGTATGTCCGGGAACACCAG	229
SREBP1_ivs1DEL_TCC-3(PET)	GTCAAATAGGCCAGGGAAGTCAC	

**Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados en el análisis de fragmentos para el genotipado de las deleciones encontradas en el gen *SREBF1*. pb: pares de bases**

#### 4.2-5. Análisis informático

Las variantes encontradas en las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *SREBF1* se analizaron mediante el programa RNAstructure version 4.3.

La secuenciación de ADN se representó utilizando el programa Chromas versión 1.45 y la identidad de las secuencias se confirmó utilizando las secuencias SREBP1a (NM\_004176.3) y SREBP1c (AK091131.1), depositadas en las bases de datos del GeneBank.

Las variantes próximas a las regiones de unión intrón-exón pueden tener un efecto sobre la expresión del mensajero a través de la creación o eliminación de sitios donadores o aceptores de *splicing*. Para predecir el efecto de las variantes encontradas sobre el procesamiento del ARNm se utilizó el programa NetGene2 (Center for Biological Sequence Analysis. The Technical University of Denmark)<sup>348,349</sup>.

Para el estudio de posibles sitios de fosforilación en SREBP1 se utilizaron los programas NetPhosK 1.0 y NetPhos 2.0; para el estudio de posibles sitios de o-glicosilación se utilizó el programa de predicción YinOYang 1.2. El estudio de la conservación del residuo Thr202 en los homólogos de SREBP1 en distintas especies se realizó mediante el alineamiento con el programa Multialin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>)<sup>350</sup>.

Los árboles genealógicos de las familias portadoras de la variante Thr202Met y de la variante 5'UTR -38G>A SREBP1c se representaron utilizando el programa Cyrillic 2.

Los estudios de asociación de variantes individuales y haplotipos identificados en los genes *SREBF1* e *INSIG2* se realizaron mediante el programa SNPstat, Pypop win32.0.6.0 y Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). El cálculo de potencia estadística del estudio genético se realizó utilizando el programa *Genetic power calculator* (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html>)<sup>351</sup>. El estudio de asociación de las variantes encontradas con los parámetros bioquímicos y antropométricos de la población estudiada se realizó mediante un modelo lineal univariante utilizando el programa SPSS 11.5.

#### **4.2-6. Clonación de SREBP1a y 1c humanos**

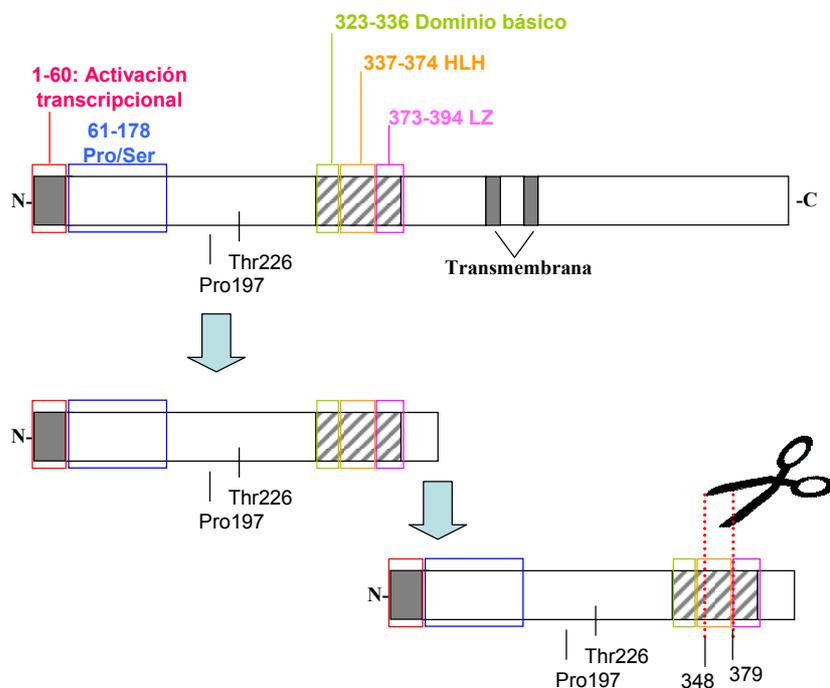
El ARN total se aisló a partir de 5ml de tejido adiposo humano mediante el reactivo TRIPURE (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) basado en la técnica descrita por P. Chomczynski y N. Sacchi<sup>352</sup>. La primera cadena de ADNc se sintetizó utilizando la MMLV Reverse Transcriptase ARNse H Minus, Point Mutant (Promega, Madison, WI. EEUU), y un oligonucleótido específico de la secuencia humana de *SREBF1* (5'-TGAGGTTCCAGAGGAGGCTACA-3'). Las formas "maduras" de SREBP1c (aa 1-403) y SREBP1a (aa 1-427) se clonaron por PCR (**Figura 10**), utilizando este ADNc como molde y los siguientes oligonucleótidos: (i) SREBP1c, oligonucleótido directo 5'-GCGGCCGGTACCCGGAGCCATGGATTGCACTTTC-3', oligonucleótido reverso 5'-GCGGCCAAGCTTTCATGGGGTCAGTGTGTCCTCCAC-3'; (ii) SREBP1a, oligonucleótido directo 5'-CTGCGCCATGGACGAGCCAC-3', con el mismo oligonucleótido reverso utilizado para la isoforma 1c. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min a 95°C, y 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 58°C y 90s a 72°C, seguidos por 10min a 72°C. Los productos de PCR fueron ligados en el vector pGEMTEasy (Promega, Madison, WI. EEUU), y posteriormente subclonados en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA. EEUU). La especificidad de los productos fue confirmada por secuenciación.

La mutagénesis dirigida se realizó utilizando el *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA. EEUU). Esta técnica permite introducir una mutación puntual en un ADN bicatenario clonado en un plásmido realizando una PCR con unos largos cebadores complementarios entre si y que en mitad de su secuencia contienen la variante deseada. El producto de PCR es digerido con el enzima *DpnI* para eliminar la hebra parental metilada y no mutada. El producto de la digestión es purificado y

transformado en bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  que repararán las “muecas” en los plásmidos mutados.

Los oligonucleótidos utilizados para realizar la mutagénesis de la variante Thr202Met son directo\_5'-GCCCCACGGCAGCCCCTGTAA**T**GACCACTGTGACCTCGCAGATCC-3', reverso\_5'-GGATCTGCGAGGTCACAGTGGTC**A**TTACAGGGGCTGCCGTGGGGGC-3' y para la variante Pro173Leu son directo\_5'-GGCTTCCCCGCCAGGGGTCC**T**GCCCGTCTCCTTGCACACCCAGG-3', reverso\_5'-CCTGGGTGTGCAAGGAGACGGGC**A**GGACCCCTGGCGGGGAAGCC-3'.

Como control negativo se utilizaron unas formas truncadas de SREBP (sin los aminoácidos 348-379 de SREBP1a y aminoácidos 324-355 de SREBP1c) que fueron generadas eliminando las secuencias correspondientes mediante digestión con la endonucleasa *Sml*I. Los plásmidos linealizados fueron religados con T4 ADN ligasa para generar las construcciones Mut-1a y Mut-1c (**figura 10**).



**Figura 10: Representación esquemática de los dominios estructurales más importantes de SREBP1.** La numeración de los aminoácidos se ha realizado respecto a la isoforma 1a que es la más larga ya que en su primer exón tiene 29 aa, mientras que el de la isoforma 1c sólo tiene 5 aa. Esta región ácida aminoterminal es el dominio de transactivación. Los aminoácidos 61-178 corresponden a la región rica en prolina y serinas. Los aminoácidos 179-322 se han descrito como una región de “baja complejidad” que por el momento está mal caracterizada. Los residuos 323-394 corresponden a la región básica (323-336) hélice-bucle-hélice (337-374) cremallera de leucinas (373-394). Los residuos 1-427 de la isoforma 1a y 1-403 de la isoforma 1c corresponden a la región madura que se ha clonado en los distintos vectores de expresión. Las formas inactivas Mut1a y Mut1c utilizadas como controles negativos se obtuvieron eliminando los aminoácidos 348-379 y 324-355 respectivamente.

#### **4.2-7. Preparación de adenovirus recombinantes**

El sistema AdEasy fue generosamente proporcionado por Dr. Vogelstein (The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD). Este sistema permite la introducción del gen de interés en el genoma adenoviral mediante recombinación homóloga en cepas BJ5183-AD-1 de *E.coli* y la selección de los clones positivos con kanamicina (**figura 11**). Los vectores adenovirales permiten la sobreexpresión de la proteína de interés en la

mayoría de células humanas, tanto replicativas como no, sin que la infección afecte generalmente a la viabilidad celular. Además el virus no se integra sino que permanece epicromosómico y por tanto no inactiva genes endógenos de la célula huésped.

Las regiones codificantes correspondientes a las formas maduras de SREBP1c WT, Pro173Leu y Thr202Met se clonaron inicialmente en los sitios *KpnI-HindIII* del vector pAd Track-CMV. Este vector de transferencia codifica la proteína de fluorescencia verde (GFP) y el gen de interés mediante promotores CMV independientes permitiendo, una vez obtenido el adenovirus, el seguimiento de la infección mediante técnicas como microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

Los plásmidos resultantes se linealizaron por digestión con *PmeI* y se transformaron en células *E.coli* BJ5183-AD-1 competentes (Stratagene) que ya contenían el plásmido pAdEasy-1. Este plásmido codifica la estructura principal del adenovirus (adenovirus-5 backbone) pero carece de las regiones E1 y E3, responsables de la replicación del virus y de la modulación de la respuesta inmune de las células infectadas respectivamente. La selección de los clones positivos puede realizarse en placas de LB-kanamicina debido a que los plásmidos pAd Track-CMV linealizados ofrecen una baja resistencia al antibiótico. La recombinación fue confirmada por análisis por restricción y PCR de los clones seleccionados.

El ADN de los clones positivos es transformado en *E.coli* DH5 $\alpha$  que poseen baja capacidad de recombinación homóloga. Los plásmidos recombinantes se linealizaron con *PacI* para exponer las regiones ITR (inverted terminal repeats) que actúan como origen de replicación y se transfectaron en células HEK293A que contienen los genes E1 virales permitiendo la replicación del adenovirus. Los virus se obtuvieron tras 7-10 días y posteriormente se reamplificaron realizando sucesivas infecciones en estas mismas células.



Los adenovirus se obtuvieron tanto directamente del medio de cultivo celular como del extracto de las células HEK293A para lo cual se recogieron las células por centrifugación, se resuspendieron en PBS1x y se lisaron mediante tres ciclos de congelación en baño de hielo seco-etanol y descongelación en baño a 37°C. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13000rpm durante 10 min. La titración de los extractos víricos obtenidos se realizó tanto por espectroscopía (OPU: *optical particle unit*) como por el método TCID<sub>50</sub> (*tissue culture infectious dose 50*). La cuantificación espectroscópica se basa en valorar las OPU mediante la absorbancia a 260nm asumiendo que la cantidad de proteínas y ADN de los viriones lisados es proporcional a la concentración de partículas víricas (1OD=1,1x10<sup>12</sup> adenovirus) aunque no permite distinguir si son infectivas o no. El método TCID<sub>50</sub> se basa en la determinación en cultivos de células HEK293A en placas de 96 pocillos de la cantidad de pocillos que presentan efectos citotóxicos al incubarlas con diluciones seriadas del extracto vírico.

El genotipo de los adenovirus empaquetados se confirmó nuevamente por PCR. Para ello se digirieron 5µl de cada extracto vírico con 10µg de proteinasa K durante 1 hora a 55°C. Posteriormente se inactivó la proteinasa K incubando 5min a 100°C. La digestión se purificó con una columna de purificación de productos de PCR y se realizó la PCR y posterior secuenciación de la misma. En las distintas infecciones se utilizó como control el adenovirus Ad-LacZ que expresa β-galactosidasa y GFP bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV).

#### **4.2-8. Cultivo primario de hepatocitos de rata e infección con adenovirus**

Los hepatocitos se aislaron por el método tradicional de digestión con colagenasa. Para ello ratas wistar macho de 250 gramos de peso se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentotal sódico (18mg pentotal / 100 gramos de peso). Tras la anestesia se inyectó en la vena femoral 0,5ml de heparina al 1% para evitar la coagulación sanguínea. El hígado se lavó mediante perfusión a 40ml/min con solución Hepes (20mM Hepes, 1mM KCl; 1mM MgSO<sub>4</sub>, 5mM fosfato potásico, 150mM NaCl y 10mM glucosa a pH 7,4) a través de la vena porta. Para facilitar el drenaje, se abrió una salida provisional en la cava inferior por debajo de la desembocadura de las venas renales. Tras esto se digirió mediante perfusión con una solución de colagenasa A en hepes (60mg colagenasa A + 150µl

CaCl<sub>2</sub> 1M en 150ml de solución hepes). Los hepatocitos aislados en 40ml de solución hepes se centrifugaron 5min a 500rpm. El precipitado celular se lavó dos veces mediante suspensión en medio de cultivo y posterior centrifugación. Tras el último lavado se suspendieron los hepatocitos en medio de cultivo y se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo de exclusión del azul tripán, siendo siempre superior al 85%.

Los hepatocitos se sembraron a una densidad de  $8 \times 10^6$  células por placa (placas de 100mm de diámetro) en medio DMEM 25mM glucosa, suplementado con 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 10% suero bovino fetal (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA. EEUU), 100 nM dexametasona, 10 nM insulina y 100 nM triiodotironina (T<sub>3</sub>) (Sigma Chemica Co, St. Louis, MO. EEUU). Tras la adhesión celular (4 horas) el medio fue sustituido por medio DMEM bajo en glucosa (5mM) libre de hormonas y suplementado con 2% FBS, glutamina y antibióticos.

Para la infección con adenovirus, las células fueron cultivadas durante 16 horas en medio DMEM bajo en glucosa, tras las cuales los hepatocitos fueron incubados durante 2h con adenovirus a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. Tras esta incubación, el medio de infección fue sustituido por medio fresco.

#### **4.2-9. Cultivo celular y ensayo luciferasa para valorar la actividad de las proteínas SREBP1 silvestres y mutadas**

Células COS-7 procedentes de riñón de mono africano (*Cercopithecus aethiops*) se crecieron en medio DMEM 25mM glucosa, 100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml estreptomycin suplementado con 10% FBS a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub> y en una atmósfera humidificada. Las células fueron subclonadas semanalmente mediante tratamiento con 0,2-0,5M Tripsina-EDTA.

Las distintas construcciones se transfectaron en células COS-7 utilizando Lipofectamina plus (Invitrogen, Carlsbad, CA. EEUU) en presencia de 10% FBS. Los vectores de expresión para SREBP1c silvestre o Thr202Met (750 ng) se transfectaron junto con 1500 ng de un vector reportero que contenía el promotor de la glucoquinasa hepática de rata controlando la expresión del gen de la luciferasa (pRGKL-1448) o el vector vacío (pGL3 basic), y 750 ng del vector pGFPN1 como control interno (BD Biosciences, San José, CA. EEUU). Para asegurar la especificidad de los resultados se utilizó como control el mismo vector reportero al que se le habían mutado los dos sitios “SRE” presentes en el promotor de la glucoquinasa hepática (pRGKL-

1448mab); ambos vectores reporteros fueron cedidos por el Dr. Ahn, Yonsei University College of Medicine, Korea) La actividad transcripcional fue cuantificada 24h tras la transfección utilizando el sistema *luciferase reporter gene assay* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en un luminómetro Wallac 1420 VICTOR. La actividad luciferasa fue normalizada respecto a la fluorescencia de la GFP o respecto a la concentración de proteína determinada por Bradford.

La técnica de la luciferasa permite determinar directamente en cultivos de células eucariotas la actividad de un promotor en respuesta a distintas condiciones experimentales (tratamientos farmacológicos, sobreexpresión de proteínas, etc). La firefly luciferasa es una proteína monomérica de 61KDa proveniente de *Photinus pyralis* que no necesita modificaciones postraduccionales para ser catalíticamente activa y oxidar a la luciferina hasta oxiluciferina en una reacción bioluminiscente. La técnica se basa en cuantificar la expresión de la firefly luciferasa a través de la reacción de bioluminiscencia que esta cataliza (**figura 12A**). La reacción es lineal en un amplio rango de concentraciones, dentro del cual la cantidad de luz emitida será proporcional a la expresión de la firefly luciferasa. La actividad luciferasa puede normalizarse directamente respecto a la concentración total de proteína, aunque normalmente para corregir diferencias debidas a la eficiencia de la transfección se suele cotransfectar un plásmido control que exprese otra proteína cuya expresión no se vea condicionada por los tratamientos utilizados en el ensayo y que sean fácilmente cuantificables sin interferir con la reacción de la firefly luciferasa (Ej: GFP,  $\beta$ -galactosidasa o renilla luciferasa)

La renilla luciferasa es una proteína monomérica de 36KDa proveniente de la *Renilla reniformis* que también cataliza una reacción luminiscente (**figura 12B**) y que es muy diferente a la firefly luciferasa en cuanto a estructura y requerimientos de sustratos debido a su distinto origen evolutivo. Estas diferencias hacen posible discriminar eficazmente entre la señal de uno u otro enzima de forma que podemos medir la actividad firefly luciferasa y posteriormente bloquear dicha reacción y medir la actividad renilla luciferasa en el mismo tubo evitando la dispersión provocada por errores de pipeteo.

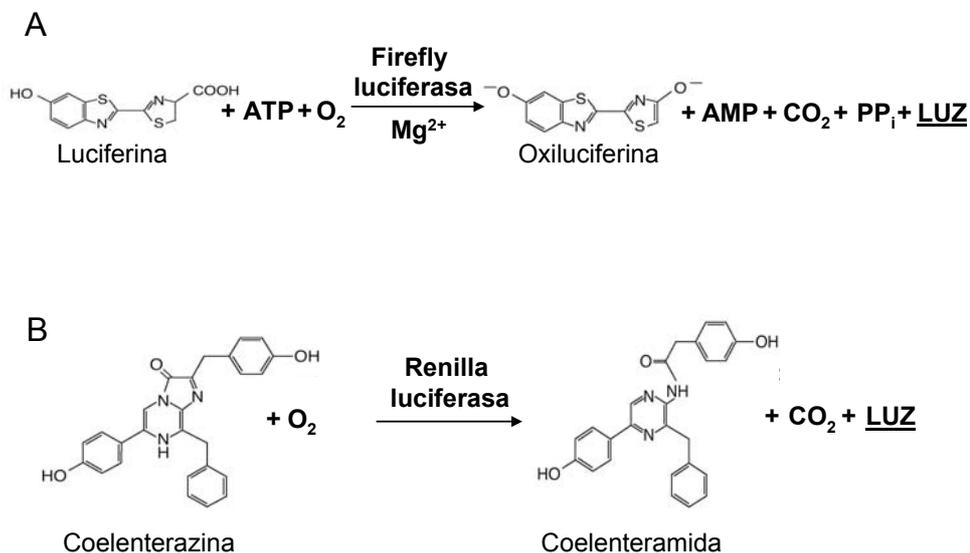


Figura 12: Reacciones bioluminiscentes catalizadas por la firefly luciferasa (A) y renilla luciferasa (B).

#### 4.2-10. Ensayos de retardo electroforético (EMSA)

La técnica EMSA permite determinar la formación de complejos proteína-ADN en una electroforesis no desnaturizante en gel de acrilamida debido al retraso en la migración electroforética del complejo respecto a la sonda de ADN no unida a proteína. La incubación adicional de un anticuerpo específico de una proteína implicada en el complejo provocaría un mayor retraso en la migración, lo cual se conoce como *supershift* y permite demostrar la participación de dicha proteína en el complejo. La sonda de ADN se marca radiactivamente para permitir la visualización del resultado mediante una autorradiografía. Además, la incubación con un exceso molar de sonda sin marcar (sonda fría) permite identificar por competición cual de las bandas obtenidas corresponde a la unión específica a dicha secuencia.

Las proteínas SREBP1c, Pro173Leu y Thr202Met así como SREBP1a silvestre, Pro197Leu y Thr226Met se sintetizaron *in vitro* utilizando 650 ng de los correspondientes vectores de expresión y un sistema de transcripción-traducción *in vitro* basado en lisado de reticulocitos de conejo (*TNT T7-coupled reticulocyte lysate system*; Promega, Madison, WI. EEUU). Las dos sondas utilizadas contenían los sitios SRE (5'-

GATCCTGATCACCCCACTGAGGAG-3') y "cajas E" (5'-TCAGCCCATGTGGCGTGGCCGC-3') del gen ácido graso sintasa (*FAS*). 10pmol de estas sondas fueron marcadas con  $^{32}\text{P}$   $\gamma\text{ATP}$  y T4 polinucleótido quinasa. Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados utilizando una columna de sephadex G25. Las reacciones de unión a ADN se realizaron en un volumen final de 20 $\mu\text{l}$  formado por 10 $\mu\text{l}$  de tampón de binding 2x (Hepes 40mM pH 8; EDTA 0,2mM; ClNa 0,1M; DTT 2mM; 10% glicerol; 10mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ) 1 $\mu\text{l}$  de polidIdC (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 1 $\mu\text{l}$  de sonda marcada (100.000cpm/ $\mu\text{l}$ ) y cantidades crecientes de las proteínas sintetizadas *in vitro* (2,4 y 6  $\mu\text{l}$ ) y se incubaron 30min a 4°C. Tras este tiempo se añadió a cada muestra 3,5 $\mu\text{l}$  de azul 5x (TBE 0,5x; glicerol 25%; *xilene cyanole* 0,1%; azul de bromofenol 0,1%) y se cargó en el gel, migrando a 30V. Para los ensayos de competición y de *supershift* se realizó una preincubación de 30min a 4°C con un exceso molar de 50x de la sonda fría y 5 $\mu\text{l}$  del anticuerpo monoclonal anti-SREBP1 (sc-17755; Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU). Los complejos ADN-proteína formados se sometieron a una migración en un gel de poliacrilamida al 6% utilizando tampón TBE 0,5x y fueron posteriormente cuantificados utilizando un sistema de análisis FLA5000 (Fuji Photo Film, Düsseldorf, Alemania).

## 4.2-11. Análisis proteico

### 4.2-11.1. Ensayos de Western-blot para los experimentos de actividad de SREBP1

Células Chang liver, derivadas de hígado humano, fueron sembradas en placas de 6 pocillos. 24 horas después se transfectaron con 4  $\mu\text{g}$  de los distintos vectores de expresión pcDNA-SREBP1 (silvestres o mutantes) o con el vector vacío pcDNA3, utilizando para ello Lipofectamina plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) durante 3h. Tras otras 6h o 9h, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis [50mM Hepes (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM dithiothreitol, 0,1mM ortovanadato, 10mM beta-glicerofosfato, 2,5mM EGTA y 10% glicerol, suplementado con otros inhibidores de proteasas (*Complete<sup>TM</sup> Mini-mixture*. Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)]. Posteriormente, las células fueron lisadas mediante tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño a 37°C, vorteando enérgicamente tras cada descongelación. Tras el último ciclo se centrifugó 10min a 13000rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido corresponde al extracto celular total. La

concentración de proteína en los lisados celulares se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA., EEUU). El análisis proteico se realizó mediante western blot utilizando anticuerpos anti-SREBP1 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA. EEUU). Como control interno se analizaron las mismas membranas utilizando un anticuerpo anti-actina (Sigma Chemica Co, St. Louis, MO. EEUU). Los niveles de proteínas fueron cuantificados en un sistema LAS3000 (Fuji Photo Film, Düsseldorf, Germany) utilizando los programas Image Reader e Image gauge v4.0 (Fuji Photo Film, Düsseldorf, Alemania). Las determinaciones se realizaron con diferentes tiempos de exposición para asegurar la linealidad de la intensidad de las distintas bandas.

#### **4.2-11.2. Electroforesis bidimensional de SREBP1c silvestre y Thr202Met**

Para una mejor visualización de la diferencia en la migración electroforética de las proteínas SREBP1 silvestre y mutada, se realizó una migración bidimensional utilizando 30µg de extracto total de células HEK293 infectadas con los adenovirus para sobreexpresar ambas proteínas. La primera dimensión se realizó con tiras Immobiline™ dry strip pH 3-10, 7cm mediante un protocolo de hidratación activa. Posteriormente las tiras se equilibraron y se lavaron dos veces. Tras esto se realizó la electroforesis en la segunda dimensión utilizando un gel de acrilamida 12% y se continuó el western-blot como se ha descrito anteriormente.

#### **4.2-11.3. Purificación de SREBP1c WT y Thr202Met por cromatografía de afinidad**

El estudio se realizó para estudiar modificaciones postraduccionales en las proteínas SREBP1c silvestre y Thr202Met en células HEK293 provenientes de riñón de embrión humano. Para ello se sobreexpresaron dichas proteínas infectando 10 placas de 10cm<sup>2</sup> de diámetro con células HEK293 a 80% de confluencia con los respectivos vectores de expresión adenovirales, así como con Ad-LacZ. 24 horas después de la infección se recogieron las células en PBS 1x y se centrifugaron 5 minutos a 2000rpm. El precipitado se resuspendió en 1600µl de tampón hipotónico [10mM Hepes pH 8; 10mM ClK; 150µM espermina; 750µM espermidina; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1mM DTT; 500µM PMSF; 40µg/ml aprotinina; 4µg/ml leupeptina; 5mM FNa; 10mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; inhibidores proteasas complete mini

(Roche)] y se incubó 15min en hielo volteando cada 2min. Posteriormente se añadió 50µl de nonidet 10% y se vorteoó enérgicamente durante 10seg, tras lo cual se centrifugó 30seg a 12000rpm a 4°C. El precipitado se resuspendió en 280µl de tampón de congelación [20mM Hepes pH 8; 400mM ClNa; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 20% glicerol; 1mM DTT; 500µM PMSF; 40µg/ml aprotinina; 4µg/ml leupeptina; 5mM FNa; 10mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; inhibidores proteasas complete mini (Roche)] y se vorteoó enérgicamente 30 min a 4°C. Tras este paso se centrifugó 5min a 13000rpm 4°C. El sobrenadante es el extracto nuclear en el que se valoró la concentración de proteínas por el método de Bradford.

100µg del anticuerpo monoclonal anti-SREBP1 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, EEUU) se acoplaron a 300µl de matriz *NHS-activated sepharose<sup>TM</sup> 4 fast flow* (Amersham) durante 3horas a temperatura ambiente en una solución de acoplamiento (200mM NaHCO<sub>3</sub>; 500mM NaCl pH 8,3). Tras este paso se realizó el bloqueo de la columna incubando durante 3 horas con solución de bloqueo (500mM Tris; 500mM NaCl pH 8). Tras esto se realizaron tres lavados alternando solución de bloqueo con solución de lavado (100mM acetato; 500mM NaCl pH 4), seguido de un lavado con 5ml de PBS 1x frío.

Esta resina ya acoplada con el anticuerpo se incubó durante 16 horas a 4°C en un volumen final de 1ml (ajustado con PBS 1x) con 2mg de extracto nuclear de células HEK293 infectadas con los adenovirus Ad-SREBP1c WT, Thr202Met o LacZ.

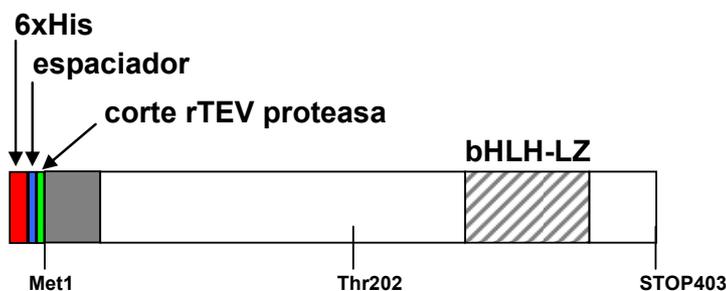
Tras la incubación se empaquetó en una columna, recogiendo el eluyente como “no retenido”. Tras esto se lavó con 15 volúmenes de PBS 1x. Posteriormente se realizó la elución con 100mM citrato sódico pH 3,5, recogiendo 5 fracciones de 300µl sobre 30µl de tampón 1M TRIS pH 9,5.

#### **4.2-11.4. Degradación con cicloheximida**

Los estudios de degradación se realizaron tanto en células HEK293 en las que se sobreexpresaron las proteínas SREBP1c WT o Thr202Met mediante infección con adenovirus, como en células Chang liver en las que sobreexpresaron ambas proteínas mediante transfección, como se ha descrito anteriormente. 24 horas después de la infección o transfección se añadió 100µM cicloheximida (Sigma Chemica Co, St. Louis, MO, EEUU) y se congelaron las placas correspondientes a los distintos tiempos de incubación. La obtención de los extractos celulares y el análisis mediante western-blot se realizaron como se ha descrito anteriormente.

#### 4.2-11.5. Expresión y purificación de SREBP1 humano en células procariotas

La región activa de las proteínas silvestre y Thr202Met de las isoformas SREBP1a y SREBP1c se subclonó en los sitios *NcoI* y *NotI* del vector pPRO EXHTa (Invitrogen), a partir de las construcciones pcDNA-SREBP1 descritas anteriormente (**figura 13**). De esta forma las construcciones pPROEXHT-SREBP1 expresarán las formas maduras de la proteína en las que en su región N-terminal se ha fusionado una repetición de seis histidinas seguida de la secuencia de corte para la proteasa TEV. Esta etiqueta facilita su purificación mediante columnas de afinidad cargadas con níquel, y puede ser eliminada post-purificación utilizando la proteasa TEV. Tras obtener estas construcciones en bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$ , los plásmidos se aislaron mediante “minipreps” y se transformaron por electroporación en la cepa BL21-RIL de *E.coli* (Stratagene) que contiene copias extra de los ARN de transferencia de bajo uso en esta bacteria. En las proteínas de origen humano muchos de estos codones aparecen en mayor proporción que en las proteínas de *E.coli* y su falta produciría paradas en la traducción que conllevarían la liberación del ribosoma y la producción de proteínas truncadas.



**Figura 13:** Esquema de las construcciones pPROEXHT-SREBP1. Estos vectores expresan las isoformas SREBP1a y 1c, silvestres o mutadas, en pauta con una repetición de seis residuos de histidina y separadas por un “brazo” espaciador y el lugar de corte de la rTEV proteasa.

Para la expresión de la proteína se creció en agitación durante 16 horas a 37°C un precultivo de 150ml de medio LB con 100mg/l de ampicilina y 33mg/l de cloranfenicol a partir de una colonia de bacterias BL21-RIL

transformadas con la construcción correspondiente. Posteriormente 15ml de este precultivo se inocularon en 1 litro de medio LB fresco suplementado con los antibióticos, y se dejó crecer a 37°C hasta llegar a una densidad óptica (O.D) de 0,4-0,6 (aproximadamente 1,5-2 h). Las células fueron transferidas a un agitador a 15°C y se dejaron atemperar durante 30min, transcurridos los cuales se indujo la expresión de la proteína con 1mM IPTG y se prosiguió la expresión a 15°C durante 16h. Posteriormente se recogieron las células mediante centrifugación a 4000rpm durante 30 min a 4°C.

El precipitado se resuspendió en 100ml de tampón de sonicación [50mM Tris-HCl pH 8; 1mM PMSF y un comprimido de inhibidores de proteasas *complete mini* (Roche)]. Tras la resuspensión se sonicó la muestra en un baño de hielo mediante 15 pulsos de 15seg efectuando una pausa de 45 seg entre cada pulso. Los restos celulares y las células intactas se precipitaron por centrifugación (30min a 10000g) a 4°C, quedando la proteína SREBP1 soluble en el sobrenadante.

La proteína se purificó mediante fraccionamiento con sulfato amónico seguido de cromatografía de afinidad e intercambio iónico. Inicialmente la proteína se llevó a 15% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se incubó 30min a 4°C en agitación y se centrifugó 30min a 12500 rpm (~12000g) a 4°C. La proteína precipitada a un 15% de saturación de sulfato amónico, se resuspendió en 25ml de tampón A (50mM Tris-HCl pH 8; 250mM NaCl y 1mM PMSF) y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna HisTrap chelating HP (Amersham) y un gradiente de 0-300mM Imidazol en tampón A en 20 volúmenes de columna. Una alícuota de las fracciones obtenidas se visualizó mediante SDS\_PAGE y tinción de coomasie. Las fracciones enriquecidas en la proteína fueron dializadas frente a 25mM tampón fosfato sódico pH 6,5 durante 18h a 4°C. Esta muestra fue posteriormente purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna Hi-Trap SP (Amersham. Uppsala. Suecia) y un gradiente de 50 a 450mM NaCl en 25mM fosfato sódico pH 5,5. Como en la cromatografía anterior todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y tinción de coomasie. Las fracciones con mayor pureza fueron concentradas conjuntamente utilizando concentradores centrífugos de tamaño de poro 30 kDa (Amicon. Millipore) que además permiten el cambio de tampón para evitar la alta concentración de sales. La muestra se conservó a -80 °C.

#### 4.2-12. Real-time PCR cuantitativa

El ARN total fue aislado a partir de células Chang liver previamente transfectadas con los vectores de expresión o de cultivo primario de hepatocitos de rata infectados con los vectores adenovirales, utilizando el reactivo Tripure (Roche Diagnostics, Manheim, Alemania). La transcripción reversa se realizó a partir 1 µg de ARN total utilizando *random* hexámeros y expand reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Manheim, Germany). El ADNc obtenido se utilizó como molde para real-time PCR en un sistema de detección GeneAmp 5700 (Applied Biosystems Foster City, Ca. EEUU.). La cantidad relativa de ARNm se calculó utilizando el método de comparación de la segunda derivada de Ct. Un ADNc control (correspondiente a la muestra no inducida) se utilizó como un calibrador entre placas y la variabilidad en las cantidades iniciales de ADNc fue normalizada utilizando GAPDH como control endógeno. Las condiciones de PCR fueron una desnaturalización inicial de 10min seguida de cuarenta ciclos consistentes en 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Los oligonucleótidos y sondas taqman utilizadas para el análisis fueron obtenidas de *Applied Biosystems*<sup>®</sup> y aseguran una eficiencia comparable en las reacciones de todos los genes (*Assays-on-demand gene expression product*; Applied Biosystems Foster City, CA. EEUU).

Para estudiar la inducción de la expresión de la glucoquinasa en cultivo primario de hepatocitos de rata, se realizó una PCR a tiempo real utilizando SYBR Green I Master Mix y oligonucleótidos específicos diseñados mediante el programa Primer Express (Applied Biosystems Foster City, CA. EEUU). Los oligonucleótidos utilizados fueron: GK-directo, 5'-CCGTTTCGTGTCACAAGTGG -3'; GK-reverso, 5'-AATGTCGCAGTCGGTGACAG-3'; GAPDH-directo, 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'; GAPDH-reverso, 5'-CTGAGTGGCAGTGATGGCAT-3'.

#### 4.2-13. Inmunomicroscopía confocal.

Células Chang liver se crecieron a confluencia en portaobjetos multipocillo para cultivo celular (BD Biosciences MA. EEUU) (0,69cm<sup>2</sup>/pocillo). Las células se transfectaron con 400ng de los plásmidos de expresión pcDNA-SREBP1a silvestre (WT) o Thr226Met y pcDNA-SREBP1c silvestre (WT) o Thr202Met utilizando 1µl por pocillo de lipofectamina plus (Invitrogen,

Carlsbad, CA. EEUU), siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Ocho horas después de la transfección las células se lavaron tres veces con PBS 1x y se fijaron con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente; tras 15min, se lavaron dos veces con PBS 1x y posteriormente se fijaron 20min con metanol 100% (previamente atemperado a -20°C). Tras esto se lavaron dos veces con PBS 1x (5min) y se realizó el bloqueo incubando durante 1 hora a temperatura ambiente con medio de bloqueo (0,5% leche desnatada, 10% FBS, 0,5% BSA, 0,1% tritón en PBS 1x). Tras este bloqueo se incubó en un recipiente hermético y humedecido durante 16h a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal SREBP1 (sc-17755; Santa Cruz Biotechnology, CA. EEUU) diluido 1:50 en solución de bloqueo.

Tras esta incubación se lavó cinco veces con PBS 1x (5 min), y se incubó 50 min con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a fluoresceína y diluido 1:200 en solución de bloqueo. Tras esto se realizaron cinco lavados con PBS 1x y se realizó la tinción de ADN para la visualización de los núcleos celulares incubando en oscuridad durante 10min con TO-PRO-3 (Molecular probes) diluido 1:1000 en PBS 1x, lavando posteriormente dos veces con PBS 1x. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Leica TCS SP2 Spectral y un objetivo 40x/1.25 NA oil (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

#### **4.2-14. Clonación de las regiones 5' y 3'UTR del gen *SREBF1***

Para el estudio de las variantes -60G>A y -38G>A presentes en el promotor y en la región 5'UTR respectivamente de la isoforma -1c del gen *SREBF1*, clonamos la región proximal de dicho promotor en el vector pGEMTEasy (Promega). Las variantes fueron generadas mediante mutagénesis dirigida a partir de la secuencia silvestre utilizando los oligonucleótidos 38G>A (directo- CGGGGAGGGGTAGGGCCAACGACCTGGACGCCCAAGGGC y reverso- GCCCTTGGGGCGTCCAGGTCGTTGGCCCTACCCCTCCCCG), 60G>A (directo- CTTGACAGGTGAAGTCGGCACGGGGAGGGGTAGGGCCAAC y reverso- GTTGGCCCTACCCCTCCCCGTGCCGACTTCACCTGTCAAG) y el protocolo descrito previamente.

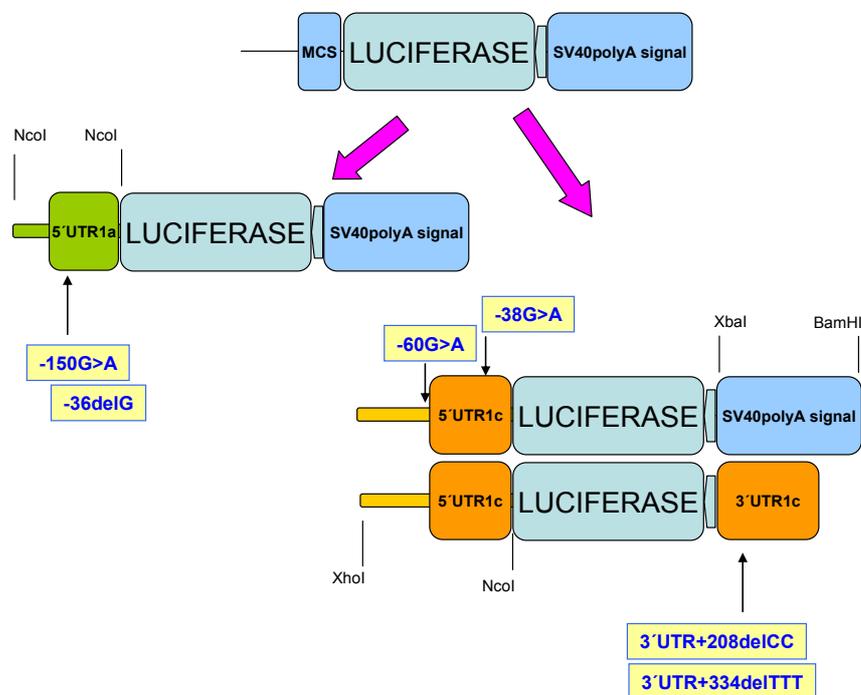
Posteriormente el fragmento de 312bp desde el ATG, incluyendo la región 5'UTR y comprendido entre sitios *XhoI/NcoI* fue clonado en estos mismos sitios del vector pGL3basic (Promega, Madison, WI. EEUU) dirigiendo la

expresión del gen de la luciferasa. Los vectores generados se denominaron 5'UTR WT, -60G>A, -38G>A y doble mutante (-60G>A y -38G>A) (**figura 14**).

Las construcciones para el estudio de las variantes en la región 3'UTR SREBP1c se realizaron a partir del vector 5'UTR WT, sustituyendo la región 3'UTR del gen de la luciferasa y la señal de poliadenilación del SV40 presentes en el vector pGL3basic por las del gen *SREBF1*. Para ello se amplificaron las regiones 3'UTR por PCR a partir de pacientes WT y mutados para las variantes 3'UTR+delCC y 3'UTR+334delTTT con los oligonucleótidos directo (TTCTAGAGACTTCCAGGACCTGTTGTG) y reverso (GGATCCCTGTTTCTAAAAGATG) que incluyen sitios de corte para los enzimas *XbaI* y *BamHI* respectivamente, y se clonaron en el vector pGEMTeasy (Promega, Madison, WI. EEUU). Dichas regiones se subclonaron posteriormente en los sitios *XbaI* y *BamHI* del vector 5'UTR WT. Los vectores obtenidos se denominaron 3'UTR WT, 3'UTR del CC y 3'UTR del TTT (**figura 14**).

Las construcciones 5'UTR-1a para estudiar el efecto sobre la actividad de las variantes -150G>A y -36delG presentes en la región 5'UTR de esta isoforma, se generaron amplificando 895pb del promotor (respecto al ATG) con los oligonucleótidos directo (TGGGTACTGGCTTCCTCCTTCA) y reverso (GGAGACAAAGGCCAGGGAGA) de la isoforma SREBP1a y la región 5'UTR1a utilizando como molde ADN de pacientes heterocigotos para cada una de las variantes. Los fragmentos resultantes se clonaron en el vector pGEMTeasy (Promega, Madison, WI. EEUU) y fueron posteriormente subclonadas en el sitio *NcoI* del vector pGL3basic (Promega, Madison, WI. EEUU) dirigiendo la expresión del gen de la luciferasa.

Todas las construcciones obtenidas fueron confirmadas por secuenciación.



**Figura 14: Representación esquemática de las construcciones obtenidas para estudiar el efecto de las variantes en las regiones UTR del gen *SREBF1*.** Las regiones promotoras y 5'UTR silvestres (WT) y con distintos polimorfismos, de las isoformas 1a y 1c se clonaron en pauta con el gen de la luciferasa en el vector pGL3 basic (Promega). Además, en el caso de la construcción 5'UTR1c WT se realizó una posterior sustitución de la señal de poliadenilación del vector por la región 3'UTR de la isoforma SREBP1c WT o con distintas mutaciones.

#### 4.2-15. Ensayo luciferasa de las construcciones 5' y 3'UTR

Células de hepatoma humano HepG2 se crecieron en medio DMEM 25mM glucosa suplementadas con 10% FBS, 100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml estreptomycin y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Las transfecciones se realizaron 24 horas después de sembrar las células, con una confluencia del 70%, utilizando el reactivo lipofectamina plus (Invitrogen, Carlsbad, CA. EEUU) con 750ng de las construcciones pGL3-SREBP1 (silvestre (WT) o con las distintas variantes) y 40ng de un vector de expresión de *Renilla* luciferasa carente de promotor (pRL-0). Estos experimentos se realizaron tanto en condiciones basales

incubando las células tras la transfección con DMEM 25mM glucosa suplementadas con 37 $\mu$ M BSA como añadiendo dosis crecientes de TO901317, un agonista de los receptores nucleares LXR (250; 100; 10 o 1 nM) o ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado (150; 75; 37,5; 15; 7,5 o 1,5  $\mu$ M) previamente incubado con BSA (concentración final=37 $\mu$ M). Las distintas actividades se cuantificaron 24h después de la transfección en un luminómetro Wallac 1420 VICTOR utilizando el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las unidades relativas de luz se determinaron normalizando la señal de la *Firefly* luciferasa respecto a la actividad de *Renilla* luciferasa, cotransfectada en la misma muestra. Finalmente esos valores relativos fueron normalizados respecto a una blanco (muestra transfectada con el vector vacío). Cada construcción fue transfectada por triplicado. Los experimentos se realizaron tres veces.

#### **4.2-16. Análisis estadístico**

Los resultados presentados en el estudio de mutaciones en SREBP1 corresponden a la media $\pm$ SEM de tres-cuatro experimentos. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student (colas=2). Un valor de *P* menor de 0,05 fue considerado significativo.

### **4.3- ESTUDIO INSIG2**

#### **4.3-1. Análisis de variantes INSIG2**

Utilizando el software Multalin version 5.4.1 para análisis de secuencias se halló en el cromosoma 2q14.1 humano una región de elevada homología con el primer exón de la isoforma INSIG2a de ratón, situada en el cromosoma 1E2, a una distancia de 4733pb en la región 5' del gen *INSIG2* ya descrito en dicho cromosoma.

Los promotores de ambas isoformas se analizaron mediante el programa Matinspector

([http://www.genomatix.de/online\\_help/help\\_matinspector/matinspector\\_help.html](http://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html)) y TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) lo que permitió definir los sitios reguladores de dichos promotores. Basándonos en los marcadores presentes en las bases de datos, seleccionamos aquellos que tenían una frecuencia

igual o mayor al 10% y que se encontraban próximos a alguno de estos sitios reguladores. Paralelamente utilizando la base de datos del proyecto Hap Map II (release no. 21; <http://www.hapmap.org/>) se realizó un estudio del desequilibrio de ligamiento teórico entre las variantes presentes en esta región.

#### **4.3-2. Construcciones promotor INSIG2-Luciferasa**

Para los estudios de actividad se generaron construcciones con el promotor de INSIG2 humano silvestre o con las distintas variantes controlando la expresión del gen de la luciferasa. Los insertos se amplificaron mediante PCR a partir de ADN genómico de individuos heterocigotos utilizando el oligonucleótido directo 5'-GCCTGGCACACAGAAAGTG-3' y reverso 5'-GCCGGGAGACCCCAAC-3'. En aquellos casos en los que no conseguimos clonar alguno de los haplotipos, estos se obtuvieron por mutagénesis dirigida. Los fragmentos se clonaron en el sitio *SacI* del vector pGL3-Basic (Promega). La integridad de cada construcción fue verificada mediante secuenciación conforme a la secuencia descrita en la base de datos Ensembl human (Ensembl Gene ID ENSG00000125629).

#### **4.3-3. Cultivos celulares y ensayos luciferasa**

Las células de insulinoma de rata INS1 y de hepatoma humano HepG2 se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con 50  $\mu$ M de  $\beta$ -Mercaptoetanol, 10mM hepes, 1mM piruvato y 5% FBS o DMEM 25mM glucosa suplementadas con 10% FBS respectivamente. En ambos casos se añadió 100 U/ml penicilina, y 100  $\mu$ g/ml estreptomycin y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Las transfecciones se realizaron 24 horas después de sembrar las células, con una confluencia del 70%, utilizando el reactivo lipofectamina plus (Invitrogen, Carlsbad, CA. EEUU) con 750ng de las construcciones pGL3-INSIG2 (silvestres o mutadas) y 40ng de un vector que expresaba el gen *Renilla* luciferasa carente de promotor (pRL-0). Las distintas actividades se cuantificaron 24h después de la transfección en un luminómetro Wallac 1420 VICTOR utilizando el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las unidades relativas de luz se determinaron cuantificando la señal de la *Firefly* luciferasa y se normalizaron respecto a la actividad de *Renilla* luciferasa cotransfectada en la misma muestra. Finalmente esos valores relativos fueron normalizados

respecto a un blanco (muestra transfectada con el vector vacío). Cada construcción fue transfectada en triplicado. Los experimentos se realizaron tres veces. Los valores representados corresponden a la media $\pm$ SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba “t” de student. Se consideró significativo un valor  $p < 0,05$ .

#### 4.3-4. Genotipado de pacientes y controles

El genotipado de estas variantes se realizó mediante la técnica de minisequenciación o SnapShot como se ha descrito para los SNP del gen *SREBF1*. Los oligonucleótidos utilizados se recogen en la **tabla 6**.

OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE <i>INSIG2</i>		
SNP	OLIGO DIRECTO	OLIGO REVERSO
rs17587254	CCCAAAGTGCTATGCCACTAAA	AGCCAGAGAATGCAAACCAA
rs7589375	GCCTGGCACACAGAAAGTG	AAAGGGGAATACCTGGAGACC
rs4849676	GCCAGGTGCTCAGGTGATAG	CCCCACACACTACAGACCATTC
rs11123469	AACGCCACTGAAAGACCAC	AGCACCAGTTCCAAGTTCC
rs10185316	GCTCGGTTGGAGTAGACATGAAC	TCTGTAGCTTTCAAATTTCACTCCTG
rs4848492	CAGCTACTGGGGAGGCTGAG	GCCATCAATGCAAAGCAAG
OLIGONUCLEÓTIDOS PARA MINISECUENCIACIÓN		
rs17587254	5' tataatatATCAAATAATTTAAGTCAGTATGAGGGGTAC 3'	
rs7589375	5' GAGACCATGCGTGAGCTGAAG 3'	
rs4849676	5' taataTTTTTGTACGGTGTTTTGATGTGAA 3'	
rs11123469	5' atatatatatatatataCCTTGTACTGCAGTAGGAGTAACTGCA 3'	
rs10185316	5' atatatatatatatatatatAGTAAGAAAGATCTGGCCAATTATACA 3'	
rs4848492	5' aaCAGAATAGGGAAGCAACTCCTCCT 3'	

**Tabla 6:** Oligonucleótidos utilizados en la PCR multiplex y en la minisequenciación para el genotipado de los polimorfismos del gen *INSIG2*.

#### 4.3-5. Estudio de asociación del gen *INSIG2* con DM2

Los resultados del genotipado y la construcción de haplotipos se realizaron con los programas SNPstat, Pypop win32.0.6.0 y Haploview, como se ha descrito para el gen *SREBF1*. El cálculo del poder estadístico del estudio genético se realizó utilizando el programa *Genetic power calculator* (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html>)<sup>351</sup>. El estudio de asociación de las variantes encontradas con los parámetros bioquímicos y

antropométricos de la población estudiada se realizó mediante un modelo lineal univariante utilizando el programa SPSS 11.5.



## **5.RESULTADOS**



## 5.1- GENOTECAS

Como paso previo para poder iniciar este estudio fue necesaria la obtención de una genoteca de pacientes con DM2, así como de controles no diabéticos. El ADN genómico se obtuvo a partir de muestras de sangre completa, tal y como se describe en el capítulo “Material y métodos”.

En el estudio se incluyeron (i) diabéticos tipo 2 de edad inferior a 79 años y glucemia en ayuno  $\geq 7,0$ mM (126mg/dl); (ii) individuos con obesidad mórbida ( $IMC > 40$ Kg/m<sup>2</sup>); (iii) pacientes diagnosticados como “Síndrome metabólico” según el criterio del NCEP:ATP III (National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III)<sup>345</sup> basado en la manifestación de tres o más de estas características: elevación en la glucemia basal ( $GB \geq 110$ mg/dl); hipertensión arterial ( $HTA \geq 130/85$ mmHg); niveles altos de triglicéridos ( $TG \geq 150$ mg/dl); disminución en el colesterol-HDL (HDL-c  $< 40$ mg/dl en hombres y  $< 50$ mg/dl en mujeres); obesidad central valorada en función del perímetro de la cintura ( $\geq 102$ cm en hombres y en mujeres  $\geq 88$ cm); (iv) controles no diabéticos no insulino-resistentes y (v) muestras de población general valenciana de las que no pudimos disponer del resultado de su determinaciones bioquímicas. Los parámetros bioquímicos y antropométricos disponibles en cada grupo se recogen en la **tabla 7**.

	DM2	S. M	OBESOS	CONTROLES	POBL.GEN
Sexo (H/M)	162/133	29/3	13/43	115/53	117/103
Edad (años)	57,1 ± 10,7	45,1 ± 8,7	42,6 ± 10	59,9 ± 9,6	39,6 ± 12,6
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	30,13 ± 4,9	30,8 ± 4,7	47,9 ± 7,8	28,3 ± 3,7	-
Cintura/cadera	0,95 ± 0,07	0,96 ± 0,04	0,94 ± 0,09	0,95 ± 0,08	-
Glucosa (mg/dl)	170,9 ± 59,3	110,6 ± 29,5	101,4 ± 24,6	97,4 ± 19,8	-
Insulina (µg/ml)	14,2 ± 10,1	14,3 ± 5,7	12,9 ± 7,5	10,5 ± 6,2	-
IR HOMA	5,7 ± 4,8	4,0 ± 2,0	3,1 ± 1,9	2,6 ± 1,7	-
PAS (mmHg)	146,9 ± 20,3	140,2 ± 15,2	132 ± 17,0	125,2 ± 15,2	122,8 ± 14,3
PAD(mmHg)	84,3 ± 10,6	88,9 ± 7,7	77,6 ± 13,2	73,5 ± 8,4	73,8 ± 9,2
TG (mg/dl)	153,4 ± 105,6	142 ± 64	160,8 ± 86,7	108,8 ± 55,8	-
Ct (mg/dl)	213,5 ± 44,3	193 ± 36	193,3 ± 44,8	197,6 ± 33,8	-
HDL-c (mg/dl)	47,2 ± 13,9	39,8 ± 9,0	42,5 ± 10,7	52,5 ± 13,2	-
LDL-c (mg/dl)	135,2 ± 37,7	125 ± 33	122,1 ± 40,8	123,5 ± 30,4	-
VLDL-c (mg/dl)	33,6 ± 28,7	28,5 ± 12,9	32,5 ± 17,5	-	-
Apo B (mg/dl)	115,6 ± 27,5	104,0 ± 20,7	105,5 ± 21,6	107,1 ± 22,4	-
Apo A (mg/dl)	138,1 ± 29,6	138,7 ± 22,5	128,7 ± 19,2	149,8 ± 26,7	-
HbA1c (g/dl)	6,9 ± 1,8	-	-	-	-

**Tabla 7: Parámetros bioquímicos y antropométricos de los pacientes y controles.** Pacientes con diabetes tipo 2 (DM2), síndrome metabólico (SM), obesos, controles sanos y muestras de población general valenciana (POBL.GEN) utilizadas en nuestro estudio. Los datos se muestran como promedio ± desviación estándar

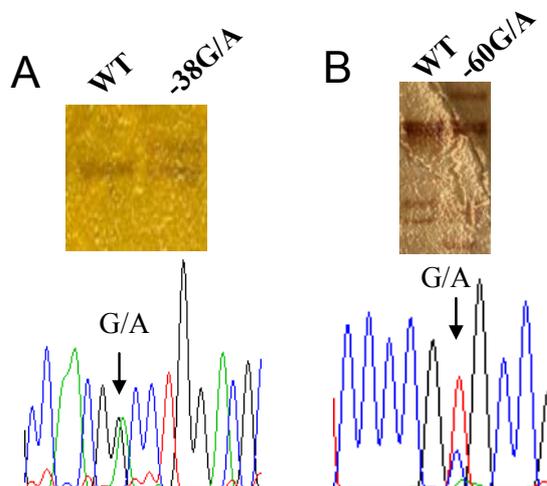
## **5.2- ESTUDIO DEL GEN *SREBF1***

### **5.2-1. Rastreo molecular del gen *SREBF1***

La búsqueda de nuevas mutaciones en el gen *SREBF1* se realizó en 60 pacientes con DM2 mediante amplificación por PCR de las regiones codificantes, regiones de unión intrón-exón y región promotora. Los productos se analizaron posteriormente mediante la técnica SSCP como se describe en el apartado 4.2-2 del capítulo “material y métodos”. Las muestras con patrones de migración electroforética alterados fueron posteriormente secuenciadas, lo cual permitió la identificación de distintas variantes en el gen *SREBF1*.

#### **5.2-1.1. Variantes identificadas en el primer exón y el promotor de la isoforma SREBP1c.**

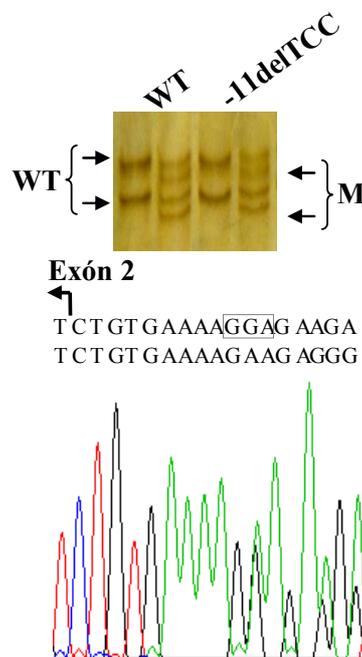
El rastreo mediante SSCP del primer exón y la región proximal del promotor permitió identificar la variante -60G>A situada en el promotor de la isoforma SREBP1c en la posición -6 respecto al lugar de inicio de la transcripción y en la posición -60 respecto al inicio de la traducción. Por otro lado se identificó la variante 5'UTR-38G>A situada en la región 5'UTR en la posición +17 respecto al lugar de inicio de la transcripción (-38 respecto al lugar de inicio de la traducción). La **figura 15** muestra el patrón de migración obtenido y la posición de las variantes en el electroferograma de un individuo heterocigoto.



**Figura 15:** Patrón de migración electroforética y electroferograma de un paciente heterocigoto para la (A) variante -38G>A en la región 5'UTR y (B) para la variante -60G>A en el promotor de la isoforma SREBP1c (secuencia antisentido).

### 5.2-1.2. Variante identificada en el primer intrón

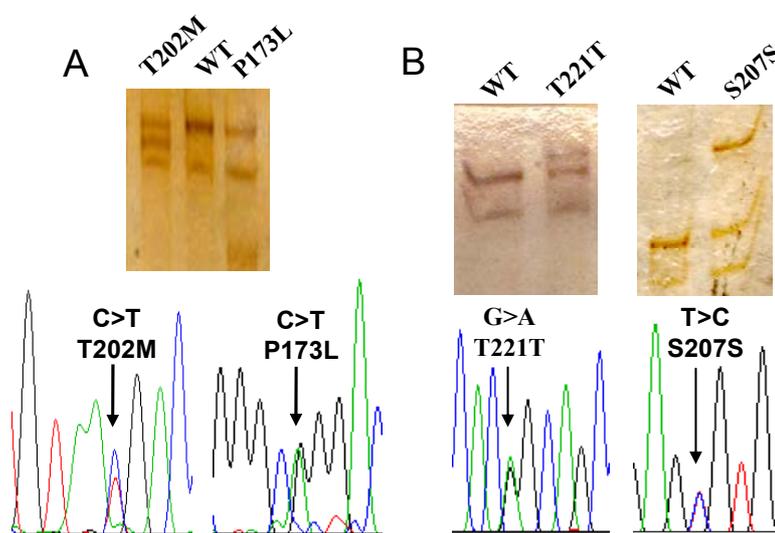
La técnica SSCP permitió identificar la delección de tres nucleótidos (TCC) en la posición -11 respecto al lugar de inicio del exón 2 (IVS1-11delTCC). La **figura 16** muestra claramente la migración electroforética diferencial de cada una de las cadenas simples de ADN. El electroferograma de la secuenciación de la cadena reversa muestra la superposición de las señales del alelo silvestre y delecionado en un individuo heterocigoto.



**Figura 16:** Patrón de migración electroforética de un paciente heterocigoto para la delección IVS1 –11delTCC, localizada en la región de unión intrón-exón2. El electroferograma muestra en la secuencia “antisentido” el desplazamiento en la secuencia provocado por la delección.

### 5.2-1.3. Variantes identificadas en el exón 3

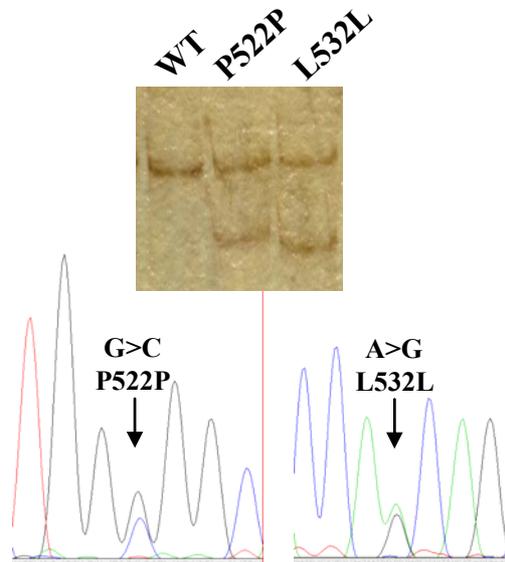
El exón 3 es común a las isoformas SREBP1a y SREBP1c. En esta región se identificaron dos mutaciones Pro173Leu y Thr202Met, y dos variantes que no suponían un cambio de aminoácido Thr221Thr y Ser207Ser, en la secuencia de SREBP1c (**figura 17**) y que en la isoforma SREBP1a corresponden a Pro197Leu, Thr226Met, Thr245Thr y Ser231Ser respectivamente.



**Figura 17: Patrón de migración electroforética de pacientes heterocigotos para las variantes encontradas en el exón 3. (A) Variantes que suponían un cambio en la secuencia de aminoácidos. El electroferograma muestra la secuencia antisentido (B) Variantes que no suponen un cambio de aminoácido.**

#### 5.2-1.4. Variantes identificadas en el exón 9

En el exón 9 se identificaron dos variantes que no suponían un cambio en la secuencia aminoacídica: Pro522Pro y Leu532Leu respecto a la isoforma SREBP1c y Pro546Pro y Leu556Leu respecto a la isoforma SREBP1a (figura 18).

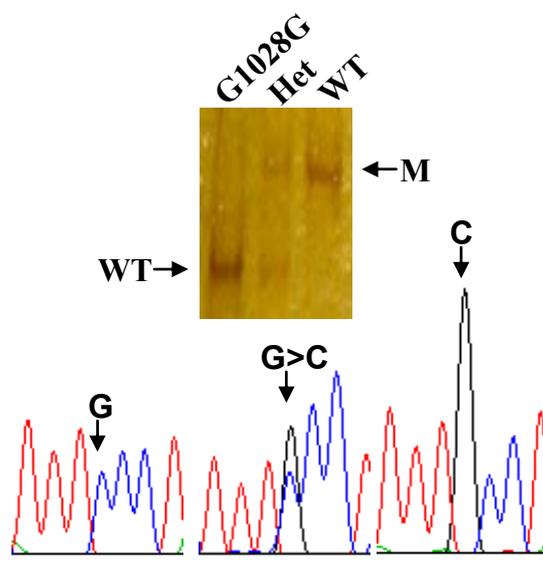


**Figura 18:** Patrón de migración electroforética de pacientes heterocigotos para los polimorfismos encontrados en el exón 9

#### 5.2-1.5. Variante encontrada en el exón 18c

Las isoformas SREBP1a y 1c humanas también difieren en sus dos últimos exones por la utilización de un procesamiento alternativo. Aunque se desconoce su importancia, este hecho sugiere que estas regiones pueden estar implicadas en la regulación diferencial de ambas proteínas.

En el exón 18 de la isoforma SREBP1c se identificó una variante que no suponía un cambio de aminoácido (Gly1028Gly). La alta frecuencia de este polimorfismo permitió identificar individuos homocigotos silvestres, homocigotos mutados y heterocigotos (**figura 19**).

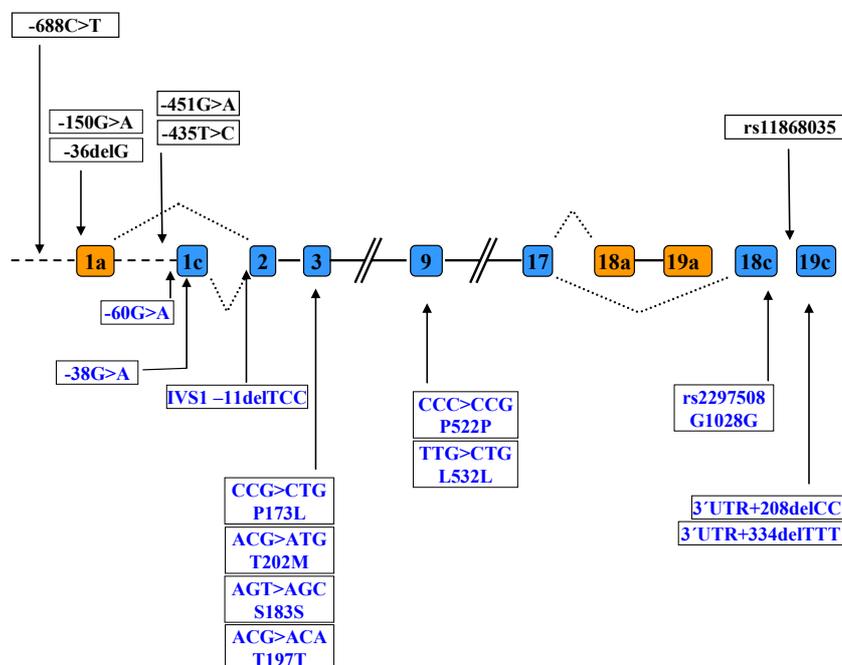


**Figura 19:** Patrón de migración electroforética de pacientes homo, heterocigotos y WT para el polimorfismo encontrado en el exón 18c. El electroferograma mostrado corresponde a la secuencia antisentido.

#### 5.2-1.6. Variantes identificadas en la región 3'UTR del gen *SREBF1*.

Como se describe en el capítulo material y métodos, la región 3'UTR no presenta patrón de migración electroforética definido en los ensayos SSCP debido a que se trata de una región altamente polimórfica. Por este motivo se clonaron distintos productos de PCR en el vector pGEMT-Easy (Promega) y se secuenciaron en ambos sentidos, lo cual permitió identificar las variantes 3'UTR+208delCC y 3'UTR+334delTTT en la región 3'UTR de la isoforma SREBP1c (**figura 20**).





**Figura 21: Representación esquemática del gen *SREBF1* y de la localización de las variantes identificadas por SSCP (azul).** De ellas, las variantes Pro173Leu (exón 3), Pro522Pro y Leu323Leu (exón9), rs2297508 y 3'UTR+208delCC así como las variantes representadas en negro fueron descritas por otros grupos durante el desarrollo de este trabajo. Los exones específicos de la isoforma SREBP1a se representan en color naranja. Las regiones promotoras de la isoforma SREBP1a y 1c se representan por líneas discontinuas horizontales.

### **5.2-2. Estudio de asociación con DM2 de las variantes encontradas en el gen *SREBF1***

El estudio se inició con el rastreo preliminar de las variantes encontradas en un reducido número de pacientes diabéticos y de muestras de población general mediante SSCP. Algunas de estas variantes aparecían en muy baja frecuencia en la población de estudio por lo que aunque fueran potencialmente capaces de modificar la función o expresión de SREBP1 no fueron incluidas en el estudio de asociación (**tabla 8**).

SNP	HGVS	localización	DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS				ALELO DE MENOR FRECUENCIA		
			GENOTIPO	CASO	CONTROL	HWE P valor*	CASO/CONTROL	OR (95% CI)	P valor
rs12945414 -451C>A	c.92-3466C>A	Promotor 1c	CC	261	152	n.d	Monomórfico	n.d	n.d
			-	0	0				
			-	0	0				
-60G>A <sup>†</sup>	c.92-3075G>A	Promotor 1c	GG	232	108	1	0 / 0,01	n.d	n.d
			GA	1	1				
			AA	0	0				
-38G>A <sup>†</sup>	c.92-3053G>A	5'UTR 1c	GG	232	108	1	0 / 0	n.d	n.d
			GA	1	0				
			AA	0	0				
p.Ser207Ser <sup>†</sup>	c.622T>C	Exón 3	TT	50	-	n.d	n.d	n.d	n.d
			TC	1	-				
			CC	-	-				
p.Thr221Thr <sup>†</sup>	c.663G>A	Exón 3	GG	50	-	n.d	n.d	n.d	n.d
			GA	1	-				
			AA	-	-				
p.Thr226Thr <sup>†</sup>	c.677C>T	Exón 3	CC	261	264	1	n.d	n.d	n.d
			CT	1	0				
			TT	0	0				
p.Pro546Pro	c.1638C>G	Exón 9	CC	110	46	0,94	0,01 / 0,01	0,80 (0,08-7,79)	n.d
			CG	3	1				
			GG	0	0				
p.Leu556Leu	c.1666T>C	Exón 9	TT	112	45	0,94	0,01 / 0,01	1,24 (0,11-13,84)	n.d
			TC	2	1				
			CC	0	0				

**Tabla 8: Variantes encontradas en el gen *SREBF1* que no fueron incluidas en el estudio de asociación.** La columna SNP indica la nomenclatura utilizada en el texto. La columna HGVS indica la nomenclatura recomendada por la Sociedad de variaciones del genoma humano. <sup>†</sup>Variantes no descritas previamente. n.d: No determinado.

Por el contrario, los polimorfismos y deleciones que en el rastreo preliminar por SSCP presentaban una frecuencia mayor o similar al 5% fueron genotipados en todas las muestras disponibles de pacientes con DM2 y de controles no diabéticos mediante minisequenciación o análisis de fragmentos. Las frecuencias de los genotipos de cada una de estas variantes así como el resultado del análisis de su distribución entre casos y controles se recogen en la **tabla 9**.

El análisis previo del poder estadístico del estudio indica que con el número de muestras analizadas es posible detectar para un valor de  $P=0,05$  y con un 80% de potencia variantes que presenten una frecuencia próxima al 5% y que estén asociadas con un odds ratio igual o superior a 2,7, asumiendo un modelo dominante.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SNPstat ajustando las muestras en función de la edad, sexo e IMC.

SNP	HGVS	localización	FRECUENCIA GENOTIPO			ALELO DE MENOR FRECUENCIA			
			GENOTIPO	CASO	CONTROL	HWE P valor*	CASO/CONTROL	OR (95% CI)	P valor
rs13306736	c.-150A>G	5'UTR 1a	AA	28,2	33,3	0,5	0,43 / 0,43	1,32 (0,78-2,23)	0,31 <sup>b</sup>
			AG	52,4	46,9				
			GG	19,4	19,8				
-36delG UTR1a	c.-36delG	5'UTR 1a	delGdelG	29,8	33,9	0,61	0,41 / 0,42	1,04 (0,62-1,76)	0,88 <sup>b</sup>
			delGwt	57,1	49,1				
			wtw	13,2	17				
IVS1-11delTCC <sup>†</sup>	c.92-10_-12delTCC	Intrón 1	wtw	87,8	94,5	1	0,06 / 0,04	<b>2,72 (1,06-7,00)</b>	<b>0,026<sup>b</sup></b>
			wTDEL	11,7	5,5				
			DELDEL	0,5	0				
			CC	96,2	97,3				
p.Pro173Leu	c.590C>T	Exón 3	CT	3,8	2,7	1	0,02 / 0,01	1,43(0,54-3,83)	0,47
			TT	0	0				
			CC	31,7	35,8				
rs2297508 P.Gly1028Gly	c.*619C>G	Exón 18c	CG	47	49,5	0,72	0,41 / 0,39	1,12 (0,65-1,92)	0,69 <sup>b</sup>
			GG	21,3	14,7				
			CC	51	45,4				
rs11868035 IVS18c -3C>T	c.*835C>T	Intrón 18c	CT	42,7	46,2	0,57	0,28 / 0,3	0,72 (0,44-1,17)	0,18 <sup>b</sup>
			TT	6,2	8,4				
			wtw	50,2	45,6				
3'UTR + 238 del CC	c.*1075_1076delCC	3'UTR 1c	wtdel	35,7	43,9	1	0,3 / 0,33	0,75 (0,46-1,23)	0,25 <sup>b</sup>
			deldel	14,1	10,5				
			wtw	38,6	40,5				
3'UTR + 364 del TTT <sup>†</sup>	c.*1201_1203delTTT	3'UTR 1c	wtdel	48,2	42,3	0,37	0,36 / 0,38	0,89 (0,54-1,48)	0,65 <sup>b</sup>
			deldel	13,2	17,1				
			wtw	38,6	40,5				

**Tabla 9: Variantes seleccionadas para el estudio de asociación. Frecuencias de los genotipos y alelos para las SNPs y deleciones encontradas en *SREBF1*.** La columna SNP indica la nomenclatura utilizada en el texto. La columna HGVS indica la nomenclatura recomendada por la Sociedad de variaciones del genoma humano. \*Valores de *P* para el equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control. <sup>a</sup>Modelo codominante. <sup>b</sup>Modelo dominante. <sup>†</sup>Variantes no identificadas previamente. Los valores de *P* significativos en el estudio de asociación se muestran en negrita.

El estudio demostró que la variante IVS1 -11delTCC se asociaba con un aumento en el riesgo de DM2 en la población estudiada. Los valores obtenidos utilizando el modelo dominante fueron [OR=2,72 (CI 95% = 1,06-7,0; *P*= 0,029)] (**tabla 9**). Al ajustar las muestras sólo por IMC se obtenían resultados similares [OR=2,59 (CI 95% = 1,02-6,61; *P*= 0,032)]. La asociación no era significativa si no se ajustaban las muestras al menos por IMC [OR=1,53 (CI 95% = 0,75-3,13; *P*= 0,23)]. Por tanto esta deleción está asociada con un aumento significativo del riesgo de DM2.

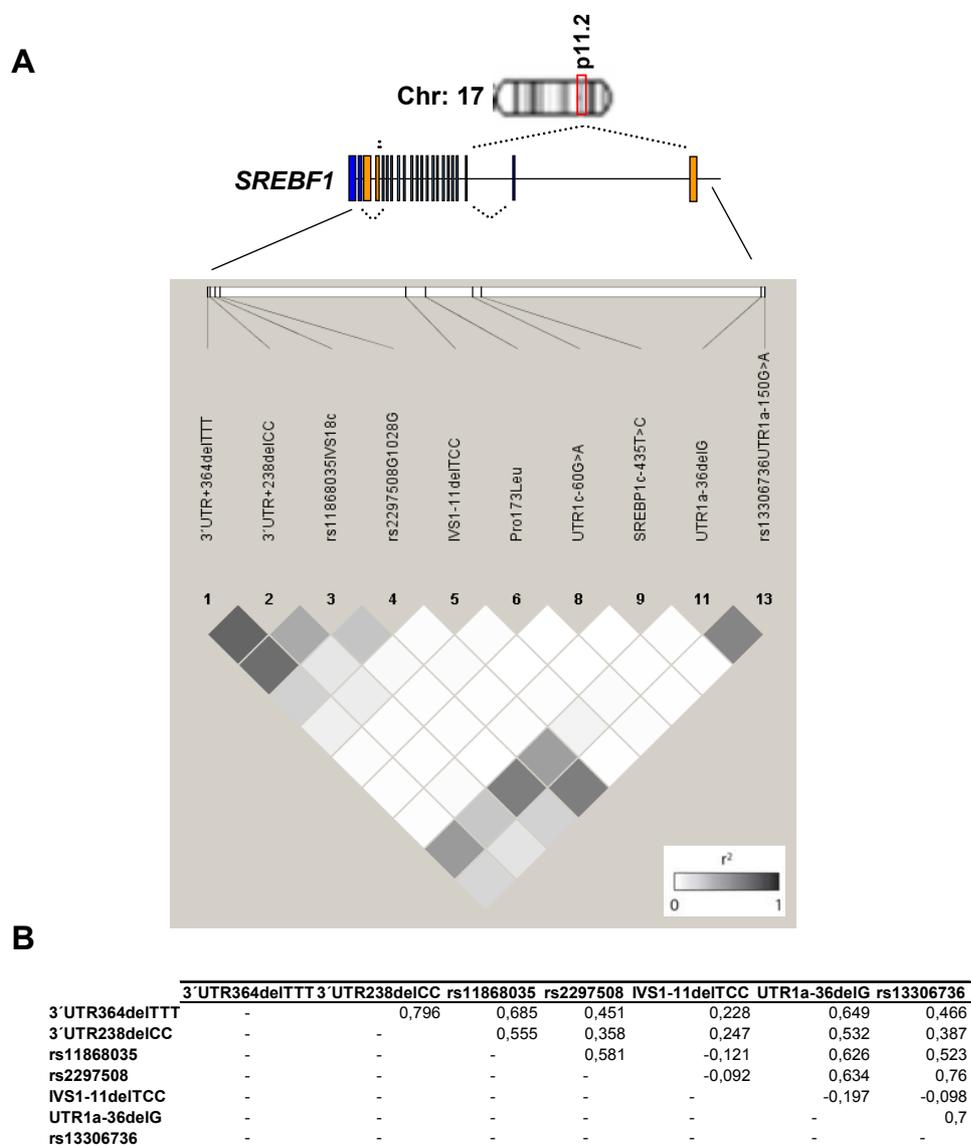
El estudio estadístico de la relación de esta deleción con los parámetros bioquímicos y antropométricos de los pacientes genotipados se recoge en la **tabla 10**, mostrando una asociación cercana a la significación con los niveles de VLDL.

	IVSDEL TCC		
	wt/wt	wt/delTCC	P valor
Glucosa en ayuno (mg/dl)	122,8±48,9	145,8±61,9	0,13
Insulina (µg/ml)	11,7±7,7	13,4±7,8	0,57
IR HOMA	5,4±4,8	6,2±4,1	0,60
PAS (mmHg)	134,4±20,2	137,5±18,6	0,69
PAD(mmHg)	78,6±11,3	80,2±7,7	0,43
Triglicéridos (mg/dl)	127,9±78,7	142,4±65,5	0,80
Colesterol total (mg/dl)	203,5±39,2	213,2±54,1	0,61
HDL-colesterol (mg/dl)	49,6±13,5	45,7±12,4	0,65
LDL-colesterol (mg/dl)	127,9±34,2	128,8±33,8	1,00
VLDL-colesterol (mg/dl)	32,4±20,5	48,5±63,5	0,08
Apolipoproteína B (mg/dl)	109,9±24,4	113,7±19,5	0,81
Apolipoproteína A (mg/dl)	145,1±27,3	140,4±27,1	0,59
HbAc (g/dl)	6,8±1,7	7,2±2,2	0,67

Tabla 10: Asociación mediante análisis lineal univariante de la delección IVS1 – 11delTCC con parámetros bioquímicos y antropométricos de pacientes con DM2.

Algunos de los polimorfismos estudiados presentaban un elevado desequilibrio de ligamiento en la población por lo que se analizaron mediante los programas SNPstat y Haploview para la construcción de haplotipos. Los valores de desequilibrio de ligamiento (LD) calculados según el valor ( $r^2$ ) se representan en la **figura 22**.

Aunque individualmente sólo la delección IVS1 –11delTCC se asoció con la DM2, algunos haplotipos identificados podrían tener una influencia en el riesgo de desarrollar la enfermedad.



**Figura 22: Desequilibrio de ligamiento encontrado entre las variantes del gen *SREBF1*.** A.- Representación de las variantes estudiadas en el gen *SREBF1* mediante el programa Haploview. Los valores de desequilibrio de ligamiento se representan en los cuadrados, siendo más oscuros a mayor valor de  $r^2$ . B.- Valor de desequilibrio de ligamiento calculado como  $r^2$  mediante el programa SNPstat.

Los haplotipos con una frecuencia igual o mayor al 5% fueron considerados en el estudio. Cinco de ellos mostraron una asociación con el aumento o disminución del riesgo de DM2, tras ajustar las muestras por edad, sexo e IMC (**tabla 11**).

El haplotipo formado por los alelos G/C de las variantes rs2297508 y rs11868035 mostraba una diferente distribución entre pacientes (19%) y controles (12%), y se asociaba significativamente con un aumento en el riesgo de DM2 [odds ratio= 1,95 (CI 95% = 1,15-3,32;  $P=0,014$ )] comparado con el haplotipo C/C.

En nuestro estudio también se identificaron las variantes rs13306736, -36delG UTR1a y rs2297508. La distribución del haplotipo (A/delG/G) en pacientes con DM2 y controles difería significativamente (5% y 1%, respectivamente), mostrando una importante asociación con DM2 respecto al haplotipo (A/delG/C) [odds ratio= 9,83 (CI 95% = 1,26-76,81;  $P=0,03$ )]. Hay que resaltar que este haplotipo se identificó con una frecuencia relativamente baja por lo que el intervalo de confianza calculado es muy amplio y posiblemente está influido por el escaso número de muestras analizadas.

El haplotipo formado por los alelos G/C de las variantes rs13306736 y rs11868035 apareció en un 21% de pacientes y en un 15% de controles, asociándose débilmente con un aumento en el riesgo de desarrollar DM2 respecto al haplotipo A/C [odds ratio= 1,68 (CI 95% = 1,02-2,76;  $P=0,04$ )].

A su vez, el haplotipo formado por los alelos T/WT de las variantes rs11868035 y 3'UTR+334delTTT se asoció con una disminución en el riesgo de desarrollar DM2 respecto al haplotipo C/WT [odds ratio= 0,22 (CI 95% = 0,07-0,71;  $P=0,012$ )].

Por último, el haplotipo formado por las variantes 5'UTR1a-36delG y el alelo T de rs11868035 se asoció con una disminución en el riesgo de desarrollar DM2 respecto al haplotipo delG/C [odds ratio= 0,12 (CI 95% = 0,03-0,54;  $P=0,006$ )].

HAPLOTIPOS	rs13306736	-36delG UTR1a	rs2297508	rs11868035	3'UTR+238delCC	3'UTR+364delTTT	CASO / CONTROL	OR (95% CI)	P valor
	-	-	C	C	-	-	-	0,53 / 0,58	1
-	-	G	T	-	-	-	0,22 / 0,29	0,81(0,53-1,23)	0,32
-	-	G	C	-	-	-	0,19 / 0,12	1,95(1,15-3,32)	<b>0,014</b>
-	-	C	T	-	-	-	0,06 / 0,01	1,97(0,51-7,57)	0,33
-	-	-	-	WT	WT	-	0,61 / 0,61	1	-
-	-	-	-	DEL	DEL	-	0,28 / 0,32	0,85(0,59-1,23)	0,39
-	-	-	-	WT	DEL	-	0,08 / 0,07	0,91(0,45-1,85)	0,8
A	DEL	C	-	-	-	-	0,45 / 0,49	1	-
G	WT	G	-	-	-	-	0,29 / 0,32	1,02(0,68-1,55)	0,91
G	DEL	G	-	-	-	-	0,05 / 0,07	0,89(0,40-1,95)	0,76
G	WT	C	-	-	-	-	0,04 / 0,04	1,38(0,49-3,86)	0,54
A	DEL	G	-	-	-	-	0,05 / 0,01	9,83(1,26-76,81)	<b>0,03</b>
A	WT	C	-	-	-	-	0,05 / 0,05	0,53(0,20-1,43)	0,21
A	-	-	C	-	-	-	0,51 / 0,54	1	-
G	-	-	T	-	-	-	0,22 / 0,29	0,79(0,52-1,21)	0,28
G	-	-	C	-	-	-	0,21 / 0,15	1,68(1,02-2,76)	<b>0,04</b>
A	-	-	T	-	-	-	0,06 / 0,01	2,82(0,73-10,86)	0,13
-	-	-	C	-	WT	-	0,62 / 0,55	1	-
-	-	-	T	-	DEL	-	0,26 / 0,24	0,81(0,53-1,24)	0,33
-	-	-	C	-	DEL	-	0,1 / 0,14	0,71(0,41-1,23)	0,22
-	-	-	T	-	WT	-	0,01 / 0,06	0,22(0,07-0,71)	<b>0,012</b>
A	DEL	-	-	-	-	-	0,50 / 0,50	1	-
G	WT	-	-	-	-	-	0,34 / 0,36	0,94(0,64-1,39)	0,76
G	DEL	-	-	-	-	-	0,09 / 0,08	1,09(0,60-1,98)	0,79
A	WT	-	-	-	-	-	0,07 / 0,05	0,79(0,34-1,84)	0,58
-	DEL	-	C	-	-	-	0,58 / 0,51	1	-
-	WT	-	T	-	-	-	0,27 / 0,23	0,85(0,55-1,31)	0,46
-	WT	-	C	-	-	-	0,14 / 0,18	0,75(0,43-1,29)	0,3

Tabla 11: Estructura de los haplotipos mayoritarios encontrados en el gen *SREBF1*. Los valores *P* significativos se muestran en negrita.

### 5.2-3. Análisis funcional de las variantes identificadas en *SREBF1*

El estudio se centró en el análisis funcional de las variantes que *a priori* podían tener una mayor repercusión sobre la actividad de la proteína o sobre su expresión. Concretamente, en los polimorfismos que provocaban un cambio de aminoácido en la proteína, los que podían modificar las

secuencias de unión intrón-exón, o los que se localizaban en las regiones reguladoras UTR.

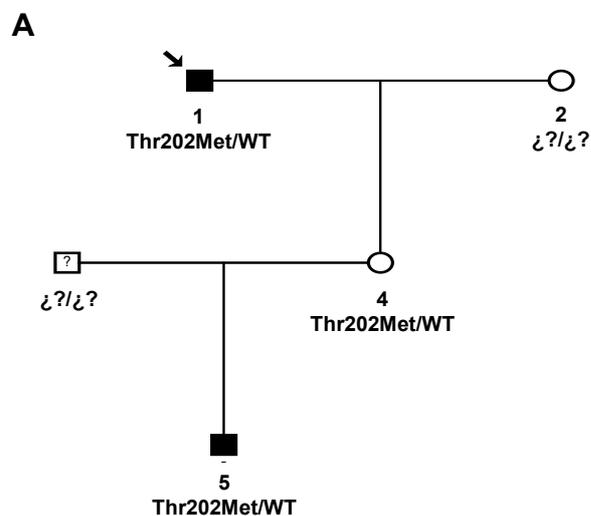
### 5.2-3.1. Estudio de las mutaciones encontradas en la proteína

En el rastreo del gen *SREBF1* se identificaron las mutaciones Pro173Leu y Thr202Met (respecto a la isoforma1c o Pro197Leu y Thr226Met respecto a la isoforma 1a) localizadas en el exón 3 de la proteína (**tabla 8; figura 21**).

Ambas mutaciones están localizadas en la región activa de la proteína, concretamente en una región poco conocida situada entre el dominio rico en prolina/serina y los dominios de unión a ADN y dimerización (bHLH-LZ), clasificada como “de baja complejidad”. Estas regiones son con frecuencia mosaicos de un pequeño número de aminoácidos funcionalmente importantes en algunas proteínas.

El estudio de asociación de la variante Pro197Leu mostró que este polimorfismo era poco frecuente (2% en pacientes y 1% en controles) y que no había diferencia en su distribución entre el grupo de pacientes y controles ( $\chi^2 = 0,51$ ;  $P = 0,47$ ).

La variante Thr226Met fue identificada en heterocigosis en un único paciente. El probando (individuo 1) era un varón de 48 años con DM2 (glucemia basal=142mg/dl), hipertensión arterial (175/90 mmHg), obesidad (IMC=30,3 Kg/m<sup>2</sup>) e hipercolesterolemia (colesterol total 250mg/dl). También presentaba una relación colesterol total / colesterol-HDL elevada (250/45=5,55), lo que se acepta como un marcador de elevado riesgo de enfermedad cardiovascular<sup>353</sup>. Pudimos analizar a otros miembros de la familia, concretamente a la hija del probando (individuo 4) y a su nieto (individuo 5), también heterocigotos para la mutación (**figura 23A**). El nieto del probando era un niño de 5 años normoglucémico pero que presentaba una elevación de los niveles de LDL-colesterol sobre el percentil 95, unos niveles de triglicéridos por debajo del percentil 5 y un ratio colesterol total / colesterol-HDL moderadamente elevado (192mg/dL/46mg/dL=4,17). La hija del probando tenía 22 años y salvo una disminución en los niveles de triglicéridos (26mg/dl) por debajo del percentil 5, no presentaba alteraciones en ninguno de los otros parámetros bioquímicos determinados (glucemia basal=89mg/dl; Colesterol total= 192mg/dl; colesterol-HDL=46mg/dl; colesterol-LDL=141mg/dl; insulina basal=3µg/ml) ni en el índice de masa corporal (IMC=21,4) (**figura 23B**).



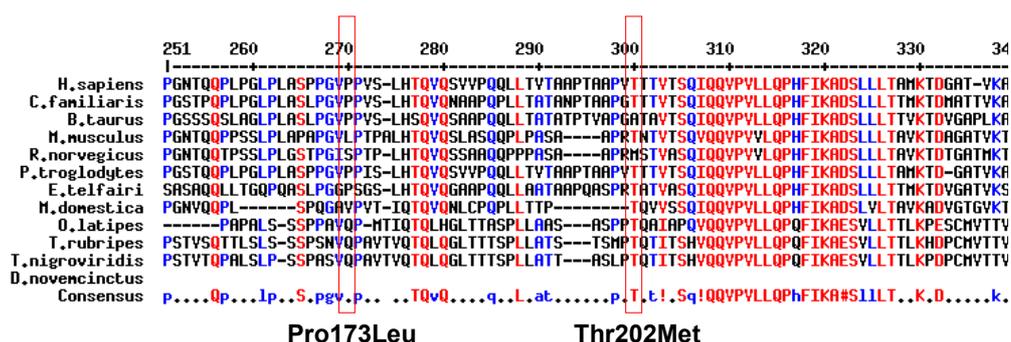
**B**

	INDIVIDUO		
	1	4	5
Sexo (H/M)	H	M	H
Edad (años)	48	22	5
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	30,3	21,4	19
Cintura/cadera	1	-	-
Glucosa en ayuno (mg/dl)	142	89	89
Insulina ( $\mu\text{g/ml}$ )	6	6,8	3
PAS (mmHg)	175	-	-
PAD(mmHg)	90	-	-
Triglicéridos (mg/dl)	167	38	26
Colesterol total (mg/dl)	250	195	192
HDL-colesterol (mg/dl)	45	39	46
LDL-colesterol (mg/dl)	172	148	141
VLDL-colesterol (mg/dl)	33	8	5
Apolipoproteína B (mg/dl)	152	-	-
Apolipoproteína A (mg/dl)	112	-	-
HbA1c (g/dl)	6,4	-	-

**Figura 23: Características de la familia en la que se identificó la variante Thr202Met.**  
 A.- Árbol genealógico de la familia B.- Parámetros bioquímicos y antropométricos determinados en los portadores de la variante Thr202Met

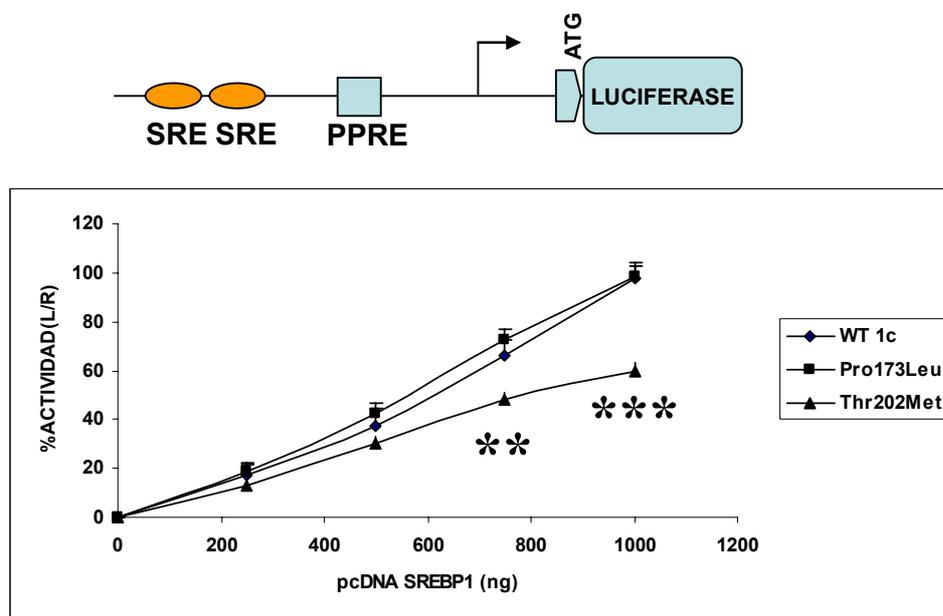
Ante la imposibilidad de estudiar a otros miembros de esta familia decidimos realizar un estudio funcional más profundo de dichas mutaciones. Como primera aproximación se realizó una comparación mediante alineamientos múltiples de la secuencia de SREBP1 humana con proteínas ortólogas en distintas especies con el fin de evaluar el grado de conservación de los aminoácidos Pro173 y Thr202.

El estudio demostró que a diferencia del residuo Pro173 que no estaba conservado, el residuo Thr202 se conservaba en SREBP1 en más de un 70% de especies en las que se estudió este factor (**figura 24**). Este hecho sugiere que el residuo Thr202 podría tener una importancia funcional y que esta mutación podría ser patogénica<sup>354</sup>.



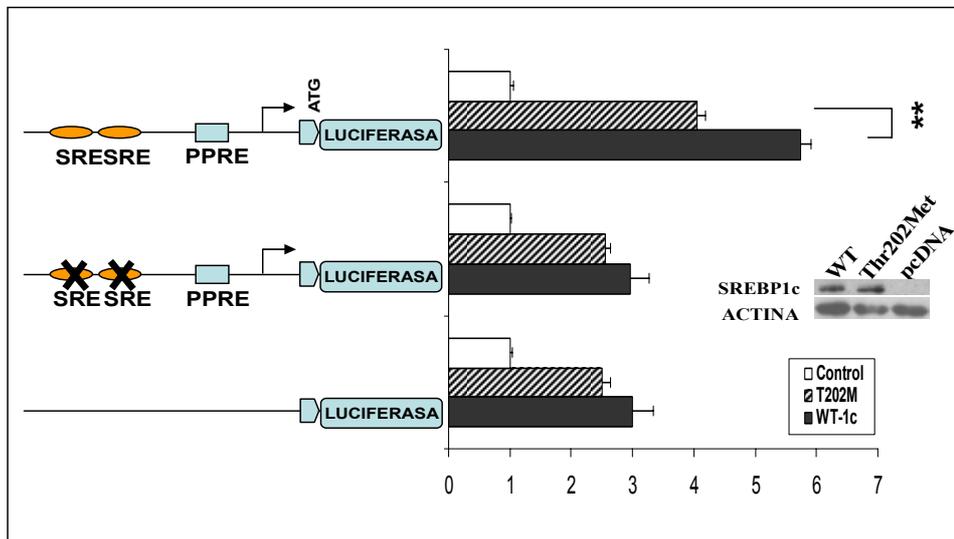
**Figura 24:** Alineamiento de la secuencia aminoacídica del factor SREBP1 humano con las proteínas ortólogas de distintas especies. A diferencia del residuo Pro173 el residuo Thr202 está ampliamente conservado.

Para estudiar si esta mutación tenía un efecto sobre la actividad de la proteína, realizamos la clonación de la región activa de las proteínas SREBP1a y 1c en vectores de expresión y llevamos a cabo la mutagénesis dirigida para reproducir las mutaciones en ambas isoformas (Pro197Leu y Thr226Met en la isoforma 1a y Pro173Leu y Thr202Met en la isoforma 1c). Se ha postulado que SREBP1c es el mediador de los efectos de la insulina sobre la expresión de muchos genes, entre ellos la glucoquinasa hepática<sup>181,263</sup>. Como aproximación preliminar se realizó un ensayo luciferasa sobreexpresando la proteína SREBP1c silvestre o con dichas mutaciones en células COS7, y utilizando como diana el promotor de la glucoquinasa hepática de rata. En el ensayo luciferasa, la proteína SREBP1c Thr202Met presentaba una menor actividad comparada con la proteína silvestre o la proteína con la mutación Pro173Leu (**figura 25**).



**Figura 25:** Actividad de cantidades crecientes del vector de expresión pcDNA-SREBP1c silvestre (WT) o con las variantes Pro173Leu y Thr202Met sobre el promotor de la glucoquinasa de rata (pRGKL-1448) en un ensayo luciferasa en células COS7. Los resultados se muestran como inducción respecto al vector pcDNA vacío y asignando el 100% a la proteína silvestre. \*\*  $p < 0.02$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

La construcción reportera utilizada estaba realizada sobre el vector pGL3-basic. Se ha descrito que este vector contiene una “caja E” críptica en su MCS a la que puede unirse SREBP1<sup>355</sup>. Por otro lado, la sobreexpresión de cualquier factor de transcripción en este tipo de ensayos puede provocar una activación inespecífica del gen reportero. Para confirmar que la actividad cuantificada era específica se utilizó en paralelo otra construcción en la que se eliminaron los dos sitios “SRE” presentes en dicho promotor, observándose una disminución en la actividad hasta niveles comparables a los obtenidos sin promotor. Por tanto la señal obtenida era específica y la mutación Thr202Met provocaba una pérdida de actividad respecto a la forma silvestre (WT), a pesar de existir niveles comparables de ambas proteínas (**figura 26**).

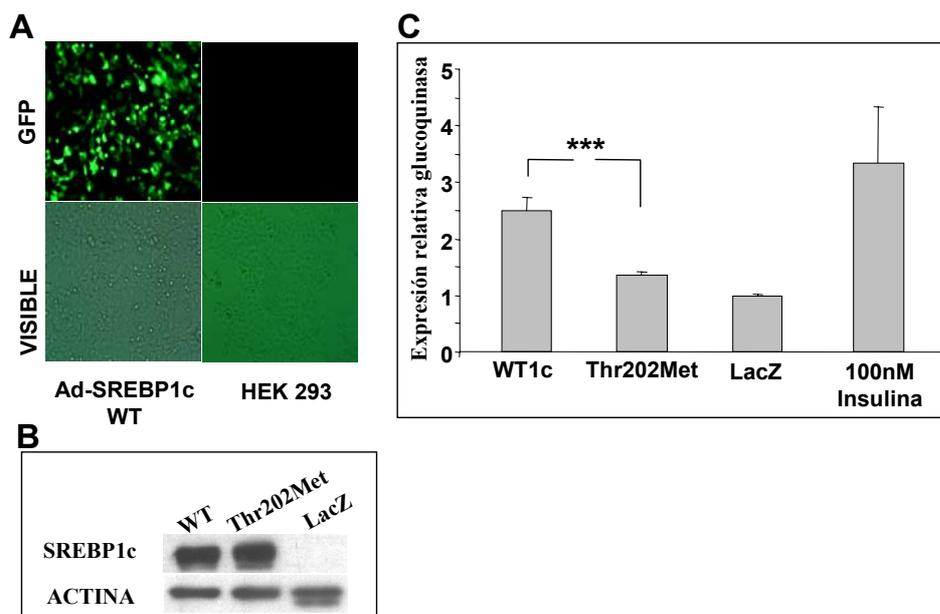


**Figura 26:** Transfección de células COS-7 con vectores de expresión para SREBP1c (WT o Thr202Met), un plásmido reportero, con la secuencia de la luciferasa bajo el control del promotor de la glucoquinasa silvestre o con los sitios “SRE” mutados (pRGKL-1448mab), y el vector pGFPN1 como control interno. La figura muestra la actividad luciferasa normalizada como inducción respecto a la actividad basal en ausencia de SREBP1, y representa el promedio de tres transfecciones independientes con dos determinaciones en cada una. (\*\* $p < 0,005$ ).

Para confirmar el resultado obtenido en el ensayo luciferasa se cuantificó directamente la inducción del mensajero de la glucoquinasa en respuesta a la sobreexpresión de SREBP1c. Para ello utilizamos como modelo el cultivo primario de hepatocitos rata ya que las líneas celulares de hepatoma no expresan glucoquinasa. Debido a la baja eficiencia de transfección de los hepatocitos primarios en cultivo, decidimos utilizar para la expresión de la proteína silvestre (WT) y Thr202Met, vectores adenovirales que se prepararon siguiendo el método descrito por He y colaboradores<sup>356</sup> tal y como se indica en el capítulo material y métodos.

En la **figura 27** se observa que los vectores adenovirales obtenidos eran infectivos y expresaban la proteína GFP lo cual permitía el seguimiento de la infección mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia (**figura 27A**). Los adenovirus SREBP1c WT o Thr202Met infectaban el cultivo primario de hepatocitos de rata y tras 18h sobreexpresaban cantidades comparables de ambas proteínas al determinarlas mediante western-blot (**figura 27B**). En este modelo la forma silvestre de la proteína

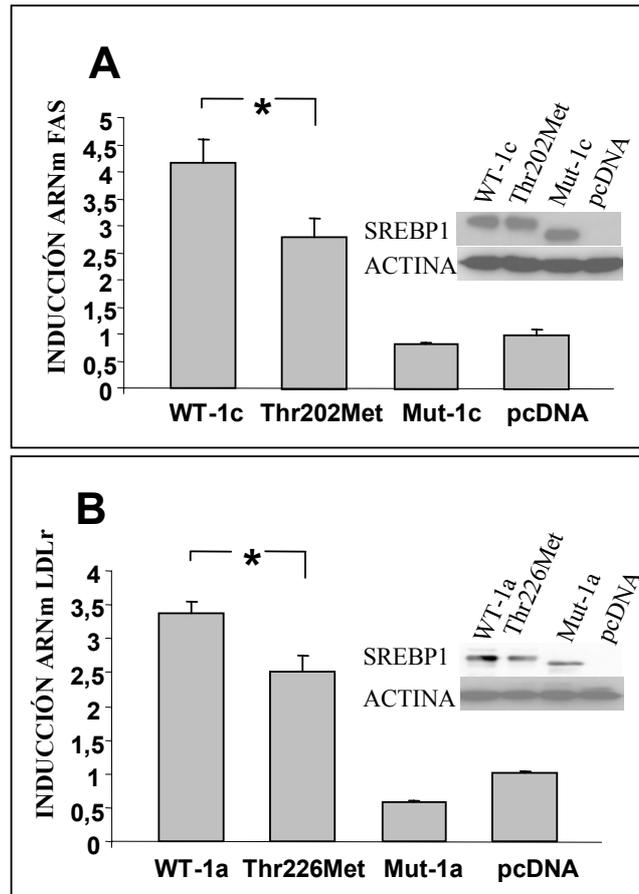
era capaz de inducir el mensajero de la glucoquinasa hepática de rata a niveles comparables a los de 100nM de insulina, mientras que la forma Thr202Met provocaba una inducción significativamente menor (**figura 27C**).



**Figura 27: Sobreexpresión de SREBP1c mediante vectores adenovirales.** (A) Los vectores generados eran infectivos y sobreexpresaban GFP permitiendo el seguimiento de la infección mediante microscopía confocal. (B) Los adenovirus infectaban hepatocitos de rata en cultivo primario, sobreexpresando cantidades comparables de la proteína WT y Thr202Met, siendo detectadas mediante western-blot. (C) En estas condiciones la proteína WT inducía el gen de la glucoquinasa de modo comparable al tratamiento con 100nM insulina, mientras que la forma mutada provocaba una inducción mucho menor. La figura muestra los resultados de la cuantificación del mensajero de la glucoquinasa normalizada con la de GAPDH mediante PCR cuantitativa y representada como media±SEM. (\*\*\*) $p<0,001$ .

Paralelamente, el efecto de esta mutación se estudió en células de origen humano. Se realizó una transfección transitoria en la línea celular Chang liver con los vectores de expresión de la isoforma 1a y 1c tanto silvestre como mutada, cuantificando la inducción de genes diana de cada una de las isoformas (**figura 28**). Concretamente, el receptor de lipoproteínas LDL (LDLr) o el gen ácido graso sintasa (FAS) respectivamente. Para demostrar

que la inducción no se debía a un efecto inespecífico debido a la sobreexpresión de un factor de transcripción, se transfectó en paralelo una construcción en la que habíamos deletado residuos claves en el dominio BHLH pero que tenía intacto el dominio de transactivación.

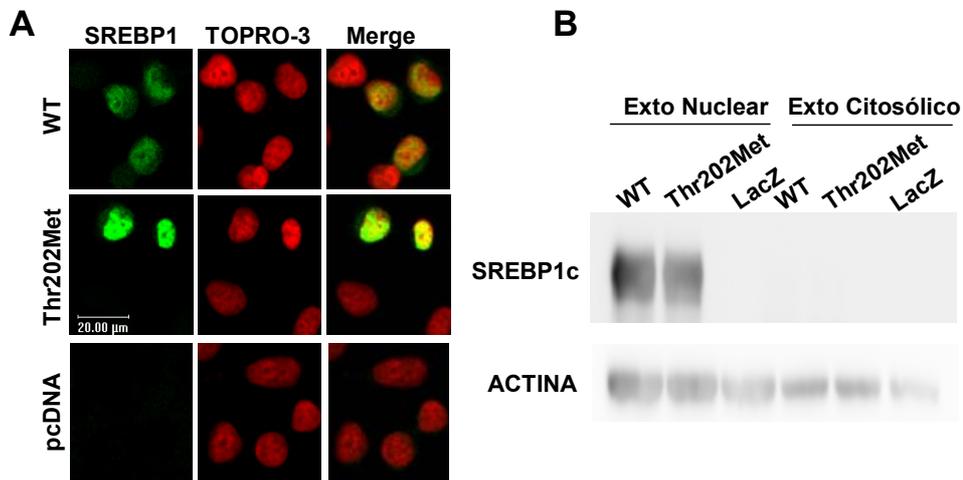


**Figura 28: Actividad de las isoformas SREBP1a y 1c silvestres y mutadas en la inducción de sus genes diana.** Células Chang liver se transfectaron con los vectores de pcDNA3-SREBP1a y -1c (WT, con las variantes Thr202Met y Thr226Met, o los controles negativos pcDNA3-SREBP Mut-1a o -1c) o con el vector vacío (pcDNA3). Seis o nueve horas postransfección se estudió la inducción de genes diana mediante PCR cuantitativa. (A) La inducción del gen ácido graso sintasa (FAS) se utilizó para valorar la actividad de SREBP1c y (B) el gen del receptor de LDL (LDLr) se utilizó para valorar la actividad de SREBP1a. Las gráficas muestran la inducción promedio de cuatro transfecciones independientes (media ± SEM). \* $p < 0,05$ . Paralelamente, se analizó el nivel de sobreexpresión de SREBP1 mediante western-blot utilizando la actina como control endógeno.

Como se observa en la **figura 28** la inducción en el mensajero de los genes diana era menor con las proteínas mutadas (Thr202Met y Tr226Met), y nula con los controles negativos (Mut-1c y Mut-1a).

Un experimento complementario fue la infección con los adenovirus purificados por gradientes de cloruro de cesio a través de la vena de la cola de ratones tratados con estreptozotocina, para sobreexpresar la forma silvestre y Thr202Met de SREBP1c directamente en el hígado. No obstante, el estudio por western-blot, PCR cuantitativa y cuantificación de la glucemia de dichos ratones indicó que la sobreexpresión no había sido suficientemente efectiva como para provocar un efecto. Este hecho probablemente fue debido a que la diálisis utilizada para eliminar el cloruro de cesio provocó una dilución excesiva de los adenovirus e impidió la infección con un título elevado de virus.

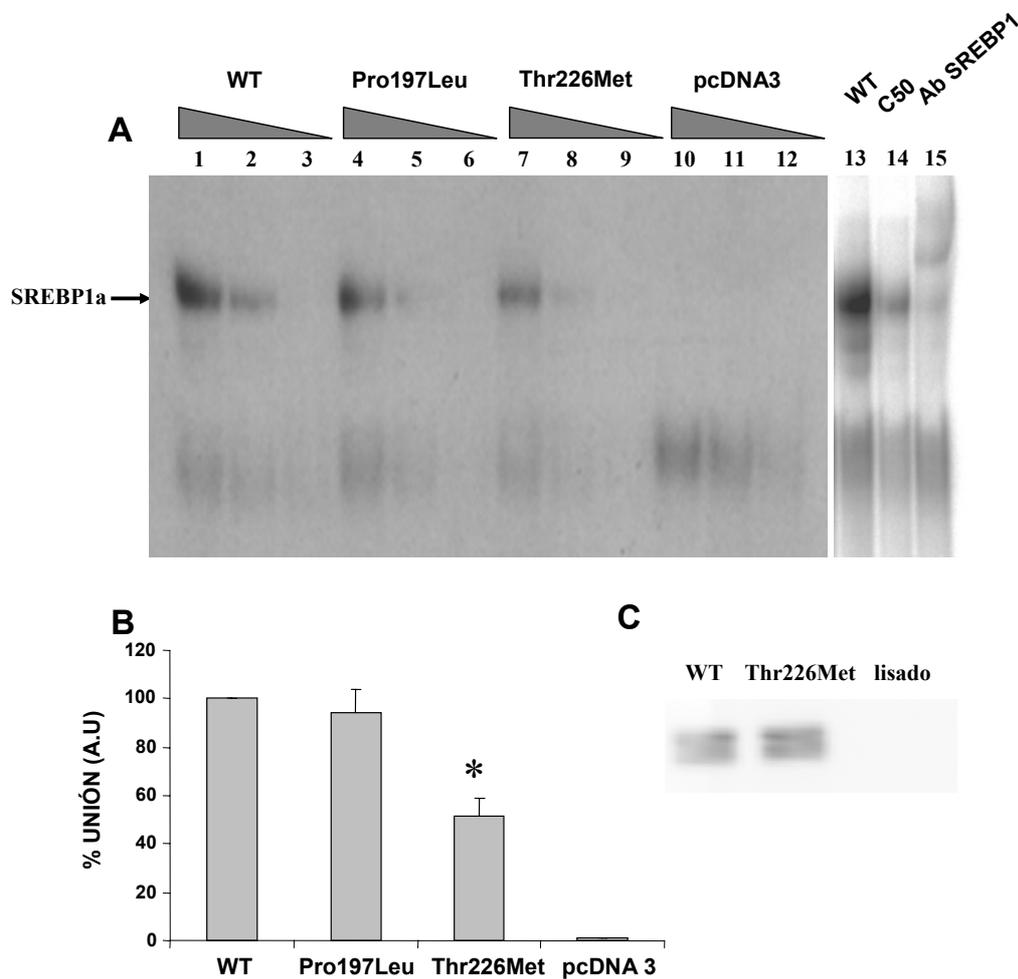
Para profundizar en el mecanismo causante de la pérdida de actividad, investigamos si la mutación ocasionaba una alteración en la localización nuclear de la forma madura de SREBP1. Para ello realizamos un análisis inmunocitoquímico de células transfectadas con la proteína silvestre y mutada, observándose que en ambos casos la proteína co-localizaba con la tinción realizada con TOPRO3, y que por tanto presentaba una localización nuclear (**figura 29A**). Este resultado se confirmó mediante western-blot de extractos nucleares obtenidos tras infectar células HEK293 con vectores adenovirales, para sobreexpresar la proteína SREBP1c silvestre y mutada (**figura 29B**).



**Figura 29: Localización subcelular de SREBP1.** (A) Análisis inmunocitoquímico de células Chang Liver transfectadas con la forma madura de SREBP1 (WT o Thr226Met), o con el vector pcDNA3 vacío. La imagen muestra la señal de SREBP1 (verde), tinción nuclear (rojo) o la combinación de ambas (*Merge*). Escala, 20  $\mu\text{m}$ . Amplificación original, 40 $\times$ . (B) Análisis mediante western-blot del extracto nuclear y citosólico de células HEK293 en las que se sobreexpresó la forma madura de SREBP1c WT y Thr202Met.

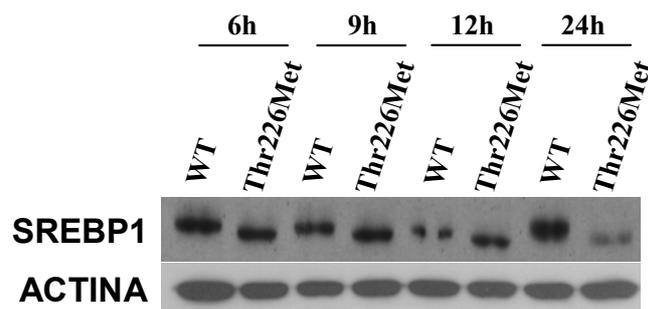
Una posible explicación de la pérdida de actividad ocasionada por la mutación Thr226Met podría ser la disminución en su unión a ADN. Para estudiarlo se realizó un ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA) utilizando sondas con elementos “SRE” o “cajas E” y las proteínas sintetizadas *in vitro* mediante un lisado de reticulocitos de conejo.

Como se observa en la **figura 30**, la cuantificación de las bandas obtenidas demostró que la unión a ADN de la proteína con la mutación Thr226Met era ligeramente inferior a la de la proteína WT a pesar de utilizar niveles comparables de ambas proteínas.



**Figura 30: Ensayo EMSA realizado con las proteínas SREBP1 WT, Pro197Leu y Thr226Met sintetizadas *in vitro* con un sistema de reticulocitos de conejo.** (A) Cantidades crecientes de las distintas proteínas se incubaron durante 30 min a 4°C con un fragmento de ADN marcado con  $^{32}\text{P}$  y que contenía el elemento de unión “SRE”. Como control negativo se utilizó la reacción de traducción *in vitro* realizada con el vector pcDNA vacío. La figura muestra un experimento representativo de tres ensayos independientes. (B) Cuantificación de las distintas bandas como porcentaje respecto a la intensidad de la proteína WT y presentada como media $\pm$ SEM. La comparación estadística entre grupos se realizó utilizando el valor t de Student. \* $p < 0,05$ . (C) El western-blot de las proteínas SREBP sintetizadas *in vitro* muestra que se utilizaron cantidades comparables de las proteínas.

En un análisis western-blot de las proteínas SREBP1 WT y Thr226Met sobreexpresadas en células Chang liver se observaba una distinta migración electroforética entre la forma silvestre y la mutada (**figura 31**).



**Figura 31: Migración electroforética de las proteínas SREBP1 WT y Thr226Met.** La imagen demuestra que la proteína mutada migra visiblemente más rápido y que tras 24h los niveles sobreexpresados de esta son menores que los de la proteína silvestre. La imagen mostrada es representativa de tres experimentos independientes.

Hasta la fecha se han descrito numerosas modificaciones postraduccionales en SREBP1 que regulan su actividad y su estabilidad pero ninguna de ellas afecta al residuo Thr226 (Thr202 de SREBP1c) o a residuos cercanos. Por ello se realizó una predicción informática de las posibles modificaciones postraduccionales que podrían afectar a este residuo mediante distintos programas y bases de datos. El estudio mostró que los residuos Thr226 y Thr227 podrían ser o-glucosilados y que la mutación Thr226Met impediría esta modificación. El programa NetPhosK 1.0 Server identificó débilmente el residuo Thr228 como una posible diana de fosforilación por PKC y la mutación Thr226Met reducía en un 25% la probabilidad asignada al residuo Thr228 como diana de esta quinasa.

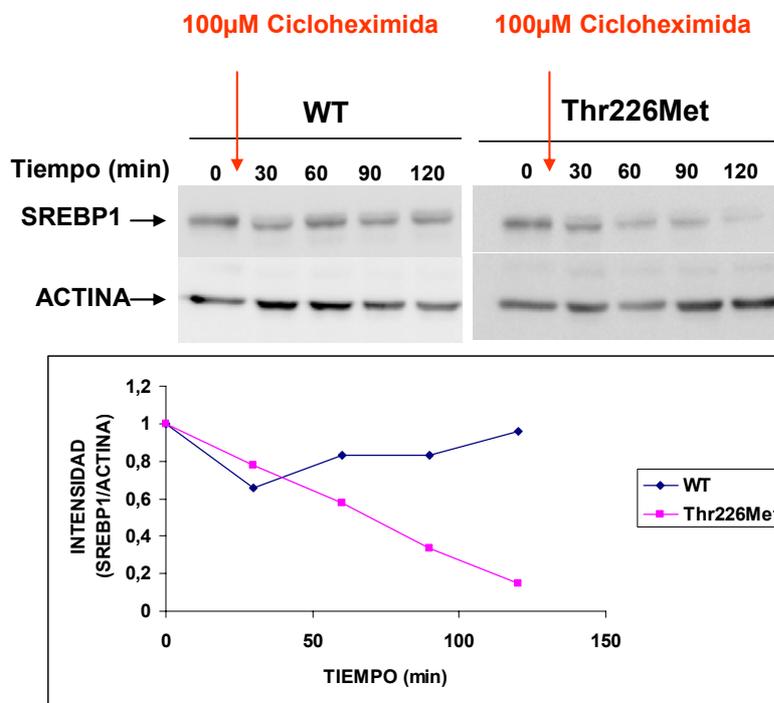
Para la identificación de esta posible modificación postraduccional obtuvimos extractos nucleares de células HEK293 infectadas con adenovirus de forma que sobreexpresaban grandes cantidades de las formas maduras de SREBP1c silvestre o Thr202Met. Ambas proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-SREBP1 y se analizaron posteriormente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, aunque ni este experimento ni ensayos *in vitro* de defosforilación realizados con  $\lambda$  fosfatasa permitieron

confirmar ni descartar si esta mutación afectaba a la fosforilación o a otro tipo de modificación postraducciona de SREBP1.

Los experimentos mostrados anteriormente se realizaron sobreexpresando las proteínas a tiempos cortos (6 y 9 horas postransfección) en las que los niveles de expresión de las proteínas SREBP1 WT y Thr226Met/Thr202Met eran comparables. Sorprendentemente al estudiar la expresión de las proteínas a tiempos más largos (hasta 24h postransfección) los niveles de expresión de las proteínas mutadas eran ostensiblemente menores (**figura 31**).

Para estudiar más profundamente si este efecto era debido a un aumento en la velocidad de degradación de la proteína mutada, se analizó la vida media de la proteína tras la sobreexpresión de SREBP1 silvestre y mutado en células HEK293. 18 horas después de la transfección se adicionó al medio de cultivo 100µM cicloheximida para detener la traducción proteica y se congelaron las células a distintos tiempos de incubación. Los extractos celulares se analizaron mediante western-blot como se ha descrito anteriormente. La expresión de SREBP1 se cuantificó respecto a la de actina confirmándose que la mutación Thr226Met aceleraba la degradación de la proteína (**figura 32**).

La estabilidad de SREBP1 está regulada por su degradación a través de la vía ubiquitin-proteasoma de forma dependiente de la fosforilación y acetilación de determinados residuos. Una hipótesis atractiva es que el residuo Thr226 o algún residuo próximo a este podría ser directamente modificado postraduccionalmente y que la mutación Thr226Met alteraría la modificación de dicho residuo, disminuyendo su estabilidad y actividad.

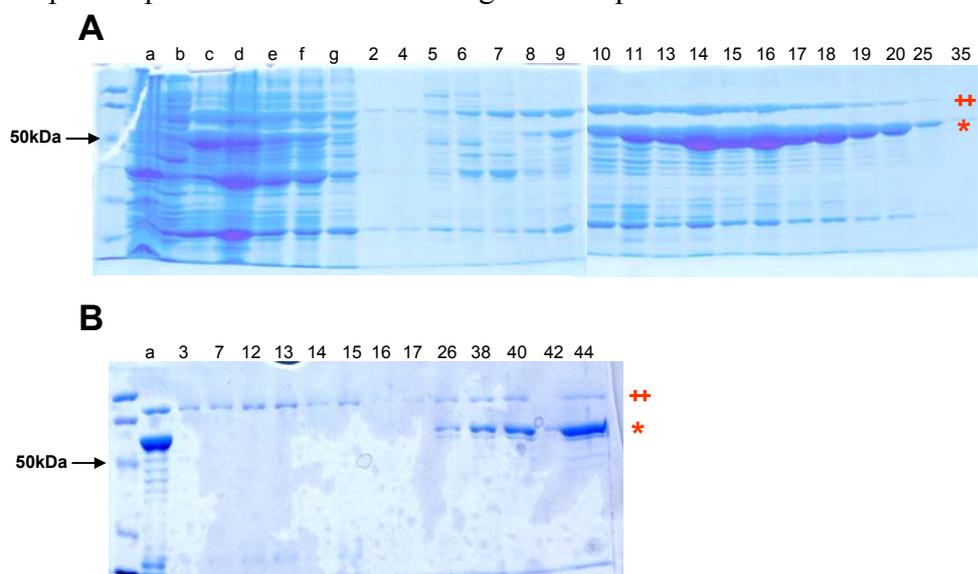


**Figura 32: Degradación de las proteínas SREBP1 WT y Thr226Met en presencia de cicloheximida.** Las proteínas SREBP1 silvestre y mutada fueron sobreexpresadas en células HEK293 durante 24 horas. Posteriormente se añadió 100µM cicloheximida para detener la síntesis proteica y se congelaron las placas a distintos tiempos. Los extractos celulares fueron analizados mediante western-blot. Las distintas bandas se cuantificaron y se normalizaron en función de la cantidad de actina. La figura representa la disminución de la cantidad relativa de SREBP1/actina respecto a la intensidad inicial.

Paralelamente comenzamos una segunda aproximación para determinar la importancia del residuo Thr226 en SREBP1. Para ello se clonaron las regiones activas (aminoácidos 1-403 de SREBP1c y 1-427 de SREBP1a) de la proteína silvestre y mutada en pauta con una repetición de seis residuos de histidina en el vector pPROEXHTa para su expresión en células procariontas, concretamente en la cepa BL21-RIL de *E.coli*. Hasta la fecha hemos conseguido sobreexpresar correctamente y en forma soluble estas proteínas y purificarlas. Brevemente el protocolo consiste en la precipitación de las proteínas con un 15% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , la posterior cromatografía de afinidad mediante una columna HisTrap chelating HP y una purificación final mediante una columna de intercambio iónico Hi-Trap SP. La pureza alcanzada fue de un 80% según puede apreciarse en geles de

SDS\_PAGE teñidos con Coomasie (**figura 33**). Esta proteína es suficientemente pura para su utilización en ensayos *in vitro* y evaluar la posible implicación del residuo Thr202 en modificaciones postraduccionales como la fosforilación por proteína-quinasas humanas.

No obstante este grado de pureza es insuficiente para abordar la cristalización de la proteína. El estudio realizado por espectrometría de masas MALDI-TOF indicó que la principal proteína contaminante era la chaperona procariota GroEL homóloga a la chaperona humana HSP90.



**Figura 33: Purificación de la proteína His-SREBP1.** A.- Cromatografía de afinidad (His-Trap): (a) Fracción insoluble tras la sonicación; (b) Fracción soluble tras la sonicación; (c) Fracción precipitada al 15% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; (d-f) Fracción no precipitada al 15% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; (g) Fracción no retenida por la columna; Las fracciones 2-28 corresponden al gradiente 0→300mM imidazol. Las fracciones 29-34 corresponden a 500mM imidazol. \*Banda correspondiente a SREBP1; ++Banda correspondiente a la principal proteína contaminante. B.- Cromatografía de intercambio iónico (Hi-Trap): (a) Solución inicial; Las fracciones 1-15 corresponden a el lavado inicial con 50mM NaCl; las fracciones 16-44 pertenecen al gradiente 50→450mM NaCl.

### 5.2-3.2. Estudio de las variantes localizadas en las regiones de unión intrón-exón

La formidable biodiversidad humana y las diferencias en los rasgos individuales no son explicadas por las mutaciones exónicas de los 20000 genes humanos conocidos y que provocan sustituciones de aminoácidos,

desplazamiento de la pauta de lectura o proteínas truncadas. Numerosas evidencias demuestran que variantes en regiones no codificantes como regiones promotoras, regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR y 3'UTR), regiones intrónicas o regiones intergénicas (grandes regiones entre genes) pueden contribuir cuantitativa y cualitativamente a la alteración de la expresión génica afectando al *splicing*, a la transcripción o a la traducción. Por tanto la relevancia clínica y funcional de estas variantes no debe ser ignorada ni infravalorada<sup>357</sup>.

Algunas variantes identificadas en el gen *SREBF1* están localizadas en las regiones de unión intrón-exón. Estas regiones tienen unas secuencias altamente conservadas y una modificación de las mismas podría alterar el correcto procesamiento de las regiones intrónicas y exónicas creando o eliminando sitios aceptores o donadores de *splicing*. Esto podría dar lugar a una alteración en la expresión del gen o a la formación de ARN mensajeros aberrantes. Por ello, realizamos el análisis de las variantes encontradas en estas regiones y de su capacidad para modificar las regiones intrón-exón mediante el programa NetGene2 Server<sup>348,349</sup>.

	intrón	V	exón	Confianza(%)	
<b>A</b>	TTCT	TCC	TTTTCACAG	ACATGCTT	97
	CTCTTCTTTT	CACAG	ACATGCTT		100
<b>B</b>	CTCTGTCCCC	AT	CAG	GTCCCTGG	38
	CTCTGTCCCC	ATTAG	GTCCCTGG		31

**Figura 34: Predicción informática de sitios aceptores de *splicing* del exón 2 y 19c del gen *SREBF1*.** Efecto de las variantes encontradas en las regiones de unión intrón-exón del gen *SREBF1*. (A) IVS1 -11delTCC. B) rs11868035C>T (IVS18-3C>T)

Este programa realiza una predicción de los sitios de procesamiento del pre-ARN mensajero humano, indicando los sitios más probables de inicio y fin de los intrones en función del potencial codificante de las secuencias, la secuencia de los sitios de procesamiento y la distancia entre ellos. Llamamos “donador de *splicing*” al primer nucleótido de un intrón y “aceptor de *splicing*” al último nucleótido del intrón. La numeración utilizada es respecto a la hebra directa del ADN en dirección 5' a 3'.

El estudio se aplicó a las variantes IVS1 -11delTCC y rs11868035 (IVS18-3C>T) ya que se encuentran en una región “aceptora de *splicing*”. En ambos casos el programa utilizado reconocía como aceptor de *splicing* al

nucleótido descrito en las bases de datos para el gen *SREBF1* y ninguna de estas variantes desplazaba este punto ni eliminaba dicha región, aunque como se observa en la **figura 34** ambas modificaban ligeramente el nivel de confianza de detección. Por tanto estas variantes probablemente no modifiquen el correcto procesamiento del mensajero de SREBP1 aunque no podemos descartar que modifiquen la eficiencia del proceso ya que como hemos descrito anteriormente, estas variantes y fundamentalmente IVS1 – 11delTCC se asocian con un aumento en el riesgo de desarrollar DM2.

El análisis se amplió a la variante rs2297508 localizada en el exón 18c de SREBP1c para evaluar si podría crear sitios donadores de *splicing* aberrantes.

Esta variante se asociaba en nuestro estudio con DM2 en los haplotipos formados con las variantes rs11868035 o con rs13306736 y 5'UTR1a-36delG, y previamente había sido asociada por otros grupos con obesidad mórbida<sup>338</sup> o con dislipémia asociada al tratamiento con antiretrovirales en enfermos de VIH-1<sup>337</sup>. Nuevamente el programa detecta como donador más probable al nucleótido descrito en las bases de datos. La variante rs2297508G>C no ocasionaba ningún desplazamiento en este sitio, salvo una ligera modificación en el nivel de confianza con el que es reconocido (**figura 35**).

exón V	intrón	<u>Confianza(%)</u>
CTAGG <b>G</b> AAAGGCTTCCCCTCCCCCTCCGGCCACAAG	GTACACAAC	41
CTAGG <b>C</b> AAAGGCTTCCCCTCCCCCTCCGGCCACAAG	GTACACAAC	44

**Figura 35: Predicción informática del sitio donador de *splicing* del exón 18c del gen *SREBF1*.** Efecto de la variante rs2297508G>C en la región de unión exón-intrón.

### 5.2-3.3. Estudio de las variantes localizadas en la región reguladora 3'UTR de SREBP1c

Las regiones 3'UTR son un importante componente estructural del ARNm. Estas regiones pueden modular la expresión génica<sup>358</sup> afectando a la localización, la estabilidad del ARNm o controlando la traducción. Un elemento clave en la regulación mediada por estas regiones son los elementos ricos en adenina y uracilo denominados ARE (cis-acting adenine-uridine-rich element) como los motivos del tipo AUUUA. Estos elementos permiten la unión de proteínas específicas denominadas ARE-BP (**ARE-binding proteins**) que regulan la estabilidad y la degradación del ARNm,

permitiendo a las células ajustar rápidamente la expresión de factores cuya sobreexpresión sería nociva para el organismo.

Tres elementos ARE han sido identificados en el ARNm de SREBP1c de rata como posibles mediadores de la regulación por PUFA de la estabilidad y expresión de dicho mensajero <sup>260</sup>. Realizando un alineamiento entre el mensajero de rata y el humano se observa que estos elementos están conservados en ambas secuencias, lo que sugiere que también podrían desempeñar un importante papel en la regulación de la expresión del mensajero humano. Además, a diferencia de la variante 3'UTR+208delCC que está en una región poco conservada en el mensajero de ambas especies, la variante 3'UTR+334delTTT provoca la pérdida de tres uracilos entre dos de estos elementos ARE (**figura 36**).

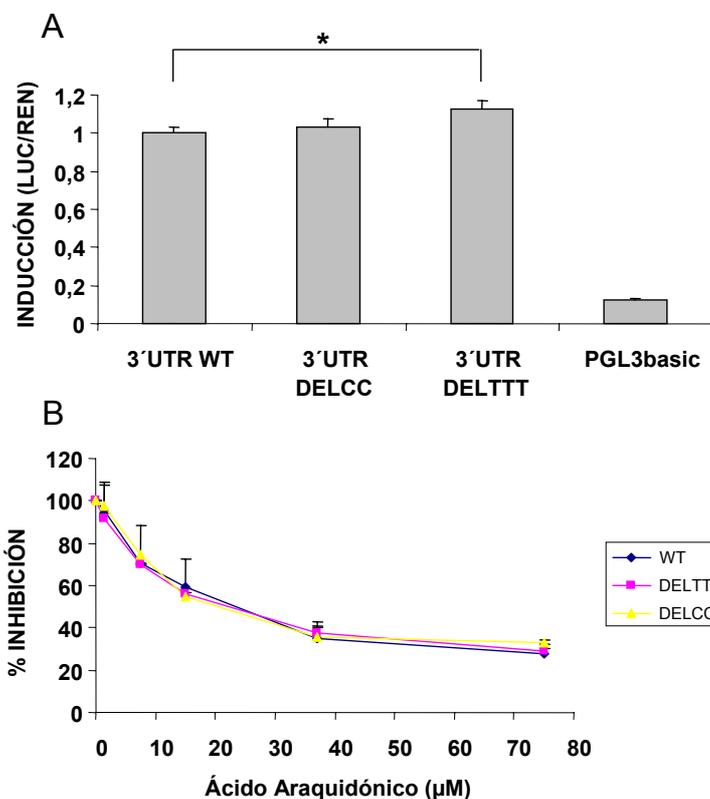


**Figura 36: Homología entre las regiones 3'UTR del gen *SREBF1* de rata y humano.** Se muestra la localización de la variante 3'UTR+334delTTT así como de la señal de poliadenilación sobre la secuencia humana. En la secuencia de rata se encuadran las regiones ARE propuestas como posibles reguladores de la estabilidad del mensajero <sup>260</sup>.

Como aproximación para estudiar si alguna de estas variantes alteraba la transcripción o la traducción de SREBP1c se diseñaron unas construcciones para cuantificar la expresión del gen de la luciferasa dirigida por el promotor y las regiones 5' y 3'UTR de SREBP1c. Además de la construcción con la secuencia silvestre se clonaron también otras con las deleciones 3'UTR+208delCC y 3'UTR+334delTTT (**figura 14**).

Como se ha detallado en la introducción, los PUFA pueden regular SREBP1c a tres niveles: (i) a nivel de promotor, inhibiendo su transcripción; (ii) desestabilizando el mensajero y (iii) inhibiendo la maduración de la forma precursora. La región promotora y 5'UTR es idéntica en todas estas construcciones; por tanto, en caso de existir diferencias en su actividad serían debidas a las variaciones en sus regiones 3'UTR.

El ensayo realizado en células HepG2 demostró que la construcción con la variante 3'UTR+334delTTT presentaba un ligero pero significativo aumento en la expresión de luciferasa en condiciones basales (**figura 37A**).



**Figura 37: Efecto en la actividad transcripcional de las variantes identificadas en la región 3'UTR de SREBP1c.** En las construcciones utilizadas, el gen de la luciferasa es expresado bajo el control del promotor y la región 5'UTR silvestres del gen *SREBF1c* así como de la región 3'UTR silvestre (WT) o con las variantes 3'UTR+208delCC (DEL CC) o 3'UTR+334delTTT (DEL TTT). Las distintas construcciones se transfectaron en células HepG2 junto con el control interno pRenilla. 24 horas después se cuantificó la señal de la luciferasa y de la renilla. (A) La figura muestra la media±SEM de la señal basal de la luciferasa normalizada con los valores de renilla y referenciado a la construcción silvestre. \* $p < 0,05$ . (B) Efecto de la incubación durante 24h con distintas concentraciones de ácido araquidónico, sobre la inhibición de la expresión de la luciferasa en las distintas construcciones. La figura muestra la señal luciferasa normalizada respecto a la señal renilla y referenciada a la señal de cada construcción en ausencia de ácido araquidónico a la que se dio el valor 100%.

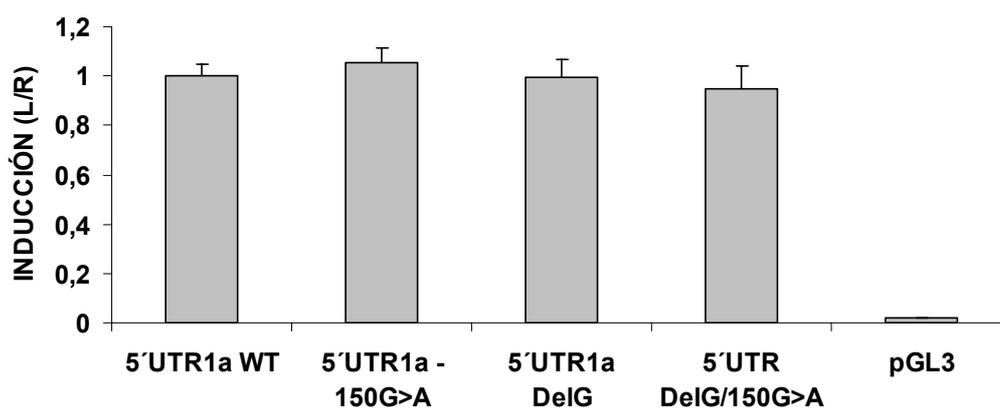
Puesto que esta variante podría alterar los sitios ARE implicados en la desestabilización del mensajero de SREBP1c por PUFA, evaluamos la actividad luciferasa de estas construcciones en presencia de concentraciones crecientes de ácido araquidónico. Como se observa en la **figura 37B**

ninguna de las variantes alteraba la expresión de la luciferasa en estas construcciones.

#### 5.2-3.4. Estudio de las variantes localizadas en las regiones reguladoras 5'UTR de SREBP1a y SREBP1c

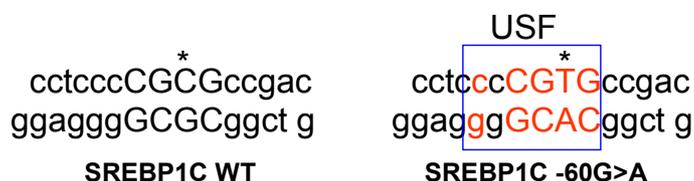
Para el estudio de las variantes encontradas en las regiones 5'UTR de SREBP1a y 1c se diseñaron construcciones en las que el gen de la luciferasa se expresaba bajo el control del promotor y la región 5'UTR de cada una de las isoformas, tanto silvestre como con las variantes encontradas (**figura 14**).

Las construcciones con las regiones correspondientes a la isoforma SREBP1a fueron transfectadas en células HepG2 observándose que ninguno de estos cambios (-36delG o -150G>A) alteraba la actividad basal respecto a la secuencia silvestre (**figura 38**).



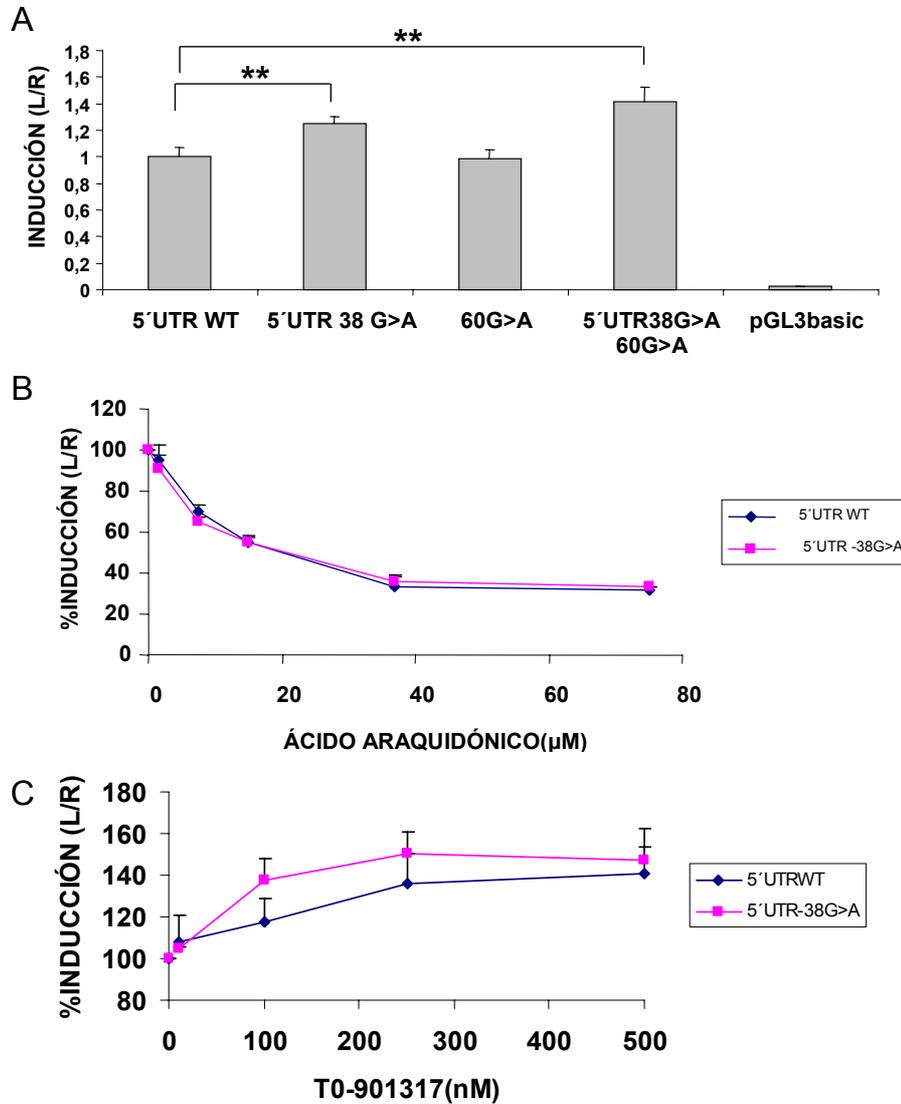
**Figura 38: Efecto de las variantes identificadas en la región 5'UTR de SREBP1a sobre su actividad transcripcional.** En las construcciones utilizadas, el gen de la luciferasa se expresa bajo el control del promotor y la región 5'UTR (silvestre o mutada) del gen *SREBF1a*. Las distintas construcciones se transfectaron en células HepG2 junto con el control interno pRenilla. 24 horas después se cuantificó la señal de la luciferasa y de la renilla. La figura muestra la media±SEM de la señal de la luciferasa normalizada con los valores de renilla y referenciado a la construcción WT.

La variante -60G>A está situada en la posición -6 respecto al inicio de la transcripción de la isoforma SREBP1c. El programa de análisis de promotores MatInspector predecía que el cambio -60G>A podía crear un sitio de unión para el factor USF (*upstream stimulatory factor*) (**figura 39**).



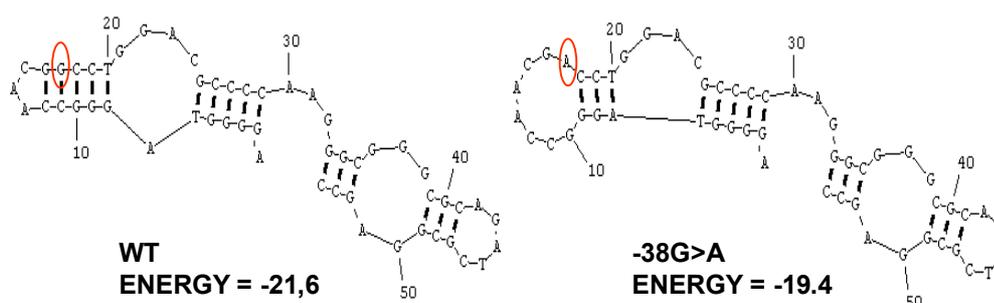
**Figura 39: Predicción informática del efecto de la variante -60G>A sobre los lugares de unión del promotor de *SREBF1c*.** El programa de análisis MatInspector indica que esta variante podría generar la aparición de un nuevo sitio de unión para los factores USF.

A pesar de esta predicción informática, este cambio no alteraba la actividad basal de la construcción. Por el contrario, el cambio -38G>A presente en la región 5'UTR1c si aumentaba significativamente esta actividad. Al introducir la variante -38G>A en la construcción -60G>A para generar un doble mutante, se observaba nuevamente un aumento significativo en la actividad basal, confirmando el efecto sobre la actividad de la variante 5'UTR-38G>A. Esta variante no alteraba la inhibición provocada por distintas concentraciones de ácido araquidónico. Tampoco alteraba significativamente la inducción causada por concentraciones crecientes de TO-901317, un agonista de los factores LXR (**figura 40**).



**Figura 40: Efecto de las variantes situadas en el promotor y la región 5'UTR de SREBP1c en su actividad transcripcional.** Las construcciones se transfectaron en células HepG2 junto con el control interno pRenilla. 24 horas después se cuantificó la señal de la luciferasa respecto a la de la renilla. (A) La figura muestra la media±SEM de la señal basal referenciada a la construcción silvestre. La comparación estadística se realizó utilizando el valor t de Student.  $**p < 0,02$ . (B) Tras la transfección, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de ácido araquidónico. La figura muestra la inhibición de la transcripción calculada como porcentaje de señal respecto a la actividad sin ácido araquidónico. (C) Tras la transfección, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de TO-901317. La figura muestra la inducción de la transcripción, calculada como porcentaje de señal respecto a la actividad sin TO-901317.

La estructura secundaria del ARNm desempeña un importante papel en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, los bucles formados en las regiones 5' y 3' son importantes en la regulación de la estabilidad del mensajero. Aunque su papel aumentando o disminuyendo el tiempo de vida del transcrito todavía es desconocido podría implicar la interacción con factores reguladores de la traducción o de la rápida degradación de los ARNm. El análisis mediante el programa RNAstructure version 4.3 de la región 5'UTR de SREBP1c mostró que la variante -38G>A ocasionaba una alteración en estos bucles (**figura 41**). Una posible hipótesis es que el aumento en la actividad de la variante 5'UTR-38G>A se deba a la modificación en la eficiencia de transcripción, traducción o estabilidad del ARNm provocada por la alteración de su estructura secundaria.



**Figura 41:** Estructura secundaria de mínima energía calculada por el programa RNAstructure v.4.3 para la región 5'UTR de SREBP1c silvestre o 5'UTR-38G>A. Esta variante provoca la aparición de un bucle que podría alterar la estabilidad o la traducción del ARNm. La posición -38 se señala en rojo.

#### **5.2-4. Implicación de SREBP1 en diabetes monogénicas**

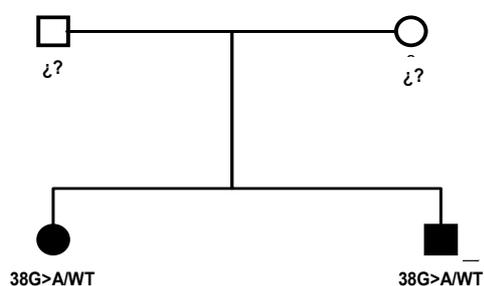
Las diabetes tipo MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) son enfermedades monogénicas que generalmente comparten cuatro características: (i) tienen un patrón de herencia autosómico dominante; (ii) se manifiestan generalmente antes de los 25 años; (iii) no existen marcadores pancreáticos de autoinmunidad y (iv) cursan con un defecto primario en la función  $\beta$  pancreática. A pesar de estas características generales, dentro de este subgrupo se incluyen casos con características clínicas y genéticas muy variadas<sup>93</sup>.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los genes responsables de la mayoría de formas de esta enfermedad (**tabla 1**) aunque todavía existen familias (aproximadamente un 15-20%) con una herencia autosómica dominante de diabetes mellitus no autoinmune en las que no se ha identificado el gen responsable y que se conocen como MODYX<sup>359</sup>.

Como se ha apuntado en el capítulo “introducción”, trabajos recientes sugieren una implicación directa de SREBP1c en los mecanismos de síntesis y secreción de insulina; por tanto, una alteración severa en la expresión o actividad de este factor podría estar implicada en casos de diabetes tipo MODY.

Por este motivo iniciamos una colaboración con el Servicio de Endocrinología y Diabetes del Hospital de Cruces (Barakaldo. Bizkaia) para el rastreo molecular del gen *SREBF1* en familias con MODYX.

Sorprendentemente se identificó la variante 5'UTR-38G>A en dos individuos afectados en una de las familias estudiadas. Los portadores son hermanos aunque desgraciadamente por el momento no disponemos de más datos de estos pacientes ni del resto de integrantes de esta familia (**figura 42**).



**Figura 42:** Árbol genealógico de los individuos diagnosticados como MODYX en los que se encontró la variante 5'UTR-38G>A.

La variante 5'UTR-38G>A se identificó por primera vez en una mujer de 53 años diagnosticada como DM2. Ante la posibilidad de que se tratara de un caso de MODYX mal diagnosticado se estudió a los otros miembros de esta familia (**figura 43**). La madre (78 años) es también diabética tipo 2. El padre del probando es supuestamente portador de la variante, pero murió a los 50 años y no disponemos de ningún dato adicional. Los hijos del probando tienen entre 25 y 31 años y son sanos.

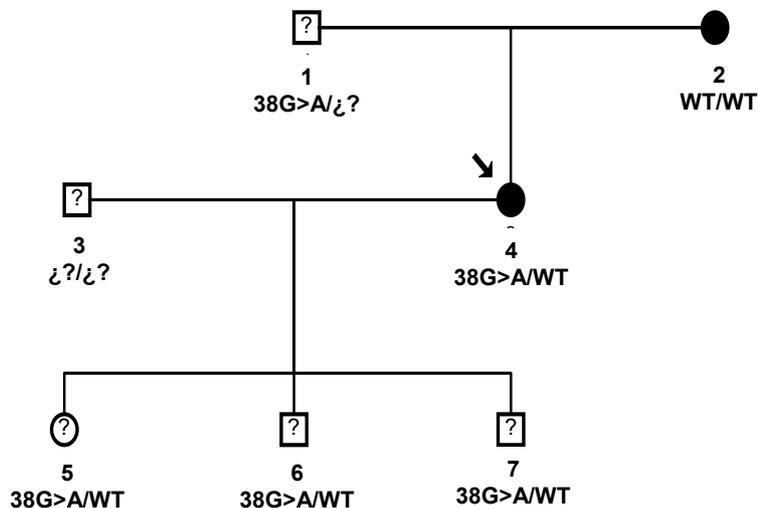


Figura 43: Árbol genealógico de los familiares del paciente (individuo 4) en el que se identificó la variante 5'UTR-38G>A en población valenciana. El genotipo del individuo 1 ha sido inferido a partir de sus familiares.

Los parámetros clínicos disponibles de esta familia se resumen en la **tabla 12**.

	INDIVIDUO				
	2	4	5	6	7
Sexo (H/M)	M	M	M	V	V
Edad (años)	78	53	29	31	25
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25,5	30,3	24,9	27	23,2
Cintura/cadera	0,881	0,883	0,845	0,898	0,882
Glucosa en ayuno (mg/dl)	116	127	89	87	75
Insulina (µg/ml)	13	11,5	8,6	7,6	3,1
PAS (mmHg)	170	1730	100	105	110
PAD(mmHg)	90	90	65	70	75
Triglicéridos (mg/dl)	135	103	90	68	86
Colesterol total (mg/dl)	242	227	145	142	178
HDL-colesterol (mg/dl)	52	43	28	27	27
LDL-colesterol (mg/dl)	163	163	99	101	134
VLDL-colesterol (mg/dl)	27	21	18	14	17
Apolipoproteína B (mg/dl)	134	111	79,5	77,8	113
Apolipoproteína A (mg/dl)	179	134	98	105	102
HbA1c (g/dl)	5,9	5,4	4,4	4,5	4,3

Tabla 12: Parámetros bioquímicos y antropométricos determinados en familiares del paciente en el que se identificó por primera vez la variante 5'UTR-38G>A

En este estudio de las familias MODYX también se identificaron dos variantes intrónicas (IVS18+7A>T e IVS14+3G>T) en dicho gen, aunque ninguna de ellas cosegregaba con la enfermedad en las familias portadoras.

### **5.3- ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN EL GEN *INSIG2***

Las proteínas INSIG1 e INSIG2 (**Insulin induced gene1-2**) participan en la regulación general de los SREBPs, y probablemente, en la regulación diferencial del procesamiento de cada una de las isoformas de SREBP.

En este trabajo hemos examinado si seis frecuentes variantes en el gen *INSIG2*, presentes en las bases de datos del genoma humano, están asociadas con DM2 o fenotipos clínicos relacionados con esta enfermedad.

#### **5.3-1. Selección de las SNP estudiadas**

La selección de las variantes a estudiar se realizó entre los polimorfismos presentes en las bases de datos del genoma humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Las variantes de estudio se seleccionaron en función de tres criterios:

1.- Polimorfismos que presentaban una alta heterocigosidad. El punto de corte se estableció en una frecuencia teórica del alelo minoritario mayor o igual al 10%.

El análisis previo del poder estadístico del estudio indica que con el número de muestras analizadas es posible detectar para un valor de  $P=0,05$  y con un 80% de potencia variantes que presenten una frecuencia próxima al 10% y que estén asociadas con un odds ratio igual o superior a 1,85, asumiendo un modelo dominante.

2.- Variantes que supusieran una alteración en la secuencia aminoacídica o en las zonas de unión intrón-exón. Las proteínas de la familia INSIG tienen una alta homología entre sí y se diferencian fundamentalmente en su regulación. Por este motivo nuestro estudio también se centró en las variantes localizadas en el promotor de *INSIG2* que potencialmente podrían afectar a la unión de distintos factores de transcripción modificando la regulación transcripcional de este gen.

3.- Las variantes seleccionadas debían “informar” sobre la variación genética de la mayor parte del gen *INSIG2* en función de los datos

disponibles en el proyecto Hap Map II (release no. 21; <http://www.hapmap.org/>).

En función de estos tres criterios seleccionamos seis polimorfismos situados en el promotor de *INSIG2*: rs17587254:G>A; rs7589375:T>C; rs4849676:T>C rs10185316:C>G rs11123469:T>C y rs4848492:T>C

El análisis realizado mediante los programas Transfact y Genomatix indicó que la variante rs7589375:T>C estaba localizada en un elemento de unión reconocido por los factores de transcripción 1 y 3 de la familia GATA. Este elemento cTCAA<sup>\*</sup>tcttc cambiaba a cTCAA<sup>\*</sup>ccttc en la variante rs7589375:T>C perdiendo el sitio de unión teórico para los factores GATA.

La variante rs4849676:T>C provocaba la aparición de un sitio de unión para la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (gtgtttTGATgtgaagtat) que no estaba presente en la secuencia silvestre.

De modo similar, la variante rs10185316:C>G inducía la aparición de un sitio de unión para HNF-1 (ggcCAATtataca<sup>\*</sup>aat) que no estaba presente en la secuencia silvestre (**figura 44**).



**Figura 44: Predicción informática del efecto de las variantes estudiadas en los sitios de unión del promotor de *INSIG2* según los programas MatInspector y Transfac. En las figuras 39B y 39C se muestran las secuencias antisentido.**

En función de los datos obtenidos a partir del proyecto Hap Map II (release no. 21) la variante rs7589375:T>C, también captura variación genética de los siguientes polimorfismos:

rs13412017:A>T ( $D'=0,828$ ;  $r^2=0,686$ )

rs7571323:C>T ( $D'=0,828$ ;  $r^2=0,686$ );

rs2422166:C>T ( $D'=0,834$ ;  $r^2=0,695$ );

rs1352083:C>T ( $D'=1$ ;  $r^2=1$ );

rs13393332:C>G ( $D'=1$ ;  $r^2=1$ );

Por su parte, la variante rs4849676:T>C captura variación genética de:

rs12475629:A>G ( $D'=0,898$ ;  $r^2=0,732$ );

rs17047728:A>G ( $D'=0,89$ ;  $r^2=0,792$ );

rs12613329:C>G ( $D'=1$ ;  $r^2=0,817$ );

rs1123469:T>C ( $D'=0,91$ ;  $r^2=0,81$ );

### **5.3-2. Genotipado de las variantes y estudios de asociación**

Las variantes seleccionadas fueron estudiadas en 295 pacientes no relacionados con DM2 y 168 controles no diabéticos pertenecientes a la genoteca descrita anteriormente.

El genotipado de las muestras se realizó mediante el sistema PCR-multiplex y minisequenciación como está descrito en el capítulo material y métodos. Los distintos genotipos se analizaron mediante los programas SNPstat y Haploview observándose que tres de las SNPs estudiadas mostraban una asociación significativa con DM2 (**tabla 13**).

Los individuos con al menos un alelo C para las variantes rs4849676:T>C [ $\chi^2= 7,29$ ;  $P= 0,0069$ , odds ratio= 2,56 (CI 95% =1,27-5,16);  $P=0,005$ ] y rs11123469:T>C [ $\chi^2= 5,21$ ;  $P=0,022$ , odds ratio= 2.14 (CI 95% =1,10-4,16);  $P=0,019$ ] tenían un mayor riesgo de desarrollar DM2 comparado con aquellos que tenían dos alelos T.

El alelo C para la variante rs7589375:T>C estaba fuertemente asociado con una disminución en el riesgo de desarrollar DM2 comparado con el alelo T al aplicar un modelo codominante o aditivo y más fuertemente al aplicar un modelo recesivo [ $\chi^2= 7,56$ ;  $P=0,0059$ , odds ratio =0,33 (CI 95% =0,14-0,75);  $P=0,0063$ ]. Al ajustar las muestras por edad, sexo e IMC mediante una regresión múltiple esta variante continuaba asociada a una disminución en el riesgo de DM2 al aplicar un modelo aditivo, es decir, al asumir un efecto aditivo para la presencia de cero, uno o dos alelos-C [odds ratio=0,66; (95%CI=0,45-0,98);  $P= 0,037$ ]; al aplicar un modelo dominante, que asume que la presencia de un solo alelo-C es suficiente para conferir el

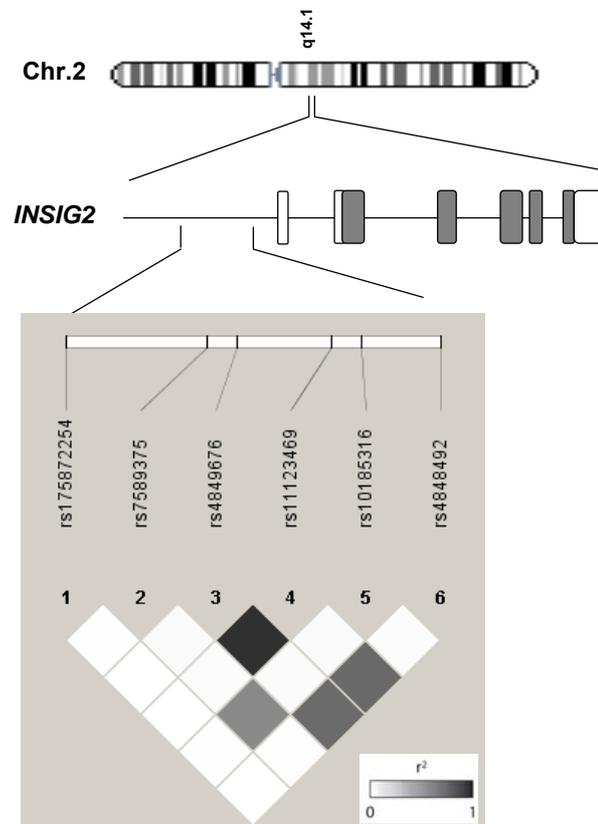
riesgo de DM2 se observa una tendencia similar [odds ratio=0,63; (95%CI=0,39-1,02),  $P=0,057$ ].

SNP	FRECUENCIA GENOTIPO (%)			HWE P VALOR*	FRECUENCIA DEL ALELO MINORITARIO		
	GENOTIPO	CASO	CONTROL		CASO/CONTROL	OR (95% CI)	P valor
rs175872254:G>A	GG	100	100	Monomórfico	- / -	-	-
	GA	0	0				
	AA	0	0				
rs7589375:T>C	TT	62.1	54.2	0,14	0,21 / 0,28	0,33 (0,14-0,75) <sup>‡</sup>	<b>0,0063</b> <sup>‡</sup>
	TC	34.4	35.9				
	CC	3.5	9.9				
rs4849676:T>C	TT	85.9	94.0	0,17	0,08 / 0,03	2,56(1,27-5,16) <sup>†</sup>	<b>0,0053</b> <sup>†</sup>
	TC	12.9	5.5				
	CC	1.2	0.5				
rs11123469:T>C	TT	86.1	93.1	0,22	0,07 / 0,04	2,14(1,10-4,16) <sup>†</sup>	<b>0,019</b> <sup>†</sup>
	TC	13.1	6.4				
	CC	0.8	0.5				
rs10185316:C>G	CC	52.4	49.1	0,11	0,28/ 0,32	0,87(0,59-1,30) <sup>†</sup>	0,51 <sup>†</sup>
	CG	39.9	38.0				
	GG	7.7	12.9				
rs4848492:T>C	TT	84.1	93.0	0,002	-	-	-
	TC	15.5	5.8				
	CC	0.4	1.2				

**Tabla 13: Distribución de genotipos y frecuencias alélicas de las SNPs estudiadas en el gen *INSIG2* en casos y controles.** Los valores  $P$  significativos se muestran en negrita. La secuencia de referencia utilizada fue (NT\_022135.15). \*Valores de  $P$  para el equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control. <sup>†</sup>Modelo dominante. <sup>‡</sup>Modelo recesivo.

La variante rs17587254 fue encontrada en homocigosis en la población de estudio a pesar de que la frecuencia media del alelo minoritario descrita en las bases de datos del proyecto HapMap es de un 10%. La variante rs4848492 fue excluida del estudio ya que mostró una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control.

La utilización de los programas Haploview, SNPstat y Pypop win32.0.6.0 permitió establecer el desequilibrio de ligamiento entre las distintas variantes genotipadas (**figura 45**).



**Figura 45: Representación de las variantes estudiadas en el gen *INSIG2* mediante el programa Haploview, con su localización.** Los valores de desequilibrio de ligamiento se representan en los cuadrados, siendo más oscuros a mayor valor de  $r^2$ .

Las variantes rs4849676:T>C y rs11123469:T>C presentaban un elevado desequilibrio de ligamiento ( $D' = 0,91$ ;  $r^2 = 0,81$ ). Por tanto la asociación de cada una de ellas con un aumento en el riesgo de DM2 no debería ser considerada independientemente. De hecho, la distribución del haplotipo C-C era significativamente distinta entre casos (6,9%) y controles (3,2%), y significativamente aumentaba el riesgo de DM2 respecto al haplotipo T-T [odds ratio=2,15, (CI 95%= 1,12-4,16);  $P = 0,023$ ] (**tabla 14**).

Las dos variantes más fuertemente asociadas con DM2 en nuestro estudio, rs7589375:T>C y rs4849676:T>C, están situadas a tan solo 305pb. Aunque presentaban un bajo desequilibrio de ligamiento entre si ( $r^2 = 0,019$ ), debido a su elevada frecuencia en la población estudiamos la asociación con DM2

de las combinaciones entre los alelos de ambas variantes. La distribución del haplotipo C-T difiere significativamente entre casos (20,7%) y controles (27,9%), mostrando una asociación negativa con DM2 respecto al haplotipo T-T [odds ratio=0,71, (CI 95%=0,52-0,97);  $P=0,034$ ]. La distribución del haplotipo T-C también difería entre casos (7,5%) y controles (3,3%) aumentando el riesgo de DM2 respecto al haplotipo T-T [odds ratio=2,11; (CI 95%=1,10-4,05);  $P=0,025$ ] (tabla 14).

HAPLOTIPO <sup>‡</sup>	rs7589375:T>C	rs4849676:T>C	rs11123469:T>C	CASO/CONTROL	OR (95% CI)	P valor
HAP-A	T	T	-	0.72 / 0.69	1	-
HAP-B	C	T	-	0.21 / 0.28	0.71 (0.52-0.97)	<b>0.034</b>
HAP-C	T	C	-	0.08 / 0.03	2.11 (1.10-4.05)	<b>0.025</b>
HAP-D	-	T	T	0.92 / 0.96	1	-
HAP-E	-	C	C	0.07 / 0.03	2.15 (1.12-4.16)	<b>0.023</b>

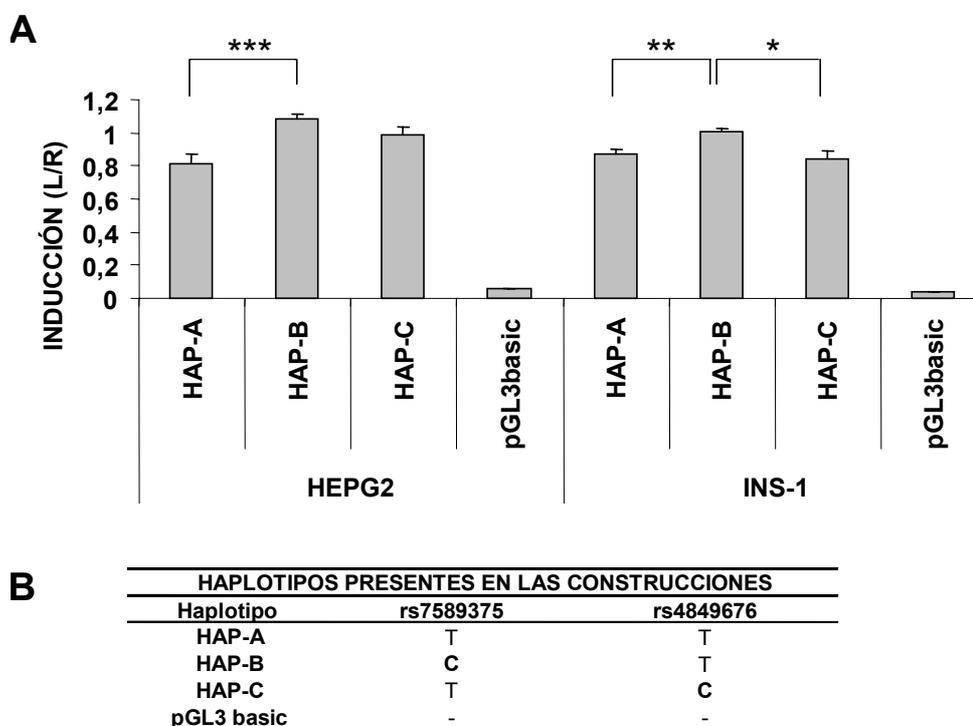
**Tabla 14: Genotipos y frecuencias de los haplotipos del gen *INSIG2* en casos y controles.** <sup>‡</sup>Los genotipos corresponden a las combinaciones más frecuentes de las variantes rs7589375-rs4849676, y rs4849676-rs11123469. Los valores  $P$  significativos se muestran en negrita.

### 5.3-3. Estudio funcional de las variantes de *INSIG2*

Para investigar si alguno de los haplotipos encontrados influenciaba la transcripción del gen *INSIG2*, realizamos un ensayo de luciferasa con las variantes del promotor de dicho gen, a las que denominamos HAP-A, HAP-B y HAP-C (figura 46).

La región promotora del gen *INSIG2* humano comprendida entre los nucleótidos -3589 y -12 (posición relativa al lugar de inicio de la transcripción) fue amplificada y clonada en el vector pGL3-basic, dirigiendo la expresión del gen reportero de la luciferasa, tal y como se describe en material y métodos.

Los estudios funcionales se realizaron transfectando estas construcciones en células HepG2 e INS-1 junto a un vector pRenilla utilizado para la normalización y para corregir diferencias debidas a la eficiencia de transfección y/o de pipeteo.



**Figura 46: Análisis de actividad transcripcional del promotor *INSIG2* humano.** A.- Las células HepG2 e INS-1 se transfectaron con 750ng de las distintas construcciones y con 40ng de plásmido pRenilla sin promotor. La actividad luciferasa se normalizó respecto a los valores de renilla. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM de cuatro transfecciones y tres experimentos independientes. La comparación estadística entre grupos se realizó utilizando el valor t de Student. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Los valores representan la inducción respecto al vector HAP-B. B.- La tabla muestra las combinaciones de las variantes rs7589375 y rs4849676 que forman el haplotipo de cada construcción representada en la figura 46A.

En ambas líneas celulares se observó una menor actividad transcripcional para las construcciones con los haplotipos HAP-A y HAP-C comparado con la construcción HAP-B (**figura 46**). Cada transfección fue realizada por triplicado en tres experimentos independientes. Por tanto, la variante rs7589375-T parecía ser la responsable de la pérdida de actividad del promotor de *INSIG2* en estas construcciones. La presencia de este alelo provoca una disminución en la actividad del promotor de *INSIG2* que podría llevar a una alteración del metabolismo lipídico a través de una desregulación de los factores SREBPs.

Estos resultados demuestran que variantes genéticas del gen *INSIG2* y especialmente la variante rs7589375:T>C influyen en el riesgo de DM2 en la población estudiada, lo cual podría deberse a una alteración causada por estas variantes en la expresión de *INSIG2* y secundariamente a una desregulación de las proteínas SREBP.

#### **5.3-4. Asociación con parámetros bioquímicos y antropométricos**

En nuestro trabajo también examinamos si la variante rs7589375:T>C se asociaba con la alteración de los parámetros bioquímicos y antropométricos característica de la DM2. No encontramos ninguna asociación con los niveles de glucemia en ayuno, de lipoproteínas o IMC. No obstante, los portadores del alelo “T” presentaban un aumento significativo en la presión arterial diastólica, así como una disminución cercana a la significación en los niveles de insulina (**tabla 15**).

	rs7589375:C>T			P valor
	C/C	C/T	T/T	
Glucosa en ayuno (mg/dl)	152,7±26,7	144,1±31,6	156,9±43,3	0,113
Insulina (µg/ml)	22,6±15,7	14,7±8,6	12,9±9,4	0,074
IR HOMA	6,0±1,8	5,1±3,5	4,9±3,4	0,281
PAS (mmHg)	126,2±21,4	146,1±18,2	149,0±17,0	0,133
PAD(mmHg)	75,0±4,1	83,2±10,4	88,3±9,8	<b>0,027</b>
Triglicéridos (mg/dl)	161,7±106,9	146,7±63,6	167,3±111,7	0,426
Colesterol total (mg/dl)	183,2±32,5	215,4±66,1	216,9±42,1	0,693
HDL-colesterol (mg/dl)	46,0±10,9	43,9±14,8	45,5±9,9	0,099
LDL-colesterol (mg/dl)	105,0±49,5	132,9±48,1	137,1±37,7	0,557
VLDL-colesterol (mg/dl)	37,0±23,6	39,7±50,5	33,4±22,9	0,323
Apolipoproteína B (mg/dl)	103,7±20,4	112,2±33,4	115,3±27,3	0,882
Apolipoproteína A (mg/dl)	120,7±33,5	138,6±18,3	137,6±20,7	0,635
HbAc (g/dl)	7,6±2,2	6,6±1,7	6,8±1,8	0,606
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27,0±4,5	32,2±5,4	30,0±4,8	0,136

**Tabla 15: Asociación del genotipo rs7589375T>C con niveles de insulina y presión arterial en la población estudiada en un análisis univariante realizado mediante el programa SPSS. La edad, sexo e IMC fueron utilizadas como covariables, salvo para la asociación de IMC en la que sólo se utilizó como covariable el sexo y la edad.**



## **6.DISCUSIÓN**

## Discusión

---

La DM2 es una enfermedad compleja y heterogénea en cuya etiología intervienen factores ambientales y genéticos. Debido a la multitud de rutas implicadas en el control metabólico del organismo, los genes de susceptibilidad, cuya alteración puede contribuir al desarrollo de la enfermedad, son muy diversos y en gran medida desconocidos. El término gen de susceptibilidad implica que ningún gen es suficientemente “fuerte” como para actuar como un “diabetogen” por sí mismo, pero puede actuar como un “gen prodiabético” favoreciendo la aparición de un subfenotipo o “fenotipo prediabético” (menor sensibilidad a la insulina, secreción de insulina alterada, obesidad visceral etc), de forma que su interacción con otros genes y con factores ambientales determinará el control metabólico del individuo.

Nuestra hipótesis inicial fue que variantes en el gen *SREBF1* o en los genes que lo regulan, como *INSIG2*, podrían condicionar la susceptibilidad genética a la DM2 favoreciendo la deposición de ácidos grasos en determinados tejidos y la aparición de fenómenos de lipotoxicidad y resistencia a la insulina.

De hecho, la alteración del almacenamiento y movilización de los lípidos es subyacente a la mayoría de características de la DM2 como son el aumento de la gluconeogénesis hepática, pérdida de la secreción de insulina inducida por glucosa y habitualmente obesidad<sup>100,360</sup>. Además, la alteración de la lipólisis en tejidos sensibles a la insulina y en la capacidad de almacenamiento de triglicéridos se manifiestan mucho antes que la hiperglucemia por lo que son marcadores tempranos de fenómenos de resistencia a insulina.

En individuos normoglucémicos familiares de primer grado de pacientes con DM2 se ha demostrado una menor supresión de la lipólisis en ayuno mediada por insulina respecto a individuos control ajustados por edad y peso en la mayoría de estudios realizados<sup>361-363</sup>, sugiriendo que la menor supresión por insulina de la liberación de ácidos grasos es un defecto primario en los individuos genéticamente predispuestos a desarrollar DM2. Estas y otras evidencias dan lugar a la visión “adipocéntrica” de la resistencia a la insulina y del síndrome metabólico, que considera como defecto primario la incorrecta homeostasis del tejido adiposo en respuesta a estímulos nutricionales y hormonales.

Las proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBPs) y concretamente la isoforma SREBP1c podría constituir un nexo entre desregulación en la homeostasis lipídica y los cuadros de resistencia a insulina, las complicaciones comúnmente asociadas a ésta y finalmente la

disminución en la función  $\beta$  pancreática. Como se ha descrito en la introducción, la homeostasis glucolipídica del organismo está determinada por el equilibrio entre sensibilidad a la insulina y secreción de insulina. La desregulación de SREBP1c podría modificar ambos factores.

En el tejido adiposo, la expresión de SREBP1c está disminuida en estados de resistencia a insulina como consecuencia del bloqueo de la ruta de señalización PI3 quinasa. La hiperinsulinemia compensatoria frecuentemente asociada a estados de resistencia a insulina provoca un aumento en la expresión de este factor en hígado a través de la señalización de IRS-1 y en músculo esquelético debido a una sobreactivación de la ruta MAPK, responsable de la activación de este gen en el tejido muscular<sup>180</sup>. Esta divergencia en la señalización de insulina se ha asociado al flujo de ácidos grasos hacia el músculo esquelético, hígado, o páncreas donde su acumulación disminuye la utilización de glucosa, aumenta la síntesis y secreción de lipoproteínas VLDL y triglicéridos y deteriora la función  $\beta$  pancreática. Por tanto, además de ser una consecuencia de la resistencia a la insulina, la alteración en la expresión de SREBP1c es en sí misma una causa de ella en determinados contextos fisiopatológicos.

Nuestros resultados confirman la hipótesis inicial y hemos identificado variantes en los genes *SREBF1* e *INSIG2* asociadas con DM2 en población española.

La variante que se ha asociado con un mayor riesgo de DM2 es rs7589375:T, localizada en el gen *INSIG2*, ajustándose principalmente a un modelo recesivo [ $\chi^2= 7,56$ ;  $P=0,0059$ ; odds ratio =0,33;  $P=0,0063$ ]. En el presente trabajo, presentamos evidencias de que el alelo rs7589375-T disminuye la actividad transcripcional del promotor de *INSIG2* dirigiendo la expresión del gen de la luciferasa. Las predicciones informáticas realizadas indican que el alelo T implica la desaparición de un sitio de unión para los factores de transcripción GATA1 y 3.

Resulta atractivo especular que esta disminución en la actividad del promotor en los portadores del alelo rs7589375-T podría implicar una disminución en la expresión de *INSIG2*. Como consecuencia, el complejo SCAP/SREBP no sería retenido eficazmente en el RE, favoreciendo la migración a golgi y el procesamiento de SREBP que liberaría la forma madura que finalmente ejercería su actividad transcripcional.

Se ha propuesto que en hígado SREBP1c es el mediador de la inducción de la glucoquinasa por insulina. Evidentemente, una sobreexpresión de SREBP1c podría explicar desde este punto de vista un aumento en la

utilización de glucosa hepática y un aumento en la sensibilidad a la insulina. No obstante, la sobreactivación paralela de la lipogénesis *de novo* hepática con el consiguiente aumento en la formación y secreción de lipoproteínas VLDL, favorece un mayor flujo de lípidos hacia otros tejidos, que como se ha descrito es un fenómeno temprano en el desarrollo de la DM2. Además, en hígado, la activación de SREBP1c y la acumulación lipídica contribuyen al deterioro en la señalización de insulina a distintos niveles, incluyendo la inhibición de la gluconeogénesis, favoreciendo así un mayor aumento de la glucemia (**figura 47**).

En músculo esquelético, el órgano más importante respecto a la utilización de glucosa inducida por insulina, se ha demostrado que la sobreexpresión de SREBP1c participa en la deposición lipídica implicada en la resistencia a la insulina y en el deterioro en la utilización de glucosa en este tejido.

En el páncreas se ha descrito que la sobreactivación de SREBP1c se relaciona con una menor síntesis y secreción de insulina a través de fenómenos de lipotoxicidad y específicamente sobreexpresando granufilina, como se ha descrito anteriormente. El deterioro de la función  $\beta$  pancreática a largo plazo se traducirá en una reducción en la liberación de insulina y en la manifestación clínica de la hiperglucemia.

Además, SREBP1c participa en la homeostasis del tejido endotelial vascular a través de la inducción de COX2 y la producción de prostaciclina  $I_2$ . En condiciones fisiológicas el tono de la musculatura lisa vascular está finamente regulado por estos y otros factores liberados por las células endoteliales como el óxido nítrico generado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Estos mecanismos están alterados en patologías como la DM2 favoreciendo la hipertensión y el deterioro vascular característicos de esta patología<sup>364</sup>.

Uno de los mecanismos propuestos es el deterioro en la inducción de eNOS debida a la acumulación de ácidos grasos, ceramidas, etc. Además, se ha descrito que la acumulación de fosfolípidos oxidados, característica de lesiones arteroscleróticas y otros entornos con signos de inflamación, provoca una activación de SREBP que a su vez induce sustancias quimiotácticas como interleuquina 8 (IL-8) que favorecen la interacción de monocitos y células endoteliales. Paralelamente la activación de SREBP conllevaría una mayor acumulación lipídica que agravaría el entorno inflamatorio. Por el momento se desconoce la implicación de esta activación de SREBP en el tejido endotelial vascular en patologías humanas pero los resultados obtenidos por distintos grupos sugieren que podría desempeñar

un papel en hipertensión arterial o arterosclerosis, patologías frecuentemente asociadas con resistencia a insulina y DM2.

El análisis univariante del fenotipo de los pacientes con DM2 en función del genotipo para la variante rs7589375 confirma parcialmente esta hipótesis. El alelo T se asocia con un aumento en la presión arterial diastólica ( $P=0,027$ ) y con una disminución en la secreción de insulina cercana a la significación ( $P=0,074$ ), lo cual se podría correlacionar con el fenotipo esperado en una sobreactivación de la ruta SREBP.

Estos resultados son evidentemente muy preliminares pero refuerzan la hipótesis de que SREBP1 podría desempeñar un papel en fenotipos asociados a la resistencia a la insulina como son la hipertensión arterial y arteriosclerosis.

El análisis univariante de rs7589375:T>C indica que este polimorfismo no está asociado a una alteración en IMC en nuestra población, si bien, durante el desarrollo de este trabajo, Herbert y colaboradores, describieron que la variante rs7566605 situada entre los genes *FLJ10996* e *INSIG2*, estaba asociada a IMC y obesidad<sup>341</sup>. La información disponible en el proyecto HapMap indicó que ambas variantes presentan un bajo desequilibrio de ligamiento ( $D' = 0,642$ ;  $r^2 = 0,062$ ) por lo que posiblemente estos resultados deban considerarse independientemente.

La variante IVS1–11delTCC encontrada en el gen *SREBF1*, se asocia con un incremento en el riesgo de desarrollar DM2 utilizando el modelo dominante [odds ratio=2,72 (CI 95% = 1,06-7,0;  $P= 0,029$ )] y con un aumento cercano a la significación en los niveles de VLDL ( $P=0,08$ ). No hemos demostrado que esta delección ocasione ninguna alteración funcional en dicho gen, por lo que podría estar en desequilibrio de ligamiento con otra u otras variantes responsables de esta asociación.

Paralelamente al desarrollo de este trabajo, distintos grupos asociaron variantes del gen *SREBF1* (rs13306736, -36delG UTR1a, rs2297508 y rs11868035) con desórdenes metabólicos como obesidad, DM2 o dislipemias en distintos contextos fisiopatológicos.

En un estudio caso-control en población caucasiana del Reino Unido, el grupo del doctor Stephen O'Rahilly<sup>339</sup> describió que la variante rs11868035 estaba significativamente asociada con DM2 en hombres [odds ratio = 1,42 (CI95%=1,11–1,82,  $P = 0,005$ )] pero no en mujeres [odds ratio = 1,05 (CI95%=0,76–1,47,  $P = 0,748$ )]. En este mismo trabajo se describió que

esta variante estaba asociada con una ligera pero significativa elevación en los niveles de colesterol total y LDL-colesterol tanto en hombres como en mujeres. No se encontró asociación de esta variante con la alteración de otros parámetros estudiados (niveles de glucosa o insulina en ayunas o en un ensayo de sobrecarga oral de glucosa, IMC, triglicéridos, ácidos grasos, índice C/c o presión arterial).

Simultáneamente, en un estudio de asociación realizado en población francesa caucásica, Eberle y colaboradores describieron que el alelo rs2297508-C estaba asociado con obesidad en dos grupos de obesos mórbidos independientes. Además, era menos frecuente en el grupo de pacientes con DM2<sup>338</sup>. En este mismo trabajo se asociaron las variantes 5'UTR1a -150G>A, 5'UTR1a -36delG y rs2297508 con hipertrigliceridemia específicamente en varones.

En nuestro trabajo también hemos incluido estas variantes en los estudios de asociación en población española así como en los análisis funcionales.

Individualmente ninguna de ellas estaba significativamente asociada con la enfermedad, aunque sí al realizar un análisis de haplotipos. De hecho, las variantes rs2297508 y rs11868035 se encuentran muy próximas en el gen *SREBF1* y presentan un elevado desequilibrio de ligamiento ( $D'=0,76-1$ ;  $r^2=0,58-0,87$ ), por lo que los resultados obtenidos por Eberle *et al* respecto a rs2297508 y por Laudes *et al* respecto a rs11868035 no deberían ser considerados independientemente.

En ninguno de estos trabajos se aportan datos referentes al efecto de estas variantes en la expresión o la actividad de SREBP1 por lo que nos propusimos realizar estudios de funcionalidad para evaluar si alguna de ellas era potencialmente capaz de justificar la asociación de distintos haplotipos con DM2 o si simplemente estaban en desequilibrio de ligamiento con otras variantes no identificadas responsables de la asociación.

En las distintas aproximaciones funcionales y predicciones informáticas que hemos realizado, ninguno de los polimorfismos identificados por estos grupos parece alterar la expresión de SREBP1 (**figuras 34, 35 y 38**) por lo que posiblemente su asociación con DM2 se deba a otra variante ligada a ellas.

Algunas variantes descritas en nuestro estudio como la delección 3'UTR+334delTTT localizada en la región 3'UTR de SREBP1c podrían provocar una desregulación de este factor. Esta variante presenta un elevado desequilibrio de ligamiento con las variantes asociadas con la enfermedad (IVS1-11delTCC, rs13306736, -36delG UTR1a, rs2297508 y rs11868035).

En nuestro estudio la variante 3'UTR+334delTTT no se asoció individualmente a DM2 en la población estudiada pero el haplotipo formado por el alelo silvestre y el alelo rs11868035-T se asoció débilmente con una disminución en el riesgo de DM2 respecto al haplotipo formado por el alelo no delecionado y el alelo rs11868035-C (**tabla 11**).

La región 3'UTR de SREBP1 participa en la regulación de este gen por ácidos grasos poliinsaturados en hígado de rata modificando la estabilidad del ARNm. En este mecanismo intervienen las regiones ricas en A-U que también están presentes en la región 3'UTR del mensajero humano. La variante 3'UTR+334delTTT altera una de estas regiones por lo que podría influir en las diferencias interindividuales en la regulación de este factor y/o en la respuesta a componentes de la dieta. De hecho, los estudios de actividad *in vitro* muestran que la construcción 3'UTR+334delTTT posee una mayor actividad basal que la construcción con la secuencia silvestre o la 3'UTR+208delCC (**figura 37**).

En las construcciones utilizadas en estos ensayos, el promotor y las regiones 5' y 3'UTR de SREBP1c controlan la expresión del gen de la luciferasa. Este diseño no permite estudiar efectos a nivel de estabilidad del mensajero del propio gen endógeno pero sí el efecto de las regiones reguladoras. Construcciones similares han sido utilizadas previamente para estudiar el efecto de elementos ricos en A-U presentes en las regiones 3'UTR, sobre la expresión de genes como COX-2<sup>365</sup>, p27<sup>366</sup> o CYP2A6<sup>367</sup>.

Desconocemos si el aumento en la actividad basal refleja diferentes eficiencias de transcripción, traducción o estabilidad del mensajero. Independientemente de ello la importancia fisiopatológica de esta variante no puede ser descartada; de hecho variantes en la región 3'UTR de otros genes humanos se han asociado a distintas patologías<sup>368,369</sup>.

Los ensayos de actividad *in vitro* mostraron que la variante 5'UTR-38G>A identificada en el gen *SREBF1* aumentaba significativamente la expresión de la luciferasa respecto a la secuencia silvestre.

Las regiones UTR regulan la expresión de una proteína modulando la eficiencia de transcripción, de traducción y la estabilidad del ARNm. Se ha demostrado que la estructura secundaria del mensajero tiene un papel importante en estos mecanismos de regulación, y a través de cálculos de estabilidad hemos deducido que dicha variante altera la estructura secundaria predicha para esta región lo cual podría justificar el aumento en la expresión provocada por dicha variante (**figura 41**). No obstante para confirmar este mecanismo serían necesarias otras aproximaciones

experimentales ya que frecuentemente existen distintas poblaciones para cada ARNm y no siempre una aproximación basada en la mínima energía libre predice la estructura secundaria predominante de un ARNm.

La variante 5'UTR-38G>A de SREBP1c se encontró inicialmente en un solo individuo con DM2 en la población estudiada. Sin embargo, en colaboración con el Servicio de Endocrinología y Diabetes del Hospital de Cruces (Barakaldo. Bizkaia) también encontramos esta variante en dos individuos diagnosticados con diabetes tipo MODY en la que no aún no se había identificado el gen responsable.

Las diabetes tipo MODY se asocian a mutaciones en genes individuales que provocan cambios en la estructura y función de proteínas de la célula  $\beta$ . Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de SREBP1c en los mecanismos de secreción de insulina ya que independientemente de su implicación en fenómenos de lipotoxicidad, la sobreexpresión de SREBP1c se ha asociado con un deterioro de la secreción de insulina en distintos modelos experimentales<sup>306</sup>.

El aumento en la expresión de SREBP1c provocado por esta variante podría ser la primera demostración de la participación de estos mecanismos de disfunción  $\beta$  pancreática en patologías humanas. Tras analizar a más miembros de la familia del probando, se comprobó que ninguno de los portadores de esta variante presentaba alteraciones en la glucemia ni en los parámetros bioquímicos de referencia, si bien hay que tener en cuenta que su edad (25-31 años) no es tan elevada como para descartar que puedan desarrollar cuadros dislipémicos o diabetes en un futuro. Esto sugiere que aunque esta variante podría influir sobre el riesgo de DM2 no es responsable de una forma monogénica de diabetes mellitus.

De las dos mutaciones encontradas en SREBP1 (Pro173Leu y Thr202Met), sólo la variante Thr202Met alteraba la actividad transcripcional de la forma madura. Nuestro estudio sugiere que el residuo Thr202 podría ser directamente modificado o que al menos la mutación Thr202Met podría alterar la modificación postraduccional de un residuo cercano provocando la desestabilización de la proteína.

Esta variante fue encontrada en tres individuos de una única familia. Dos de ellos presentaban un cuadro de dislipemia caracterizado principalmente por una elevación de LDLc, acompañado en uno de ellos por una disminución en los niveles de triglicéridos y VLDL. El tercer individuo, una mujer de 22 años, no presentaba alteraciones en la glucemia ni en LDLc pero si una disminución en los niveles VLDL y triglicéridos. Estos fenotipos podrían

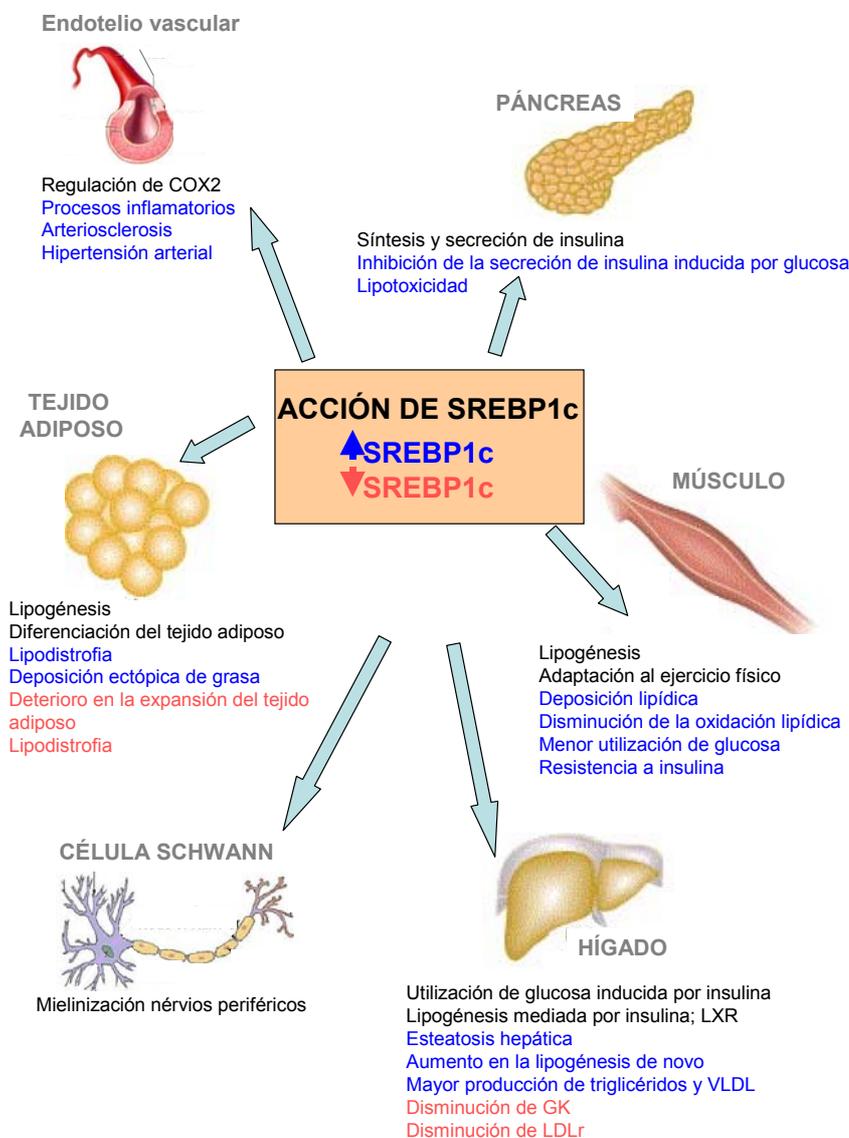
relacionarse con una disminución en la expresión del receptor de LDL y en la lipogénesis *de novo* hepática, debido a una menor actividad de SREBP1. No obstante, aunque la variante Thr202Met altera la estabilidad y función de la proteína su relación causal en el cuadro dislipémico de los portadores no está aclarada.

Es interesante resaltar que la importancia de este resultado no sólo reside en la posible asociación de esta variante con un fenotipo clínico en la familia portadora, sino en la caracterización del papel funcional del residuo Thr202, localizado en una región poco conocida de la proteína y que a la luz de nuestros resultados podría estar implicada en la estabilidad de SREBP1. Trabajos recientes presentan a los factores SREBP como una interesante diana molecular para el tratamiento de alteraciones en el metabolismo glucolipídico por lo que la identificación de los residuos claves en la regulación de la estabilidad/degradación de estos factores podría tener una importante aplicación farmacológica<sup>243</sup>.

Somos conscientes de que nuestro estudio de asociación tiene limitaciones; el número de muestras de casos y controles que hemos podido obtener y analizar es limitado, más aún el número de ellas que están completamente caracterizadas clínicamente. Esto muchas veces limita el poder estadístico de un estudio de asociación y puede llevar a falsos positivos y falsos negativos. Por este motivo, hemos apoyado dicho análisis genético, con estudios funcionales. De hecho, este es el primer trabajo en el que se describen variantes en estos genes con una implicación funcional alterando la expresión, actividad de SREBP1 o INSIG2.

Según la hipótesis emitida por Neel en 1962<sup>370</sup> en la que se introdujo el concepto *Thrifty Genotype* (~genotipo rácano), un aumento en la actividad de SREBP1 podría dar una ventaja evolutiva en el pasado, favoreciendo el balance energético positivo, pero no con un estilo de vida como el actual.

Numerosos trabajos en la bibliografía refuerzan esta hipótesis, ya que la sobreexpresión de SREBP1c se ha asociado con esteatosis hepática, lipodistrofia, enfermedad renal asociada a diabetes, lipotoxicidad en modelos animales de DM2 como los ratones IRS-2<sup>-/-</sup><sup>310</sup> o en líneas celulares de origen pancreático<sup>305</sup> y más recientemente con una disminución específica en la secreción de insulina por células  $\beta$  debido a la inducción de granufilina<sup>306</sup>.



**Figura 47: Representación esquemática de la función fisiológica de SREBP1c en distintos tejidos (negro).** La alteración en la expresión de SREBP1 podría constituir un nexo entre la alteración del metabolismo lipídico y la resistencia a insulina. En azul se describen las consecuencias descritas para una sobreexpresión de SREBP1c y en rojo para una disminución de su expresión.

Reforzando esta hipótesis, las variantes asociadas con DM2 en nuestro estudio son principalmente aquellas que cursan con un aumento en la

actividad de SREBP1 o con una disminución en la expresión de INSIG2 que a su vez ocasionaría una sobreactivación de SREBP1. Para confirmar este efecto sería necesario cuantificar la expresión de INSIG2 y SREBP1 en células  $\beta$  pancreáticas, músculo esquelético, endotelio vascular, hígado o tejido adiposo en portadores de estas variantes, aunque por el momento el material disponible no ha permitido dicho estudio.

Posiblemente el concepto más fácilmente aplicable de la identificación de genes responsables de la DM2 sea que la presencia de variantes genéticas en un individuo pueda influenciar su susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, el pronóstico y/o su respuesta a determinadas terapias, esto es, farmacogenética. Por ejemplo esto se ha descrito en pacientes con MODY resultante de mutaciones en el gen HNF1 $\alpha$  que responden preferentemente al tratamiento con sulfonilureas<sup>371</sup>.

En este trabajo presentamos variantes en el gen *SREBF1* que se asocian con DM2 y/o que alteran la expresión o función de esta proteína, y lo que es más importante, demostramos por primera vez que variantes genéticas en el gen *INSIG2* están fuertemente asociadas con DM2. Además demostramos que los portadores del alelo rs7589375-T en el gen *INSIG2*, tanto diabéticos como controles, presentan un aumento en la presión arterial y una tendencia a la disminución en la insulina basal. Sería interesante estudiar si las variantes presentadas en este trabajo condicionan la respuesta a los tratamientos de rutina utilizados en DM2 o sus complicaciones clínicas asociadas como la hipercolesterolemia o la hipertensión y si son marcadores potencialmente útiles para una mejor utilización de los recursos farmacológicos.

El mecanismo de acción de las estatinas, un grupo de fármacos frecuentemente utilizados para disminuir los niveles de LDL-c, implica inhibición de la HMG CoA reductasa y la activación secundaria de los SREBPs, que a su vez induce la expresión del receptor de LDL favoreciendo la captación de LDL principalmente por el hígado. El efecto de las estatinas sobre el control de la glucemia todavía es discutido. Algunos trabajos sugieren que el tratamiento con estos fármacos podría ejercer un efecto beneficioso debido a la activación de los SREBPs en hígado y tejido adiposo que favorecería la captación de lipoproteínas y la reesterificación de los ácidos grasos, mejorando el cuadro dislipémico generalmente asociado a DM2<sup>372</sup>. Por el contrario, numerosos trabajos ponen en duda el efecto beneficioso de las estatinas sobre los niveles de ácidos grasos libres<sup>373,374</sup>.

---

Además, existen trabajos que describen un marcado deterioro en el control de la glucemia en algunos pacientes con hipercolesterolemia asociada a DM2<sup>375</sup>. En cualquier caso, teniendo en cuenta estas discrepancias, sería muy interesante estudiar si las variantes en *INSIG2* y *SREBF1* presentadas en nuestro trabajo influyen en la variabilidad clínica encontrada en respuesta a estos tratamientos. De hecho, como se ha descrito en la introducción, trabajos anteriores han asociado algunas variantes en *SREBP1* con una distinta respuesta del perfil lipídico a tratamientos con estatinas o con antiretrovirales en determinados contextos fisiopatológicos.

En el caso de la DM2, la identificación y caracterización de nuevos genes implicados en la susceptibilidad a esta enfermedad permite incrementar la escasa información genética disponible para el diagnóstico, tratamiento y prevención de esta enfermedad y, algo no menos importante, conocer como genes específicos interaccionan con la dieta, el ejercicio y otros factores ambientales en el control del metabolismo. Tal vez algún día nuestro conocimiento en la etiología molecular de la DM2 permita diseñar una combinación de dieta, ejercicio físico y farmacoterapia que ayude a prevenir la instauración de la hiperglucemia en cada individuo. Esperamos que nuestra modesta aportación, recogida en este trabajo, pueda contribuir de algún modo a ello.



## **7.CONCLUSIONES**



- 1.- En el presente trabajo se han identificado dieciocho variantes en el gen *SREBF1* en población española, siete de las cuales no habían sido descritas hasta la fecha.
- 2.- La delección intrónica IVS1–11delTCC identificada en dicho gen se asocia con un incremento significativo en el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en la población estudiada.
- 3.- La mutación Thr202Met identificada en el exón 3 de SREBP1c provoca una desestabilización de la proteína y una disminución en su actividad transcripcional.
- 4.- Los individuos portadores de la mutación Thr202Met se caracterizan por una disminución en los niveles de VLDL y/o un aumento en los niveles de LDL, aunque la relación causal de dicha mutación con este cuadro dislipémico no está aclarada.
- 5.- La variante -38 G>A identificada en la región 5'UTR de SREBP1c provoca un aumento significativo de la actividad *in vitro* de dicha región, en un ensayo luciferasa. Dicho efecto podría justificar un aumento en la susceptibilidad de los portadores de esta variante a desarrollar DM2.
- 6.- El alelo T de la variante rs7589375:T>C, situada en la región promotora del gen *INSIG2*, ocasiona una pérdida de actividad de dicho promotor en un ensayo luciferasa.
- 7.- La frecuencia de la variante rs7589375:T>C en la población estudiada es de 21% en pacientes y 28% en controles, asociándose significativamente con una disminución en el riesgo de desarrollar DM2. Esta es la primera descripción del gen *INSIG2* como gen de susceptibilidad para dicha patología.
- 8.- El alelo T de la variante rs7589375:T>C se asocia con una elevación significativa en la presión arterial diastólica y una disminución en los niveles de insulina basal en la población de diabéticos tipo 2 estudiada.



## **8.BIBLIOGRAFÍA**



1. Freeman, H. & Cox, R.D. Type-2 diabetes: A cocktail of genetic discovery. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**, R202-9 (2006).
2. DeFronzo, R.A. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia* **35**, 389-97 (1992).
3. Hamman, R.F. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab Rev* **8**, 287-338 (1992).
4. Kahn, C.R. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* **43**, 1066-84 (1994).
5. Yki-Jarvinen, H. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia* **38**, 1378-88 (1995).
6. Hales, C.N. & Barker, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601 (1992).
7. Aitman, T.J. & Todd, J.A. Molecular genetics of diabetes mellitus. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **9**, 631-56 (1995).
8. Carey, D.G., Jenkins, A.B., Campbell, L.V., Freund, J. & Chisholm, D.J. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes* **45**, 633-8 (1996).
9. Chagnon, Y.C., Perusse, L., Weisnagel, S.J., Rankinen, T. & Bouchard, C. The human obesity gene map: the 1999 update. *Obes Res* **8**, 89-117 (2000).
10. Hales, C.N. & Barker, D.J. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* **60**, 5-20 (2001).
11. Poulsen, P., Vaag, A.A., Kyvik, K.O., Moller Jensen, D. & Beck-Nielsen, H. Low birth weight is associated with NIDDM in discordant monozygotic and dizygotic twin pairs. *Diabetologia* **40**, 439-46 (1997).
12. Beck-Nielsen, H., Vaag, A., Poulsen, P. & Gaster, M. Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects--experiences from relatives and twin studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **17**, 445-67 (2003).
13. Bergman, R.N. Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes* **38**, 1512-27 (1989).

14. Stumvoll, M., Tataranni, P.A., Stefan, N., Vozarova, B. & Bogardus, C. Glucose allostasis. *Diabetes* **52**, 903-9 (2003).
15. Stumvoll, M., Goldstein, B.J. & van Haeften, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* **365**, 1333-46 (2005).
16. Poulsen, P., Kyvik, K.O., Vaag, A. & Beck-Nielsen, H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* **42**, 139-45 (1999).
17. Lehtovirta, M. et al. Insulin sensitivity and insulin secretion in monozygotic and dizygotic twins. *Diabetologia* **43**, 285-93 (2000).
18. Elbein, S.C., Hasstedt, S.J., Wegner, K. & Kahn, S.E. Heritability of pancreatic beta-cell function among nondiabetic members of Caucasian familial type 2 diabetic kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1398-403 (1999).
19. Barroso, I. et al. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* **402**, 880-3 (1999).
20. DeFronzo, R.A. Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes* **28**, 1095-101 (1979).
21. Chen, M., Bergman, R.N., Pacini, G. & Porte, D., Jr. Pathogenesis of age-related glucose intolerance in man: insulin resistance and decreased beta-cell function. *J Clin Endocrinol Metab* **60**, 13-20 (1985).
22. Prigeon, R.L., Kahn, S.E. & Porte, D., Jr. Changes in insulin sensitivity, glucose effectiveness, and B-cell function in regularly exercising subjects. *Metabolism* **44**, 1259-63 (1995).
23. Kahn, S.E. et al. Effect of exercise on insulin action, glucose tolerance, and insulin secretion in aging. *Am J Physiol* **258**, E937-43 (1990).
24. Chen, M., Halter, J.B. & Porte, D., Jr. The role of dietary carbohydrate in the decreased glucose tolerance of the elderly. *J Am Geriatr Soc* **35**, 417-24 (1987).
25. Beard, J.C., Halter, J.B., Best, J.D., Pfeifer, M.A. & Porte, D., Jr. Dexamethasone-induced insulin resistance enhances B cell responsiveness to glucose level in normal men. *Am J Physiol* **247**, E592-6 (1984).
26. Rizza, R.A., Mandarino, L.J. & Gerich, J.E. Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and

- stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. *J Clin Endocrinol Metab* **54**, 131-8 (1982).
27. Kahn, S.E. et al. Increased beta-cell secretory capacity as mechanism for islet adaptation to nicotinic acid-induced insulin resistance. *Diabetes* **38**, 562-8 (1989).
  28. Olefsky, J., Farquhar, J.W. & Reaven, G. Relationship between fasting plasma insulin level and resistance to insulin-mediated glucose uptake in normal and diabetic subjects. *Diabetes* **22**, 507-13 (1973).
  29. Beard, J.C., Ward, W.K., Halter, J.B., Wallum, B.J. & Porte, D., Jr. Relationship of islet function to insulin action in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **65**, 59-64 (1987).
  30. Kolterman, O.G., Insel, J., Saekow, M. & Olefsky, J.M. Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects. *J Clin Invest* **65**, 1272-84 (1980).
  31. Lillioja, S. & Bogardus, C. Obesity and insulin resistance: lessons learned from the Pima Indians. *Diabetes Metab Rev* **4**, 517-40 (1988).
  32. Bjorntorp, P. Visceral obesity: a "civilization syndrome". *Obes Res* **1**, 206-22 (1993).
  33. Peiris, A.N., Mueller, R.A., Smith, G.A., Struve, M.F. & Kissebah, A.H. Splanchnic insulin metabolism in obesity. Influence of body fat distribution. *J Clin Invest* **78**, 1648-57 (1986).
  34. Bjorntorp, P. Regional obesity and NIDDM. *Adv Exp Med Biol* **334**, 279-85 (1993).
  35. Pouliot, M.C. et al. Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* **41**, 826-34 (1992).
  36. Peiris, A.N. et al. Relative contribution of obesity and body fat distribution to alterations in glucose insulin homeostasis: predictive values of selected indices in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* **49**, 758-64 (1989).
  37. Fujimoto, W.Y., Abbate, S.L., Kahn, S.E., Hokanson, J.E. & Brunzell, J.D. The visceral adiposity syndrome in Japanese-American men. *Obes Res* **2**, 364-71 (1994).
  38. Abate, N., Garg, A., Peshock, R.M., Stray-Gundersen, J. & Grundy, S.M. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest* **96**, 88-98 (1995).

39. Goodpaster, B.H., Kelley, D.E., Wing, R.R., Meier, A. & Thaete, F.L. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* **48**, 839-47 (1999).
40. Cnop, M. et al. The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations : distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes* **51**, 1005-15 (2002).
41. Dinneen, S., Gerich, J. & Rizza, R. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **327**, 707-13 (1992).
42. Kido, Y., Nakae, J. & Accili, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 972-9 (2001).
43. Zick, Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol* **11**, 437-41 (2001).
44. Zhande, R., Mitchell, J.J., Wu, J. & Sun, X.J. Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol Cell Biol* **22**, 1016-26 (2002).
45. Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S. & White, M.F. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* **277**, 42394-8 (2002).
46. Brancati, F.L., Wang, N.Y., Mead, L.A., Liang, K.Y. & Klag, M.J. Body weight patterns from 20 to 49 years of age and subsequent risk for diabetes mellitus: the Johns Hopkins Precursors Study. *Arch Intern Med* **159**, 957-63 (1999).
47. Danforth, E., Jr. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nat Genet* **26**, 13 (2000).
48. Machann, J., Haring, H., Schick, F. & Stumvoll, M. Intramyocellular lipids and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* **6**, 239-48 (2004).
49. Seppala-Lindroos, A. et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 3023-8 (2002).
50. Bajaj, M. & DeFronzo, R.A. Metabolic and molecular basis of insulin resistance. *J Nucl Cardiol* **10**, 311-23 (2003).
51. Tomas, E. et al. Hyperglycemia and insulin resistance: possible mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* **967**, 43-51 (2002).

52. Ruderman, N.B. et al. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes. *Biochem Soc Trans* **31**, 202-6 (2003).
53. Kahn, B.B. & Flier, J.S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, 473-81 (2000).
54. Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* **46**, 3-10 (1997).
55. Mora, S. & Pessin, J.E. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 345-56 (2002).
56. Rajala, M.W. & Scherer, P.E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**, 3765-73 (2003).
57. Ravussin, E. & Smith, S.R. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* **967**, 363-78 (2002).
58. Senn, J.J. et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* **278**, 13740-6 (2003).
59. Krebs, D.L. & Hilton, D.J. A new role for SOCS in insulin action. Suppressor of cytokine signaling. *Sci STKE* **2003**, PE6 (2003).
60. Goldstein, B.J. & Scalia, R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2563-8 (2004).
61. Bastard, J.P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* **17**, 4-12 (2006).
62. Samad, F. et al. Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6902-7 (1999).
63. Friedman, J.M. Obesity in the new millennium. *Nature* **404**, 632-4 (2000).
64. Muoio, D.M., Dohm, G.L., Fiedorek, F.T., Jr., Tapscott, E.B. & Coleman, R.A. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* **46**, 1360-3 (1997).

65. Shimabukuro, M. et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4637-41 (1997).
66. Havel, P.J. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* **13**, 51-9 (2002).
67. Wellen, K.E. & Hotamisligil, G.S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**, 1785-8 (2003).
68. Perseghin, G., Ghosh, S., Gerow, K. & Shulman, G.I. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. *Diabetes* **46**, 1001-9 (1997).
69. Reaven, G.M. & Chen, Y.D. Role of abnormal free fatty acid metabolism in the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* **85**, 106-12 (1988).
70. Roden, M. et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* **97**, 2859-65 (1996).
71. Dresner, A. et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* **103**, 253-9 (1999).
72. Randle, P.J., Garland, P.B., Newsholme, E.A. & Hales, C.N. The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* **131**, 324-33 (1965).
73. Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J.V. & Rossetti, L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* **93**, 2438-46 (1994).
74. Griffin, M.E. et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* **48**, 1270-4 (1999).
75. Kim, J.K. et al. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **114**, 823-7 (2004).
76. Previs, S.F., Withers, D.J., Ren, J.M., White, M.F. & Shulman, G.I. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem* **275**, 38990-4 (2000).
77. Samuel, V.T. et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* **279**, 32345-53 (2004).

78. Neschen, S. et al. Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. *Cell Metab* **2**, 55-65 (2005).
79. Kim, J.K. et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* **108**, 437-46 (2001).
80. Yuan, M. et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293**, 1673-7 (2001).
81. Yin, M.J., Yamamoto, Y. & Gaynor, R.B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**, 77-80 (1998).
82. Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E. & Ridker, P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* **286**, 327-34 (2001).
83. Schmidt, M.I. et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* **353**, 1649-52 (1999).
84. Barzilay, J.I. et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes* **50**, 2384-9 (2001).
85. Freeman, D.J. et al. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* **51**, 1596-600 (2002).
86. Lindsay, R.S., Krakoff, J., Hanson, R.L., Bennett, P.H. & Knowler, W.C. Gamma globulin levels predict type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Diabetes* **50**, 1598-603 (2001).
87. Vozarova, B. et al. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 455-61 (2002).
88. Shoelson, S.E., Lee, J. & Yuan, M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**, S49-52 (2003).
89. Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V. & Ritov, V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944-50 (2002).

90. Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R. & Shulman, G.I. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* **350**, 664-71 (2004).
91. Patti, M.E. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8466-71 (2003).
92. Mootha, V.K. et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**, 267-73 (2003).
93. Jenkins, A.B. & Campbell, L.V. The genetics and pathophysiology of diabetes mellitus type II. *J Inherit Metab Dis* **27**, 331-47 (2004).
94. Kahn, S.E. et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* **42**, 1663-72 (1993).
95. Ward, W.K., Beard, J.C., Halter, J.B., Pfeifer, M.A. & Porte, D., Jr. Pathophysiology of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* **7**, 491-502 (1984).
96. Ward, W.K., Bolgiano, D.C., McKnight, B., Halter, J.B. & Porte, D., Jr. Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* **74**, 1318-28 (1984).
97. Mittelman, S.D. et al. Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response. *Diabetes* **49**, 2116-25 (2000).
98. Gerich, J.E. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* **19**, 491-503 (1998).
99. Bonadonna, R.C. et al. Altered homeostatic adaptation of first- and second-phase beta-cell secretion in the offspring of patients with type 2 diabetes: studies with a minimal model to assess beta-cell function. *Diabetes* **52**, 470-80 (2003).
100. Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D.M. & Pratley, R.E. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* **104**, 787-94 (1999).

101. Perley, M.J. & Kipnis, D.M. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* **46**, 1954-62 (1967).
102. Bagdade, J.D., Bierman, E.L. & Porte, D., Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest* **46**, 1549-57 (1967).
103. Brunzell, J.D. et al. Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab* **42**, 222-9 (1976).
104. Halter, J.B. & Porte, D., Jr. Mechanisms of impaired acute insulin release in adult onset diabetes: studies with isoproterenol and secretin. *J Clin Endocrinol Metab* **46**, 952-60 (1978).
105. Varsano-Aharon, N., Echemendia, E., Yalow, R.S. & Berson, S.A. Early insulin responses to glucose and to tolbutamide in maturity-onset diabetes. *Metabolism* **19**, 409-17 (1970).
106. Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Tanaka, Y. & Takahashi, H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* **52**, 581-7 (2003).
107. Yki-Jarvinen, H. Glucose toxicity. *Endocr Rev* **13**, 415-31 (1992).
108. Wallace, T.M. & Matthews, D.R. Coefficient of failure: a methodology for examining longitudinal beta-cell function in Type 2 diabetes. *Diabet Med* **19**, 465-9 (2002).
109. McGarry, J.D. & Dobbins, R.L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* **42**, 128-38 (1999).
110. Unger, R.H. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 398-403 (2003).
111. Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O. & Poitout, V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S119-24 (2004).
112. Janson, J., Ashley, R.H., Harrison, D., McIntyre, S. & Butler, P.C. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* **48**, 491-8 (1999).
113. Hull, R.L., Westermark, G.T., Westermark, P. & Kahn, S.E. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3629-43 (2004).

114. Gottlieb, M.S. Diabetes in offspring and siblings of juvenile- and maturity-onset-type diabetics. *J Chronic Dis* **33**, 331-9 (1980).
115. Zimmet, P. et al. Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in the biracial (Melanesian and Indian) population of Fiji: a rural-urban comparison. *Am J Epidemiol* **118**, 673-88 (1983).
116. Knowler, W.C., Pettitt, D.J., Saad, M.F. & Bennett, P.H. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Rev* **6**, 1-27 (1990).
117. Barnett, A.H., Eff, C., Leslie, R.D. & Pyke, D.A. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* **20**, 87-93 (1981).
118. Newman, B. et al. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* **30**, 763-8 (1987).
119. Florez, J.C., Hirschhorn, J. & Altshuler, D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **4**, 257-91 (2003).
120. Harris, M.I., Eastman, R.C., Cowie, C.C., Flegal, K.M. & Eberhardt, M.S. Racial and ethnic differences in glycemic control of adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **22**, 403-8 (1999).
121. O'Rahilly, S., Barroso, I. & Wareham, N.J. Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning? *Science* **307**, 370-3 (2005).
122. McCarthy, M.I. Growing evidence for diabetes susceptibility genes from genome scan data. *Curr Diab Rep* **3**, 159-67 (2003).
123. Hansen, L. & Pedersen, O. Genetics of type 2 diabetes mellitus: status and perspectives. *Diabetes Obes Metab* **7**, 122-35 (2005).
124. Hara, K. et al. Hepatocyte nuclear factor-4alpha P2 promoter haplotypes are associated with type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* **55**, 1260-4 (2006).
125. Damcott, C.M. et al. Polymorphisms in both promoters of hepatocyte nuclear factor 4-alpha are associated with type 2 diabetes in the Amish. *Diabetes* **53**, 3337-41 (2004).
126. Grant, S.F. et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* **38**, 320-3 (2006).
127. Cox, N.J., Hayes, M.G., Roe, C.A., Tsuchiya, T. & Bell, G.I. Linkage of calpain 10 to type 2 diabetes: the biological rationale. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S19-25 (2004).

128. Altshuler, D. et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* **26**, 76-80 (2000).
129. Baier, L.J. et al. A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, R69-73 (2000).
130. Sreenan, S.K. et al. Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes* **50**, 2013-20 (2001).
131. Tripathy, D. et al. Parallel manifestation of insulin resistance and beta cell decompensation is compatible with a common defect in Type 2 diabetes. *Diabetologia* **47**, 782-93 (2004).
132. Meyre, D. et al. Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat Genet* **37**, 863-7 (2005).
133. Bacci, S. et al. The K121Q polymorphism of the ENPP1/PC-1 gene is associated with insulin resistance/atherogenic phenotypes, including earlier onset of type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes* **54**, 3021-5 (2005).
134. Abate, N. et al. ENPP1/PC-1 K121Q polymorphism and genetic susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 1207-13 (2005).
135. Abate, N. et al. Genetic polymorphism PC-1 K121Q and ethnic susceptibility to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5927-34 (2003).
136. Pizzuti, A. et al. A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* **48**, 1881-4 (1999).
137. Keshavarz, P. et al. No evidence for association of the ENPP1 (PC-1) K121Q variant with risk of type 2 diabetes in a Japanese population. *J Hum Genet* **51**, 559-66 (2006).
138. Kubaszek, A. et al. The association of the K121Q polymorphism of the plasma cell glycoprotein-1 gene with type 2 diabetes and hypertension depends on size at birth. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2044-7 (2004).
139. Gu, H.F. et al. Association between the human glycoprotein PC-1 gene and elevated glucose and insulin levels in a paired-sibling analysis. *Diabetes* **49**, 1601-3 (2000).

140. Rasmussen, S.K. et al. The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. *Diabetes* **49**, 1608-11 (2000).
141. Olefsky, J.M. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest* **106**, 467-72 (2000).
142. Olefsky, J.M. & Saltiel, A.R. PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 362-8 (2000).
143. Schoonjans, K. & Auwerx, J. Thiazolidinediones: an update. *Lancet* **355**, 1008-10 (2000).
144. Auwerx, J. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* **42**, 1033-49 (1999).
145. Parikh, H. & Groop, L. Candidate genes for type 2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* **5**, 151-76 (2004).
146. Lohmueller, K.E., Pearce, C.L., Pike, M., Lander, E.S. & Hirschhorn, J.N. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* **33**, 177-82 (2003).
147. Memisoglu, A. et al. Prospective study of the association between the proline to alanine codon 12 polymorphism in the PPARgamma gene and type 2 diabetes. *Diabetes Care* **26**, 2915-7 (2003).
148. Deeb, S.S. et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* **20**, 284-7 (1998).
149. Ek, J. et al. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant caucasians. *Diabetologia* **44**, 1170-6 (2001).
150. Muller, Y.L., Bogardus, C., Beamer, B.A., Shuldiner, A.R. & Baier, L.J. A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* **52**, 1864-71 (2003).
151. Gloyn, A.L. et al. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 568-72 (2003).

152. Florez, J.C. et al. Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes* **53**, 1360-8 (2004).
153. Porzio, O. et al. The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* **104**, 357-64 (1999).
154. Stumvoll, M. et al. The Gly972Arg polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene contributes to the variation in insulin secretion in normal glucose-tolerant humans. *Diabetes* **50**, 882-5 (2001).
155. Ek, J. et al. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* **44**, 2220-6 (2001).
156. Huxtable, S.J. et al. Analysis of parent-offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally transmitted class III variable number tandem repeat alleles. *Diabetes* **49**, 126-30 (2000).
157. Ong, K.K. et al. The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *Nat Genet* **21**, 262-3 (1999).
158. O'Rahilly, S. Insights into obesity and insulin resistance from the study of extreme human phenotypes. *Eur J Endocrinol* **147**, 435-41 (2002).
159. Barroso, I. et al. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol* **1**, E20 (2003).
160. Love-Gregory, L. et al. E23K single nucleotide polymorphism in the islet ATP-sensitive potassium channel gene (Kir6.2) contributes as much to the risk of Type II diabetes in Caucasians as the PPARgamma Pro12Ala variant. *Diabetologia* **46**, 136-7 (2003).
161. Silander, K. et al. Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 1141-9 (2004).
162. Zhu, Q. et al. T130I mutation in HNF-4alpha gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia* **46**, 567-73 (2003).
163. Love-Gregory, L.D. et al. A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to

- contribute to the evidence for linkage in an ashkenazi jewish population. *Diabetes* **53**, 1134-40 (2004).
164. Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A. & Spiegelman, B.M. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* **13**, 4753-9 (1993).
  165. Yokoyama, C. et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**, 187-97 (1993).
  166. Shimano, H. et al. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* **99**, 846-54 (1997).
  167. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331-40 (1997).
  168. Goldstein, J.L., Rawson, R.B. & Brown, M.S. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys* **397**, 139-48 (2002).
  169. Horton, J.D., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**, 491-8 (2002).
  170. Deng, X. et al. Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 256-62 (2002).
  171. Amemiya-Kudo, M. et al. Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J Biol Chem* **275**, 31078-85 (2000).
  172. Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. 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**, 838-45 (1997).
  173. Horton, J.D., Bashmakov, Y., Shimomura, I. & Shimano, H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5987-92 (1998).
  174. Kim, J.B. et al. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* **101**, 1-9 (1998).

175. Bizeau, M.E., MacLean, P.S., Johnson, G.C. & Wei, Y. Skeletal muscle sterol regulatory element binding protein-1c decreases with food deprivation and increases with feeding in rats. *J Nutr* **133**, 1787-92 (2003).
176. Commerford, S.R., Peng, L., Dube, J.J. & O'Doherty, R.M. In vivo regulation of SREBP-1c in skeletal muscle: effects of nutritional status, glucose, insulin, and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R218-27 (2004).
177. Foretz, M. et al. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* **19**, 3760-8 (1999).
178. Shimomura, I. et al. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13656-61 (1999).
179. Ducluzeau, P.H. et al. Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* **50**, 1134-42 (2001).
180. Sewter, C. et al. Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes* **51**, 1035-41 (2002).
181. Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P. & Foufelle, F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12737-42 (1999).
182. Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 85-96 (2006).
183. Azzout-Marniche, D. et al. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J* **350 Pt 2**, 389-93 (2000).
184. Fleischmann, M. & Iynedjian, P.B. Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J* **349**, 13-7 (2000).
185. Ribaux, P.G. & Iynedjian, P.B. Analysis of the role of protein kinase B (cAKT) in insulin-dependent induction of glucokinase and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) mRNAs in hepatocytes. *Biochem J* **376**, 697-705 (2003).

186. Matsumoto, M. et al. PKC $\lambda$  in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J Clin Invest* **112**, 935-44 (2003).
187. Nadeau, K.J., Leitner, J.W., Gurerich, I. & Draznin, B. Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes. *J Biol Chem* **279**, 34380-7 (2004).
188. Kotzka, J. et al. Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J Lipid Res* **41**, 99-108 (2000).
189. Lehmann, J.M. et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* **272**, 3137-40 (1997).
190. Janowski, B.A. et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 266-71 (1999).
191. Repa, J.J. et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Genes Dev* **14**, 2819-30 (2000).
192. Yoshikawa, T. et al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol* **21**, 2991-3000 (2001).
193. Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11245-50 (2004).
194. Tobin, K.A. et al. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* **277**, 10691-7 (2002).
195. Yoshikawa, T. et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* **277**, 1705-11 (2002).
196. Lin, J. et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 $\beta$  coactivation of SREBP. *Cell* **120**, 261-73 (2005).
197. Hastay, A.H. et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *J Biol Chem* **275**, 31069-77 (2000).

198. Guillet-Deniau, I. et al. Glucose induces de novo lipogenesis in rat muscle satellite cells through a sterol-regulatory-element-binding-protein-1c-dependent pathway. *J Cell Sci* **117**, 1937-44 (2004).
199. Matsuzaka, T. et al. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes* **53**, 560-9 (2004).
200. Scott, D.K. et al. A modest glucokinase overexpression in the liver promotes fed expression levels of glycolytic and lipogenic enzyme genes in the fasted state without altering SREBP-1c expression. *Mol Cell Biochem* **254**, 327-37 (2003).
201. Heemers, H. et al. Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol* **15**, 1817-28 (2001).
202. Heemers, H. et al. Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo. *Mol Cell Endocrinol* **205**, 21-31 (2003).
203. Lacasa, D., Le Liepvre, X., Ferre, P. & Dugail, I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem* **276**, 11512-6 (2001).
204. Zhou, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**, 1167-74 (2001).
205. Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferre, P. & Foufelle, F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **273**, 14767-71 (1998).
206. Zhang, C., Shin, D.J. & Osborne, T.F. A simple promoter containing two Sp1 sites controls the expression of sterol-regulatory-element-binding protein 1a (SREBP-1a). *Biochem J* **386**, 161-8 (2005).
207. Sato, R. et al. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* **271**, 26461-4 (1996).
208. Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* **87**, 415-26 (1996).

209. Nohturfft, A., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem* **273**, 17243-50 (1998).
210. Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. & Smith, T.F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300 (1994).
211. Espenshade, P.J., Cheng, D., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* **274**, 22795-804 (1999).
212. Rawson, R.B. et al. Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell* **1**, 47-57 (1997).
213. Duncan, E.A., Dave, U.P., Sakai, J., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem* **273**, 17801-9 (1998).
214. Lee, S.J. et al. The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* **302**, 1571-5 (2003).
215. Lee, S.J. et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the importin-beta-SREBP-2 complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 1866-8 (2003).
216. Nagoshi, E. & Yoneda, Y. Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta. *Mol Cell Biol* **21**, 2779-89 (2001).
217. Nagoshi, E., Imamoto, N., Sato, R. & Yoneda, Y. Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol Biol Cell* **10**, 2221-33 (1999).
218. Kim, J.B. et al. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol* **15**, 2582-8 (1995).
219. Magana, M.M. & Osborne, T.F. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem* **271**, 32689-94 (1996).

220. Edwards, P.A. & Ericsson, J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem* **68**, 157-85 (1999).
221. Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B. & Goldstein, J.L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**, 391-8 (2000).
222. Sheng, Z., Otani, H., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 935-8 (1995).
223. Hegarty, B.D. et al. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 791-6 (2005).
224. Mourrieras, F. et al. 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 (1997).
225. Yahagi, N. et al. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **274**, 35840-4 (1999).
226. Yang, T. et al. 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**, 489-500 (2002).
227. Yabe, D., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12753-8 (2002).
228. Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3155-60 (2003).
229. Feramisco, J.D., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis. *J Biol Chem* **279**, 8487-96 (2004).
230. Luong, A., Hannah, V.C., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* **275**, 26458-66 (2000).

231. Janowski, B.A. The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12675-80 (2002).
232. Horton, J.D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* **30**, 1091-5 (2002).
233. Engelking, L.J. et al. Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J Clin Invest* **113**, 1168-75 (2004).
234. Takaishi, K., Duplomb, L., Wang, M.Y., Li, J. & Unger, R.H. Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7106-11 (2004).
235. Roth, G. et al. MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *J Biol Chem* **275**, 33302-7 (2000).
236. Kotzka, J. et al. Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem* **279**, 22404-11 (2004).
237. Wang, D. & Sul, H.S. Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt. *J Biol Chem* **273**, 25420-6 (1998).
238. Iynedjian, P.B., Roth, R.A., Fleischmann, M. & Gjinovci, A. Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. *Biochem J* **351 Pt 3**, 621-7 (2000).
239. Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P. & Foufelle, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**, 839-48 (2004).
240. Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M. & Sato, R. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **276**, 36431-7 (2001).
241. Hampton, R.Y. Proteolysis and sterol regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 345-78 (2002).

242. Sundqvist, A. & Ericsson, J. Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13833-8 (2003).
243. Sundqvist, A. et al. Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab* **1**, 379-91 (2005).
244. Bengoechea-Alonso, M.T., Punga, T. & Ericsson, J. Hyperphosphorylation regulates the activity of SREBP1 during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11681-6 (2005).
245. Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M. & Sato, R. Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J Biol Chem* **278**, 16809-19 (2003).
246. Giandomenico, V., Simonsson, M., Gronroos, E. & Ericsson, J. Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol* **23**, 2587-99 (2003).
247. Jackson, S.M., Ericsson, J. & Edwards, P.A. Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Subcell Biochem* **28**, 1-21 (1997).
248. Sanchez, H.B., Yieh, L. & Osborne, T.F. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* **270**, 1161-9 (1995).
249. Dooley, K.A., Millinder, S. & Osborne, T.F. Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y. *J Biol Chem* **273**, 1349-56 (1998).
250. Dooley, K.A., Bennett, M.K. & Osborne, T.F. A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a Co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase promoter. *J Biol Chem* **274**, 5285-91 (1999).
251. Magana, M.M., Koo, S.H., Towle, H.C. & Osborne, T.F. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J Biol Chem* **275**, 4726-33 (2000).

252. Oliner, J.D., Andresen, J.M., Hansen, S.K., Zhou, S. & Tjian, R. SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev* **10**, 2903-11 (1996).
253. Ericsson, J. & Edwards, P.A. CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem* **273**, 17865-70 (1998).
254. Naar, A.M. et al. Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature* **398**, 828-32 (1999).
255. Naar, A.M. et al. Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* **12**, 3020-31 (1998).
256. Lee, Y.S. et al. Twist2, a novel ADD1/SREBP1c interacting protein, represses the transcriptional activity of ADD1/SREBP1c. *Nucleic Acids Res* **31**, 7165-74 (2003).
257. Najima, Y. et al. High mobility group protein-B1 interacts with sterol regulatory element-binding proteins to enhance their DNA binding. *J Biol Chem* **280**, 27523-32 (2005).
258. Nestel, P.J. Effects of N-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* **10**, 149-67 (1990).
259. Podolin, D.A., Gayles, E.C., Wei, Y., Thresher, J.S. & Pagliassotti, M.J. Menhaden oil prevents but does not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol* **274**, R840-8 (1998).
260. Xu, J., Teran-Garcia, M., Park, J.H., Nakamura, M.T. & Clarke, S.D. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* **276**, 9800-7 (2001).
261. Dentin, R. et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* **115**, 2843-54 (2005).
262. Sakakura, Y. et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 176-83 (2001).
263. Flier, J.S. & Hollenberg, A.N. ADD-1 provides major new insight into the mechanism of insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14191-2 (1999).
264. Becard, D. et al. 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**, 2425-30 (2001).
265. Moon, Y.A., Shah, N.A., Mohapatra, S., Warrington, J.A. & Horton, J.D. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* **276**, 45358-66 (2001).
266. Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B.S., Bashmakov, Y. & Horton, J.D. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* **273**, 35299-306 (1998).
267. Shimano, H. et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* **274**, 35832-9 (1999).
268. Edwards, P.A., Tabor, D., Kast, H.R. & Venkateswaran, A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 103-13 (2000).
269. Ericsson, J., Jackson, S.M., Kim, J.B., Spiegelman, B.M. & Edwards, P.A. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem* **272**, 7298-305 (1997).
270. Liang, G. et al. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* **277**, 9520-8 (2002).
271. Steffensen, K.R. & Gustafsson, J.A. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* **53 Suppl 1**, S36-42 (2004).
272. Peet, D.J. et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**, 693-704 (1998).
273. Streicher, R. et al. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* **271**, 7128-33 (1996).
274. Costet, P. et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* **281**, 6211-8 (2006).

275. Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M. & Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4333-7 (1998).
276. Fajas, L. et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**, 5495-503 (1999).
277. Im, S.S. et al. Regulation of GLUT4 gene expression by SREBP-1c in adipocytes. *Biochem J* **399**, 131-9 (2006).
278. Boizard, M. et al. Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *J Biol Chem* **273**, 29164-71 (1998).
279. Shimano, H. et al. Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* **100**, 2115-24 (1997).
280. Horton, J.D., Shimomura, I., Ikemoto, S., Bashmakov, Y. & Hammer, R.E. Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. *J Biol Chem* **278**, 36652-60 (2003).
281. Bergman, B.C. et al. Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. *Am J Physiol* **276**, E106-17 (1999).
282. Malenfant, P. et al. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, 1316-21 (2001).
283. Malenfant, P. et al. Elevated intramyocellular lipid concentration in obese subjects is not reduced after diet and exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E632-9 (2001).
284. Oakes, N.D. et al. Diet-induced muscle insulin resistance in rats is ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise: parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. *Diabetes* **46**, 2022-8 (1997).
285. Stannard, S.R. et al. Fasting for 72 h increases intramyocellular lipid content in nondiabetic, physically fit men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E1185-91 (2002).
286. Starling, R.D. et al. Effects of diet on muscle triglyceride and endurance performance. *J Appl Physiol* **82**, 1185-9 (1997).

287. Ikeda, S. et al. Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 395-400 (2002).
288. Guillet-Deniau, I. et al. 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**, 1722-8 (2002).
289. Camacho, M., Lopez-Belmonte, J. & Vila, L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res* **83**, 353-65 (1998).
290. Creminon, C. et al. Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical vein endothelial cells using specific immunometric enzyme immunoassays. *Biochim Biophys Acta* **1254**, 341-8 (1995).
291. Tyroler, H.A. Total serum cholesterol and ischemic heart disease risk in clinical trials and observational studies. *Am J Prev Med* **1**, 18-24 (1985).
292. Smith, L.H., Petrie, M.S., Morrow, J.D., Oates, J.A. & Vaughan, D.E. The sterol response element binding protein regulates cyclooxygenase-2 gene expression in endothelial cells. *J Lipid Res* **46**, 862-71 (2005).
293. Yao, M. et al. Activation of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) is critical in IL-8-induced angiogenesis. *J Leukoc Biol* **80**, 608-20 (2006).
294. Gharavi, N.M. et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in the regulation of SREBP activation by oxidized phospholipids. *Circ Res* **98**, 768-76 (2006).
295. Yeh, M. et al. Role for sterol regulatory element-binding protein in activation of endothelial cells by phospholipid oxidation products. *Circ Res* **95**, 780-8 (2004).
296. Siwik, D.A. & Colucci, W.S. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev* **9**, 43-51 (2004).
297. Zhu, C. et al. Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem* **90**, 462-71 (2004).

298. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. & Freeman, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**, 4244-50 (1991).
299. Mirsky, R. et al. Regulation of genes involved in Schwann cell development and differentiation. *Prog Brain Res* **132**, 3-11 (2001).
300. Leblanc, S.E. et al. Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* **93**, 737-48 (2005).
301. Warner, L.E., Svaren, J., Milbrandt, J. & Lupski, J.R. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* **8**, 1245-51 (1999).
302. Young, P. & Suter, U. Disease mechanisms and potential therapeutic strategies in Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res Brain Res Rev* **36**, 213-21 (2001).
303. Zitzer, H. et al. Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* **147**, 3898-905 (2006).
304. Takahashi, A. et al. Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **54**, 492-9 (2005).
305. Wang, H., Kouri, G. & Wollheim, C.B. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity. *J Cell Sci* **118**, 3905-15 (2005).
306. Kato, T. et al. Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice. *Cell Metab* **4**, 143-54 (2006).
307. Weir, G.C. & Bonner-Weir, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S16-21 (2004).
308. Shimomura, I., Bashmakov, Y. & Horton, J.D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* **274**, 30028-32 (1999).
309. Shimomura, I. et al. 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**, 77-86 (2000).

310. Ide, T. et al. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol* **6**, 351-7 (2004).
311. Koo, S.H. & Montminy, M. Fatty acids and insulin resistance: a perfect storm. *Mol Cell* **21**, 449-50 (2006).
312. Lewis, G.F., Uffelman, K.D., Szeto, L.W. & Steiner, G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes* **42**, 833-42 (1993).
313. Malmstrom, R. et al. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* **40**, 454-62 (1997).
314. Lewis, G.F. Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol* **8**, 146-53 (1997).
315. Havel, R.J., Kane, J.P., Balasse, E.O., Segel, N. & Basso, L.V. Splanchnic metabolism of free fatty acids and production of triglycerides of very low density lipoproteins in normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic humans. *J Clin Invest* **49**, 2017-35 (1970).
316. Barter, P.J. & Nestel, P.J. Precursors of plasma triglyceride fatty acids in obesity. *Metabolism* **22**, 779-83 (1973).
317. Diraison, F. & Beylot, M. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. *Am J Physiol* **274**, E321-7 (1998).
318. Parks, E.J., Krauss, R.M., Christiansen, M.P., Neese, R.A. & Hellerstein, M.K. Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production, and clearance. *J Clin Invest* **104**, 1087-96 (1999).
319. Schwarz, J.M., Neese, R.A., Turner, S., Dare, D. & Hellerstein, M.K. Short-term alterations in carbohydrate energy intake in humans. Striking effects on hepatic glucose production, de novo lipogenesis, lipolysis, and whole-body fuel selection. *J Clin Invest* **96**, 2735-43 (1995).
320. Gibbons, G.F. & Wiggins, D. The enzymology of hepatic very-low-density lipoprotein assembly. *Biochem Soc Trans* **23**, 495-500 (1995).
321. McGarry, J.D. Malonyl-CoA and carnitine palmitoyltransferase I: an expanding partnership. *Biochem Soc Trans* **23**, 481-5 (1995).
322. McGarry, J.D. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system: its broadening role in fuel homeostasis and new insights into its molecular features. *Biochem Soc Trans* **23**, 321-4 (1995).

323. Nadler, S.T. et al. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11371-6 (2000).
324. Soukas, A., Cohen, P., Socci, N.D. & Friedman, J.M. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* **14**, 963-80 (2000).
325. Kolehmainen, M., Vidal, H., Alhava, E. & Uusitupa, M.I. Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity. *Obes Res* **9**, 706-12 (2001).
326. Diraison, F., Dusserre, E., Vidal, H., Sothier, M. & Beylot, M. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E46-51 (2002).
327. Oberkofler, H., Fukushima, N., Esterbauer, H., Krempler, F. & Patsch, W. Sterol regulatory element binding proteins: relationship of adipose tissue gene expression with obesity in humans. *Biochim Biophys Acta* **1575**, 75-81 (2002).
328. Lawler, J.F., Jr., Yin, M., Diehl, A.M., Roberts, E. & Chatterjee, S. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the maturation of sterol regulatory element binding protein-1 in human hepatocytes through the action of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **273**, 5053-9 (1998).
329. Yang, X. et al. Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 1045-51 (2004).
330. Hua, X., Wu, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. & Hobbs, H.H. 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**, 667-73 (1995).
331. Kissebah, A.H. et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14478-83 (2000).
332. Wu, X. et al. A combined analysis of genomewide linkage scans for body mass index from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Blood Pressure Program. *Am J Hum Genet* **70**, 1247-56 (2002).
333. Demenais, F. et al. A meta-analysis of four European genome screens (GIFT Consortium) shows evidence for a novel region on chromosome 17p11.2-q22 linked to type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* **12**, 1865-73 (2003).

334. Vedic, B. et al. A new DNA polymorphism in the 5' untranslated region of the human SREBP-1a is related to development of atherosclerosis in high cardiovascular risk population. *Atherosclerosis* **154**, 589-97 (2001).
335. Salek, L., Lutucuta, S., Ballantyne, C.M., Gotto Jr, A.M. & Marian, A.J. Effects of SREBF-1a and SCAP polymorphisms on plasma levels of lipids, severity, progression and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy with fluvastatin. *J Mol Med* **80**, 737-44 (2002).
336. Fiegenbaum, M. et al. Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes. *Pharmacogenomics J* **5**, 359-64 (2005).
337. Miserez, A.R. et al. A single-nucleotide polymorphism in the sterol-regulatory element-binding protein 1c gene is predictive of HIV-related hyperlipoproteinaemia. *Aids* **15**, 2045-9 (2001).
338. Eberle, D. et al. SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. *Diabetes* **53**, 2153-7 (2004).
339. Laudes, M. et al. Genetic variants in human sterol regulatory element binding protein-1c in syndromes of severe insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 842-6 (2004).
340. Harding, A.H. et al. Polymorphisms in the gene encoding sterol regulatory element-binding factor-1c are associated with type 2 diabetes. *Diabetologia* **49**, 2642-8 (2006).
341. Herbert, A. et al. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science* **312**, 279-83 (2006).
342. Deng, H.W. et al. A genomewide linkage scan for quantitative-trait loci for obesity phenotypes. *Am J Hum Genet* **70**, 1138-51 (2002).
343. Cervino, A.C. et al. Integrating QTL and high-density SNP analyses in mice to identify *Insig2* as a susceptibility gene for plasma cholesterol levels. *Genomics* **86**, 505-17 (2005).
344. Schmitz-Peiffer, C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal* **12**, 583-94 (2000).
345. Ford, E.S., Giles, W.H. & Dietz, W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* **287**, 356-9 (2002).

346. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7 (1977).
347. Antonarakis, S.E. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* **11**, 1-3 (1998).
348. Hebsgaard, S.M. et al. Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res* **24**, 3439-52 (1996).
349. Brunak, S., Engelbrecht, J. & Knudsen, S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol* **220**, 49-65 (1991).
350. Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-90 (1988).
351. Purcell, S., Cherny, S.S. & Sham, P.C. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* **19**, 149-50 (2003).
352. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9 (1987).
353. Lemieux, I. et al. Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. *Arch Intern Med* **161**, 2685-92 (2001).
354. Abkevich, V. et al. Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet* **41**, 492-507 (2004).
355. Annicotte, J.S., Schoonjans, K., Haby, C. & Auwerx, J. An E-box in pGL3 reporter vectors precludes their use for the study of sterol regulatory element-binding proteins. *Biotechniques* **31**, 993-4, 996 (2001).
356. He, T.C. et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2509-14 (1998).
357. Wang, G.J., Yang, P. & Xie, H.G. Gene variants in noncoding regions and their possible consequences. *Pharmacogenomics* **7**, 203-9 (2006).
358. Thomson, A.M., Rogers, J.T. & Leedman, P.J. Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1139-52 (1999).

359. Velho, G. & Robert, J.J. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): genetic and clinical characteristics. *Horm Res* **57 Suppl 1**, 29-33 (2002).
360. Lam, T.K. et al. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E863-73 (2003).
361. Eriksson, J.W., Smith, U., Waagstein, F., Wysocki, M. & Jansson, P.A. Glucose turnover and adipose tissue lipolysis are insulin-resistant in healthy relatives of type 2 diabetes patients: is cellular insulin resistance a secondary phenomenon? *Diabetes* **48**, 1572-8 (1999).
362. Gulli, G., Ferrannini, E., Stern, M., Haffner, S. & DeFronzo, R.A. The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents. *Diabetes* **41**, 1575-86 (1992).
363. Gelding, S.V., Coldham, N., Niththyananthan, R., Anyaoku, V. & Johnston, D.G. Insulin resistance with respect to lipolysis in non-diabetic relatives of European patients with type 2 diabetes. *Diabet Med* **12**, 66-73 (1995).
364. Nadar, S., Blann, A.D. & Lip, G.Y. Endothelial dysfunction: methods of assessment and application to hypertension. *Curr Pharm Des* **10**, 3591-605 (2004).
365. Cok, S.J. & Morrison, A.R. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J Biol Chem* **276**, 23179-85 (2001).
366. Millard, S.S., Vidal, A., Markus, M. & Koff, A. A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. *Mol Cell Biol* **20**, 5947-59 (2000).
367. Wang, J., Pitarque, M. & Ingelman-Sundberg, M. 3'-UTR polymorphism in the human CYP2A6 gene affects mRNA stability and enzyme expression. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 491-7 (2006).
368. Ono, K. et al. A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension. *Hypertens Res* **25**, 727-30 (2002).
369. Liu, J., Shen, X., Nguyen, V.A., Kunos, G. & Gao, B. Alpha(1) adrenergic agonist induction of p21(waf1/cip1) mRNA stability in transfected HepG2 cells correlates with the increased binding of an AU-rich element binding factor. *J Biol Chem* **275**, 11846-51 (2000).

370. Neel, J.V. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* **14**, 353-62 (1962).
371. Stride, A. et al. Intrauterine hyperglycemia is associated with an earlier diagnosis of diabetes in HNF-1alpha gene mutation carriers. *Diabetes Care* **25**, 2287-91 (2002).
372. Erol, A. The role of fat tissue in the cholesterol lowering and the pleiotropic effects of statins--statins activate the generation of metabolically more capable adipocytes. *Med Hypotheses* **64**, 69-73 (2005).
373. Isley, W.L., Miles, J.M., Patterson, B.W. & Harris, W.S. The effect of high-dose simvastatin on triglyceride-rich lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Lipid Res* **47**, 193-200 (2006).
374. Isley, W.L., Park, Y. & Harris, W.S. The effect of high dose simvastatin on, platelet size in patients with, type 2 diabetes mellitus. *Platelets* **17**, 292-5 (2006).
375. Takano, T., Yamakawa, T., Takahashi, M., Kimura, M. & Okamura, A. Influences of statins on glucose tolerance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* **13**, 95-100 (2006).