

Efecto de la hiperactividad de la cdk4 en la fisiología del islote pancreático y en el desarrollo de la diabetes autoinmune

Tesis doctoral presentada por
NÚRIA MARZO ADAM
para optar al grado de Doctora en Bioquímica
Laboratorio Experimental de Diabetes. IDIBAPS

Directores :
Dra. Concepció Mora Giral
Dr. Ramon Gomis de Barbarà

Programa de doctorado Biología y Patología Celulares del
Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica.

Bienio 2001-2003

Tutor: Dr. Carles Enrich



UNIVERSITAT DE BARCELONA



I.-INTRODUCCIÓN

1 La Cdk4 y el ciclo celular	7
1.1 Transición fase G1-S: Implicación del complejo ciclina D-Cdk4. El punto de restricción 11	
1.2 Regulación de la Cdk4	13
1.2.1 Regulación del complejo mediante los niveles de ciclina D y su localización subcelular	14
1.2.2 Regulación del complejo ciclina D-Cdk4 por fosforilación / defosforilación ..	15
1.2.3 Regulación del complejo ciclina-Cdk4 mediante inhibidores	16
1.3 Modelos animales relacionados con la vía Cdk4-CiclinaD-INK4-pRb-E2F	17
1.3.1 Modelos con alteración de alguno los miembros de la familia INK4	19
1.3.2 Modelos con alteración en la ciclina D	20
1.3.3 Modelos con alteración de las Cdks.	21
1.3.3.1 El modelo genomodificado (knockin) Cdk4R24C	23
2 Fisiología de la célula β	25
2.1 Biosíntesis de la insulina	27
2.2 La secreción de insulina	30
3 La masa β-celular. Replicación de la célula β pancreática	33
3.1 Proliferación de la célula β. El ciclo celular de la célula β	35
3.1.1 Cdk4 como molécula clave en la proliferación de la célula β	36
3.1.1.1 La hiperplasia de célula β en el modelo knockin Cdk4R24C	38
4 Diabetes Mellitus de tipo 1 (DMT1)	39
4.1 Modelos animales de DMT1. Non-Obese Diabetic mouse (NOD)	45
4.1.1 Patogénesis de la DMT1 en la cepa NOD	46
4.1.2 Influencia de factores genéticos y ambientales en el desarrollo de DMT1 en la cepa NOD	48
4.1.3 Defecto inmunitario en el desarrollo de la DMT1 en la cepa NOD	49

4.1.4 Defectos en la célula β que condicionan el desarrollo de la DMT1 en la cepa NOD	50
4.1.5 Autoantígenos de la DMT1 en la cepa NOD.....	51
4.1.5.1 Autoantígenos de origen neuroendocrino. La proteína GFAP	52
4.2 Variaciones en la masa de célula β en el ratón NOD, previas al desarrollo de la enfermedad.....	53

II.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.-MATERIALES Y MÉTODOS

5 Aspectos generales	61
5.1 Modelos animales	61
5.1.1 Condiciones de estabulación	61
5.1.2 Cdk4R24C CD1/129Sv.....	62
5.1.3 Cdk4R24C NOD.....	64
5.1.3.1 Retrocruzamiento	64
5.1.3.2 Genotipado de los polimorfismos asociados	64
5.1.4 Cdk4R24C NOD/SCID	66
5.1.4.1 Retrocruzamiento	67
5.1.4.2 Genotipado del alelo scid	68
5.2 Condiciones generales de cultivo celular	69
5.2.1 Condiciones de cultivo de los islotes pancreáticos aislados	69
5.2.2 Condiciones de cultivo de la línea celular 293-T	70
5.2.3 Condiciones de cultivo de los linfocitos murinos procedentes de bazo o nódulos linfáticos	70
5.3 Obtención de los islotes pancreáticos de ratón	70
5.3.1 Canulación del conducto pancreático o colédoco	70
5.3.2 Digestión del páncreas	70
5.4 Purificación de esplenocitos	71
5.5 Purificación de linfocitos a partir de nódulos linfáticos pancreáticos.....	71
6 Metodología utilizada para la caracterización del modelo Cdk4 R24C CD1/129Sv	72

6.1 Determinación de los parámetros metabólicos	72
6.1.1 Glicemia.....	72
6.1.2 Insulinemia	72
6.2 Ensayos morfométricos	72
6.3 Determinación del contenido de insulina del islote	72
6.4 Biosíntesis y conversión de proinsulina a insulina.....	73
6.4.1 Marcado radioisotópico y separación de la insulina.....	73
6.4.2 Electroforesis en condiciones no desnaturizantes.....	74
6.4.3 Fluorografía	74
6.5 Secreción de insulina por perfusión	75
6.6 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (TTIPG).....	76
6.7 Oxidación y utilización de glucosa	76
6.7.1 Oxidación	76
6.7.2 Utilización	77
6.7.3 Protocolo general	78
7 Metodología utilizada para el estudio de la influencia de la mutación Cdk4R24C en el comportamiento fisiológico de islotes humanos aislados	79
7.1 Obtención de islotes pancreáticos humanos. Aislamiento y purificación	79
7.1.1 Digestión	80
7.1.2 Monitorización de la digestión.....	80
7.1.3 Recuento de islotes pre-gradiente.....	81
7.1.4 Purificación de los islotes pancreáticos.....	81
7.1.5 Recuento de islotes post-gradiente.....	82
7.1.6 Viabilidad de los islotes pancreáticos	82
7.2 Lentivirus.....	82
7.2.1 Construcciones lentivirales.....	82
7.2.2 Producción de partículas lentivirales.....	84
7.2.2.1 Prueba de precipitados de los plásmidos	84
7.2.2.2 Transfección de las células 293-T	85
7.2.2.3 Determinación de la actividad lentiviral	86
7.2.3 Infección lentiviral de islotes humanos	86
7.3 Detección de los islotes infectados	86

7.3.1 Medición de la proliferación de los islotes humanos infectados con vectores lentivirales	87
7.3.2 Cuantificación de la ³ H-Timidina incorporada.....	87
7.4 Niveles de GLUT2 en islotes humanos infectados con partículas lentivirales	88
7.5 Determinación de la proliferación de la célula beta en islotes humanos infectados mediante inmunocitoquímica.....	88
8 Metodología utilizada para la caracterización de los ratones Cdk4R24C NOD.....	89
8.1 Historia natural.....	89
8.2 Transferencia adoptiva.....	90
8.3 Ensayos de proliferación linfocitaria por incorporación de Timidina-3H.....	90
8.4 Caracterización fenotípica de los linfocitos por citometría de flujo	90
8.5 Determinación del grado de infiltración linfocitaria de los islotes.....	91
8.6 Apoptosis	92
8.6.1 Determinación de los niveles de apoptosis mediante la técnica de TÚNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling).....	92
8.6.2 Ensayo de apoptosis por Anexina	93
8.7 Determinación del grado de susceptibilidad a la apoptosis de los linfocitos mediante anticuerpo anti-CD3	93
8.8 Ensayo de WESTERN BLOT para la detección de los niveles de la proteína GFAP	94
8.8.1 Extracción de proteínas a partir de tejido.....	94
8.8.2 Electroforesis de las proteínas	95
8.8.3 Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa	95
8.8.4 Bloqueo de la membrana.....	96
8.8.5 Detección de la proteína GFAP	96
9 Estadística	96
 IV.-RESULTADOS Y CONCLUSIONES	
10 Resultados (Objetivo I).....	99
10.1 Morfología del islote	100

10.2 Contenido de insulina.....	100
10.3 Glicemia e insulinemia	101
10.4 Fisiología del islote.....	101
10.5 Conversión de proinsulina a insulina.....	101
10.6 Oxidación y utilización de glucosa.....	102
10.7 Secreción de insulina.....	103
10.8 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa	104
11 Resultados (Objetivo II).....	107
11.1 Proliferación de los islotes humanos con la mutación Cdk4R24C	107
11.2 La Cdk4R24C aumenta la proliferación de las células β pancreáticas humanas	108
11.3 Expresión de niveles de GLUT2 en islotes humanos infectados	109
12 Discusión resultados (Objetivo I y II).....	110
13 Resultados (Objetivo III)	115
13.1 Incidencia de diabetes en la cepa Cdk4R24C NOD	116
13.2 Infiltración linfocitaria.....	118
13.3 Transferencia adoptiva de linfocitos procedentes de los distintos grupos experimentales estudiados a ratones NOD/SCID.....	120
13.4 Proliferación in vitro de los esplenocitos	121
13.5 Proliferación basal de los esplenocitos	123
13.6 Inducción de apoptosis por estímulo con anti-CD3	124
13.7 Proliferación in vitro de los linfocitos de los nódulos linfáticos pancreáticos	125
13.8 Caracterización linfocitaria	127
13.9 Apoptosis de los islotes pancreáticos	130
13.10 Transferencia adoptiva a ratones Cdk4R24C NOD/SCID.....	131
13.11 Niveles de expresión de la proteína GFAP	132
14 Discusión resultados (Objetivo III)	134

15 Resumen final de los resultados 141

V.- CONCLUSIONES

VI.- ANEXOS

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VIII.- PUBLICACIONES

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico	NK: <i>Natural Killer</i>
AE: Actividad Específica	NLS: <i>Nuclear Localization Sequence</i> o Secuencia de localización nuclear
AICD: Apoptosis Induced Cell-Death	NOD: <i>Non Obese Diabetic mice</i> o Ratón Diabético No Obeso
APC: Aloficocianina	P/S: Penicilina /Estreptomicina
Brdu: Bromodeoxiuridina	pb: pares de bases
BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i> o Albúmina de suero bovina	PCR: <i>Polimerase Chain Reaction</i> o Reacción en cadena de la polimerasa
CAK: <i>Cyclin activating kinase</i> o Kinasa activadora de ciclinas	PDGF: <i>platelet-derived growth factor</i> , factor de crecimiento derivado de plaquetas
Cdks: <i>Cyclin Dependent Kinases</i> o kinasas dependientes de ciclina	PE: Ficoeritrina
CKI: Inhibidores del complejo ciclina-Cdk	PI3: Fosfatidil inositol 3-fosfato
CM: <i>Collect media</i>	PKC: Proteína kinasa C.
CMV: Citomegalovirus	PMSF: fenilmetilsulfonil fluorídico
cpm: cuentas por minuto	pRb: Proteína del retinoblastoma
DAG: Diacilglicerol	PTHrP: <i>Parathyroid Hormone-related Protein</i> o proteína relacionada con la hormona paratiroidea
DMBA: 9,10-di-metil-1,2-benzoantraceno	RIA: Radioinmunoensayo
DMSO: Dimetilsulfóxido.	rpm: revoluciones por minuto
DMT1: Diabetes mellitus tipo 1	s: segundo
DTZ: Difeniltiocarbazona ó ditizona	SCID: <i>Severe combined immunodeficiency</i>
ECL: <i>Enhanced Chemiluminescence</i> .	STZ: Streptozotocina
EDTA: Ácido etilendiamino tetra-acético	TCR: <i>T cell receptor</i> o Receptor de Célula T
EGF: <i>epidermal growth factor</i> , factor de crecimiento epidérmico	Tg: Transgénico
EGFP: <i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i> o proteína fluorescente verde	TPA: 12-O-tetradecanoilfolbol-13-acetato
EGTA: Ácido etilenglicol-bis(2 aminoetiléter)-N, N, N', N'- tetra-acético	TPCK: N- p- Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
ELISA: <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	TRITC: Tetrametilrodamina isotiocianato
F: FITC. Fluoresceína isotiocianato	TTIPG: Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa.
FBS: <i>Fetal Bovine Serum</i> o Suero Fetal Bovino	TUNEL: TdT-mediated dUTP nick-end labeling
GFAP: <i>Glial Fibrillar Acidic Protein</i> o Proteína Glial Fibrilar Ácida	VIH: Virus de la inmunodeficiencia adquirida
GLP-1: <i>Glucagon Like Peptide-1</i>	VSV: Virus de la estomatitis vesicular.
GLUT 2: Transportador de glucosa de tipo 2	WT: <i>Wildtype</i> o Salvaje
HBSS: <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>	X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
HIP: <i>Human insulin Promoter</i> o Promotor de la Insulina Humana	μl: microlitro
HPG: <i>Hepatocyte Growth Factor</i> o factor de crecimiento hepático	
I.U: <i>Infection units</i> o unidades infectivas.	
Idds: <i>Insulin dependent diabetes susceptibility</i>	
IGF: <i>Insulin Like Growth Factor</i>	
Kg: kilogramo	
ki: <i>knockin</i> o genomodificado	
ko: <i>knockout</i> o genoanulado	
l: litro	
LacZ: β -galactosidasa	
MEF: <i>Mouse Embryo Fibroblast</i> o Fibroblastos Embrionarios de Ratón.	
mg: miligramos	
MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad	
ml: mililitros	