

## Póster

## Utilización de una mutación activadora de glucoquinasa para la obtención de 'super-islotos' pancreáticos.



Quintana Portillo Rocio y Martin Bermudo Francisco

Departamento de Células Troncales, Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Avda. Americo Vesputio s/n. Parque Científico y Tecnológico Cartuja41092 - Sevilla, España.

**Palabras clave:** Glucokinasa, islotes pancreáticos, insulina.

### RESUMEN

**Motivación:** La glucoquinasa (GK) de mamíferos, es una hexokinasa. Las mutaciones en esta proteína, se pueden clasificar dentro de dos grupos: i) inactivadoras, que conllevan a diabetes tipo MODY (maturity onset diabetes of the young) y ii) activadoras que producen una hipoglucemia neonatal severa, cuyo único tratamiento es la pancreatomectomía subtotal. Una de esas mutaciones es la V91L, la cual es el objetivo de este trabajo. Los pacientes con esta mutación se caracterizan por islotes pancreáticos de mayor tamaño, con una mayor proliferación y apoptosis. Además, de una mayor sensibilidad a la glucosa. El objetivo de este trabajo es introducir la mutación V91L en islotes pancreáticos con el fin de conseguir islotes que proliferan y tienen una mejor respuesta secretora de insulina. Estos islotes se podrían utilizar posteriormente en la terapia celular de la diabetes.

**Métodos:** Se ha utilizado un sistema de expresión de tres plásmidos (eGFP, GCK, V91L) para generar tres vectores recombinantes de lentivirus, que contienen un gen marcador GFP. Para ello se insertó en el vector viral el gen que codifica para la isoforma pancreática humana de la glucoquinasa, en sus dos variantes, la glucoquinasa normal y la mutada (V91L). Posteriormente, se procedió a transfectar células en cultivo (A293T) con dichos plásmidos cuya transección se comprobó por inmunofluorescencia y western blotting. Sucesivamente, se procedió a la formación de unidades víricas, y se realizó la titulación de los mismos por citometría de flujo. A continuación, se procede a infectar células con los virus obtenidos y posteriormente infectar islotes pancreáticos de ratón.

**Resultados:** Se ha conseguido una óptima transección de los respectivos plásmidos, así como, una óptima titulación vírica tras la infección de células A293T (entre 50-90%).

**Conclusiones:** La introducción de dicha mutación espontánea (V91L), mediante el uso de vectores virales (lentivirus), en islotes pancreáticos tiene como fin aumentar la proliferación de las células  $\beta$  y la secreción de insulina, y así, al ser trasplantados a pacientes con diabetes, puedan restituir los niveles de glucosa y restituir el control de la glucemia sin necesidad de un suministro externo de insulina.

### BIBLIOGRAFIA

- Matschinsky, F.M., and Porte, D. (2010). Glucokinase activators (GKAs) promise a new pharmacotherapy for diabetics. *F1000 Med Rep* 2.
- Cuesta-Munoz, A.L., et al. (2004). Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes* 53, 2164-2168
- Kassem, S., Bhandari, S., Rodriguez-Bada, P., Motaghedi, R., Heyman, M., Garcia-Gimeno, M.A., Cobo-Vuilleumier, N., Sanz, P., Maclaren, N.K., Rahier, J., et al. (2010). Large islets, beta-cell proliferation, and a glucokinase mutation. *N Engl J Med* 362, 1348-1350
- ANG, Y., GARSON, K., LI, L., & VANDERHYDEN, B. C. (2015). Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine-mediated transfection. *Oncology Letters*, 9(1), 55–62. doi:10.3892/ol.2014.2684
- Tiscornia G1, Singer O, Verma IM. (2006). Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc.*;1(1):241-5.