

Regulación transcripcional de la glicógeno fosforilasa hepática. PYGL

Problemática.

En una búsqueda en PubMed no es posible encontrar referencias sobre estudios de su regulación transcripcional


Sin embargo, hay diferentes estudios que tratan de explicar algunas variaciones-enfermedades metabólicas mediante la regulación transcripcional de PYGL

The Hepatic Transcriptome as a Window on Whole-Body Physiology and Pathophysiology

KEVIN T. MORGAN,¹ ZAID JAYYOSI,¹ MOIRA A. HOWER,¹ MICHAEL V. PINO,¹ TIMOTHY M. CONNOLLY,² KATIA KOTLENGA,³ JIEYI LIN,² MIN WANG,¹ HANS-LUDWIG SCHMIDTS,³ MARC S. BONNEFOI,¹ TIMOTHY C. ELSTON,⁴ AND GARY A. BOORMAN

Toxicologic Pathology, 33:136–145, 2005
Copyright © by the Society of Toxicologic Pathology
ISSN: 0192-6233 print / 1533-1601 online
DOI: 10.1080/01926230590522149

Stable Patterns of Gene Expression Regulating Carbohydrate Metabolism Determined by Geographic Ancestry

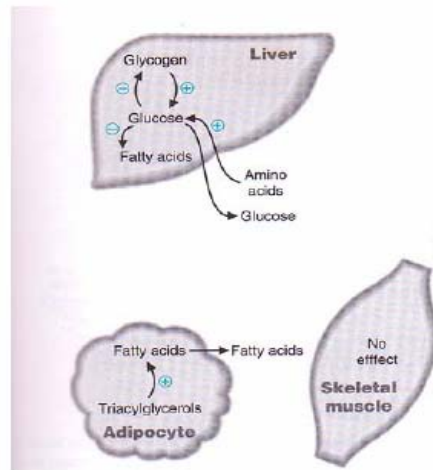
 PLoS one December 2009 | Volume 4 | Issue 12 | e8183

Jonathan C. Schisler¹, Peter C. Charles^{1,2}, Joel S. Parker³, Eleanor G. Hilliard¹, Sabeen Mapara¹, Dane Meredith², Robert E. Lineberger¹, Samuel S. Wu², Brian D. Alder⁴, George A. Stouffer², Cam Patterson^{1,2*}

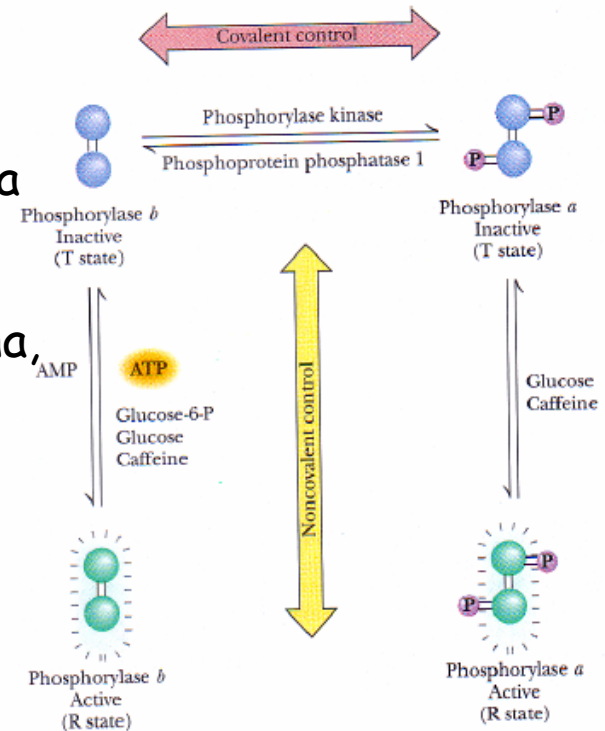
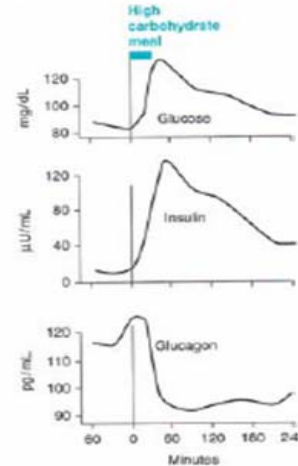


Regulación transcripcional de la glicógeno fosforilasa hepática. PYGL

- En todos los estudios existentes se asume el modelo clásico: la concentración del enzima es constante
- su actividad depende la concentración de forma activa mediante:
 - regulación alostérica (glucosa, ATP...)
 - metabolitos inductores (glucagón, epinefrina, etc.)



The major sites of glucagon action.
 ⊕ = Stimulated by glucagon
 ⊖ = Inhibited by glucagon



Influencia de los ritmos circadianos y el ayuno sobre la expresión genética de la glicógeno fosforilasa

- Mediante chips de expresión genica (Affymetrix RG U34A GeneChip) se aborda la influencia de la alimentación, la dieta, y otros factores extrahepáticos en el transcriptoma hepático en ratas, dentro de un estudio de toxicidad de fármacos.

The Hepatic Transcriptome as a Window on Whole-Body Physiology and Pathophysiology

KEVIN T. MORGAN,¹ ZAID JAYYOSI,¹ MOIRA A. HOWER,¹ MICHAEL V. PINO,¹ TIMOTHY M. CONNOLLY,²
KATIA KOTLENGA,² JIEYI LIN,² MIN WANG,¹ HANS-LUDWIG SCHMIDT,³ MARC S. BONNEFOL,¹ TIMOTHY C. ELSTON,⁴
AND GARY A. BOORMAN²

Toxicologic Pathology, 33:136–145, 2005
Copyright © by the Society of Toxicologic Pathology
ISSN: 0192-6233 print / 1533-1601 online
DOI: 10.1080/01926230500522149

- Tres grupos de tratamiento.
- 6 horas de tratamiento. La alimentación se retira a las 8:00, y la necropsia se realiza a las 14:00 (6 horas de ayuno)
 - 24 horas y 5 días de tratamiento. La alimentación se retira a las 15:00 del día anterior a la necropsia, que se realiza a las 8:00 (17 horas de ayuno)

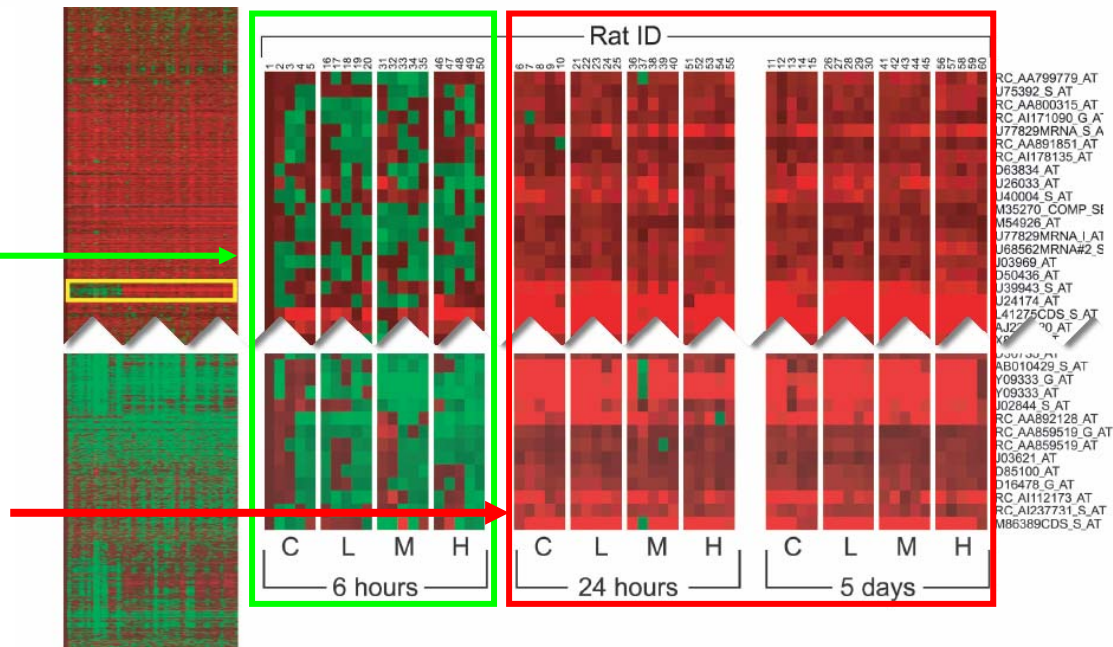
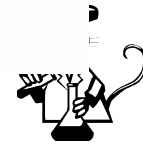
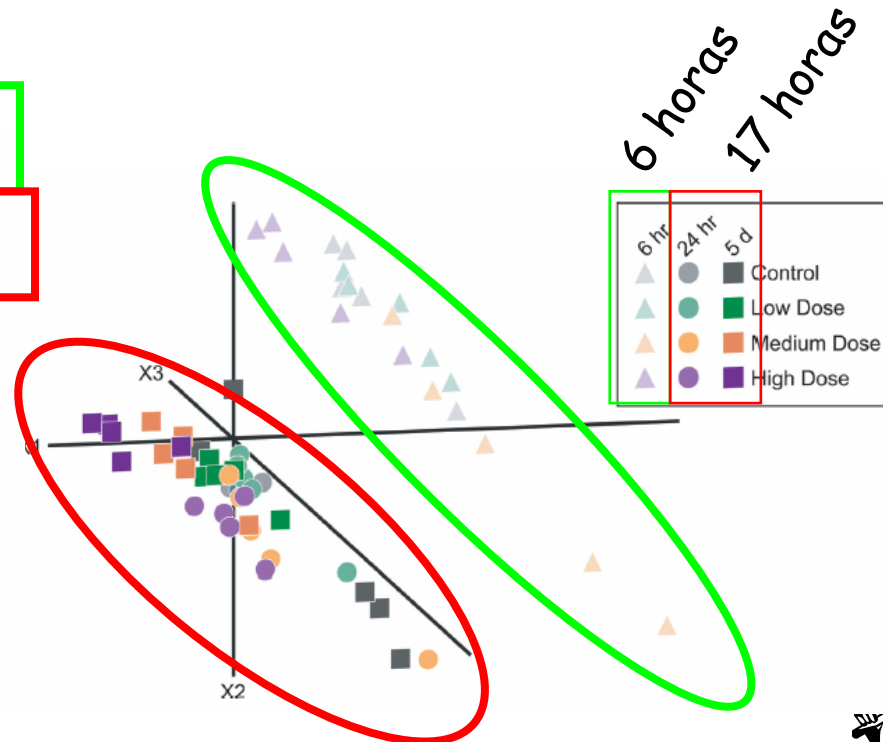


FIGURE 2.—Heat map of data from all animals study of “compound X” on the left with a small subset of genes highlighted in yellow. The area in yellow has been expanded on the right to show that expression levels in the 6-hour rats for both control (C) and those exposed to low (L), medium (M), and high (H) of test compound are clearly different from the controls and treated at the 24 hours and 5 day time points. There are 5 rats per test group as shown by rat ID at the top of the expanded dendrogram. The software used to generate this figure (Eisen et al., 1998) also allows the export of genes in this node to a gene list for further study. The generation of meaningful gene lists is one of major challenges of toxicogenomics that is assisted in many ways by Bioinformatics (Causton et al., 2003).

Influencia de los ritmos circadianos y el ayuno sobre la expresión genética de la glicógeno fosforilasa

- Un primer análisis de los datos de expresión mediante PCA (Análisis de componentes principales) muestra diferencias en la expresión génica entre los grupos de 6 y 17 horas de ayuno.

There were 2 key differences between the 6-hour control rats and those from the 24-hour and 5-day groups. The 6-hour rats were not fasted overnight and they were necropsied at 2:00 PM, while the 24-hour and 5 day groups were fasted for 17 hours prior to necropsy at 8:00 AM. These differences are reflected in the amount of glycogen present in the livers, which is considerable in the 6-hour group and apparently absent in the 24-hour and 5-day animals, as assessed by light microscopy of hematoxylin and eosin (H&E) stained paraffin sections (Figures 3A and 3B). This experiment was repeated approximately 2 years later, with similar results, and data derived from both studies is provided for your investigation (Tables 1 and 2 online, see bottom of abstract for website). A brief interpretation of the gene expression data derived from these studies follows, starting with genes associated with glycogen storage, leading then into general energy metabolism, circadian effects, and finally selected aspects of hepatic function are examined and discussed.



Influencia de los ritmos circadianos y el ayuno sobre la expresión genética de la glicógeno fosforilasa

Efectos en el metabolismo de Glucógeno

La histología con 6 horas de ayuno muestra que el hígado contiene Glucógeno. Mientras que a 17 todo el glucógeno almacenado se ha consumido.

Los datos de expresión del microarray indican:

1. la expresión de la enzima de catabolismo de Glucógeno. PYGL se inhibe con el ayuno
2. Con el ayuno aumenta la expresión de la enzima de síntesis. GYS2

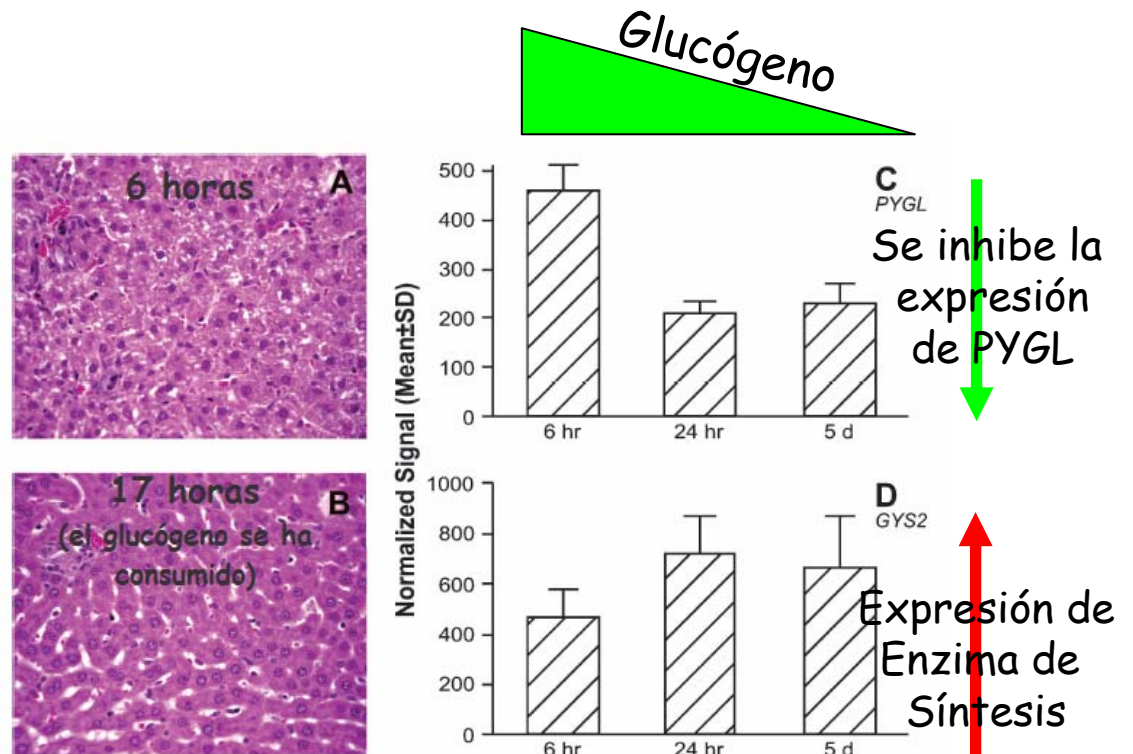


FIGURE 3.—(A) H&E stained liver from a 6-hour animal showing prominent glycogen deposits, (B) H&E stained liver from a 17-hour animal showing absence of glycogen in response to 17 hours of fasting, (C) graph, as mean and standard deviation of population (stdevp in Excel program), showing reduced expression of glycogen phosphorylase (PYGL) in the glycogen-depleted livers, which is combined with (D) an increase in the expression of glycogen synthase (GYS2). These genes were found in the node from Figure 2, as are the genes in the following figures.



Influencia de los ritmos circadianos y el ayuno sobre la expresión genética de la glicógeno fosforilasa

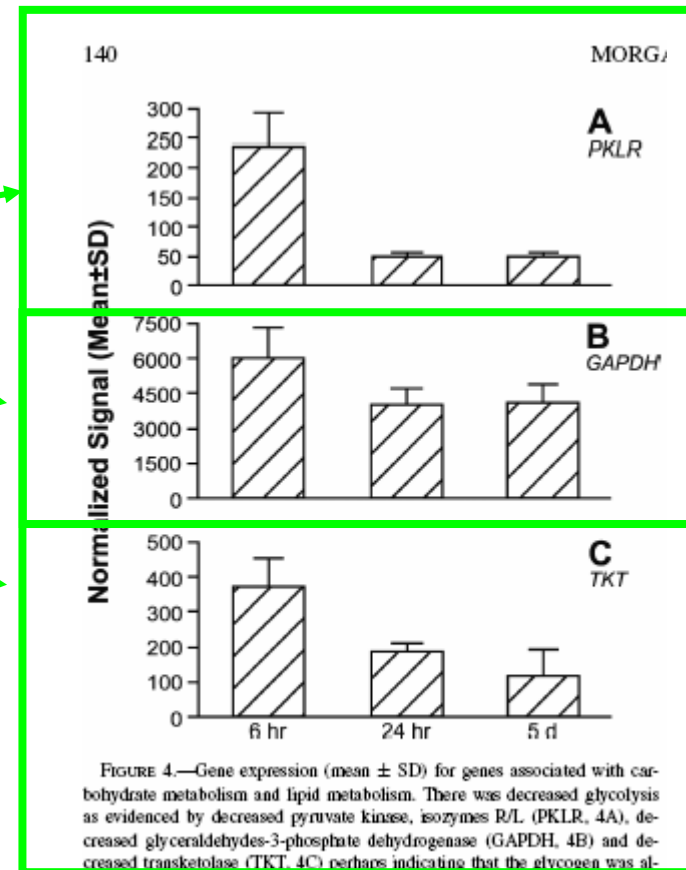
Otros efectos a considerar - metabolismo de carbohidratos

En ausencia de glucógeno hay una clara evidencia de descenso de la glicólisis:

1. Se inhibe la expresión de Piruvato kinasa. PKLR
2. Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa. GAPDH

No hay evidencia de gluconeogénesis. La enzima de la ruta alternativa (pentosas). Transcetolasa . TKT también esta inhibida.

En los animales con 17h de ayuno la mayor fuente de energía no es la glucosa cácidos grasos y cetonas?



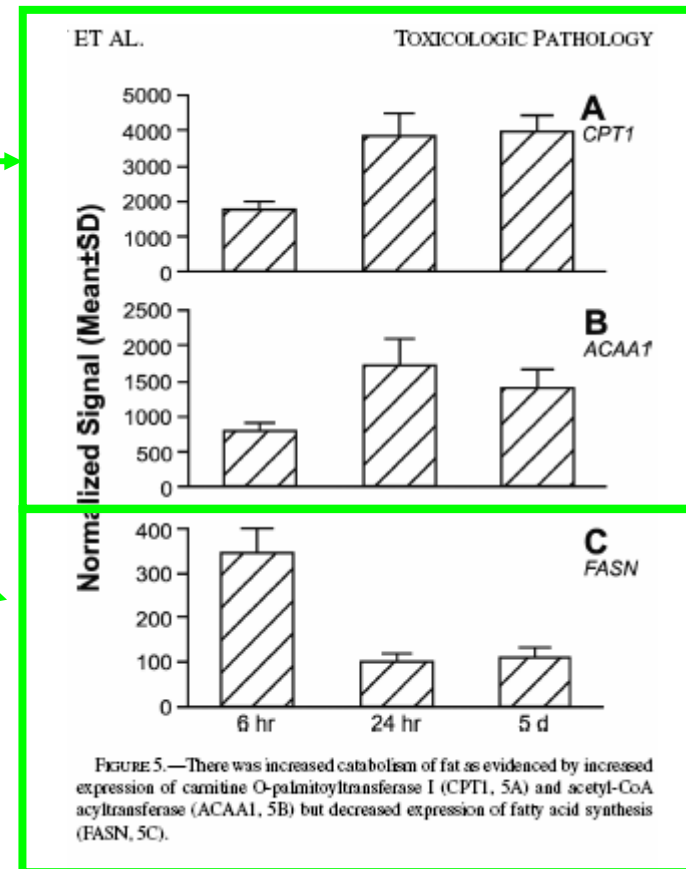
Influencia de los ritmos circadianos y el ayuno sobre la expresión genética de la glicógeno fosforilasa

Otros efectos a considerar - metabolismo de lípidos

Se incrementa la expresión de los genes de metabolismo de lípidos.

- **CPT1** (carnitina palmitoiltransferasa I) media el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana
- **ACAA1** (acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1) Beta oxidación de ácidos grasos

Disminuye la expresión de los genes de almacenamiento de lípidos. **FASN** (Fatty acid syntase)



Influencia de los ritmos circadianos y el ayuno sobre la expresión genética de la glicógeno fosforilasa

Los genes hepáticos que controlan los ritmos circadianos tienen diferentes patrones de expresión

El receptor nuclear ARNTL heterodimeriza con la proteína expresada por *CLOCK* y tiene una retroalimentación negativa en la expresión de *PER2*.

El receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos, también conocido como ARNTL, Bmal1 o Mop3 es una proteína transmembranal codificada por un gen asociado a la susceptibilidad a padecer hipertensión y diabetes tipo 2.)

La importancia toxicológica es que

1. hay diferencias significativas entre las ratas sacrificadas a las 8:00 AM y a las 2:00 PM >> ii ojo con los ciclos al realizar ensayos de expresión ii
2. sobre el 10% de los genes hepáticos (y con influencia en el metabolismo de xenobioticos) tienen patrones circadianos en su expresión.

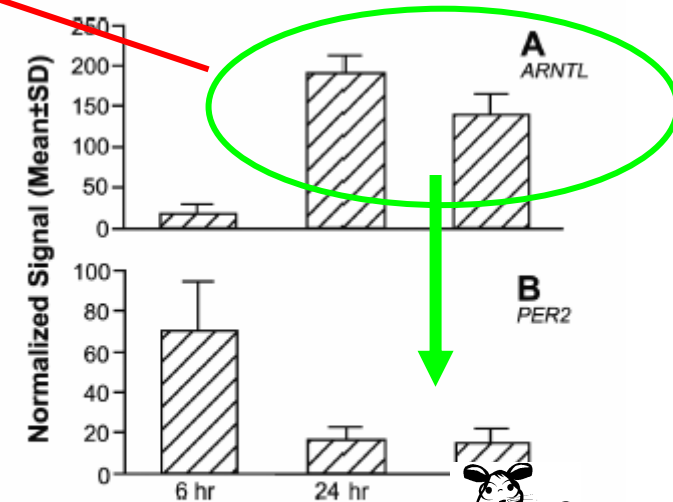


FIGURE 6.—Gene expression (mean ± SD) for 2 circadian genes. The expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like or Bmal1 is lower at 2 PM compared to 8 AM (ARNTL, 6A) while period 2 gene expression shows reciprocal expression (PER2, 6B).

Influencia de los ritmos circadianos y el ayuno sobre la expresión genética de la glicógeno fosforilasa

Bmal1 . Puede estar relacionada con PYGL

Otros estudios con ratones Knock-out Bmal1. Demuestran la importancia en la regulación del metabolismo glucógeno



Circadian glucose homeostasis requires compensatory interference between brain and liver clocks

David Gatfield and Ueli Schibler*

PNAS | September 30, 2008 | vol. 105 | no. 39 | 14753-14754

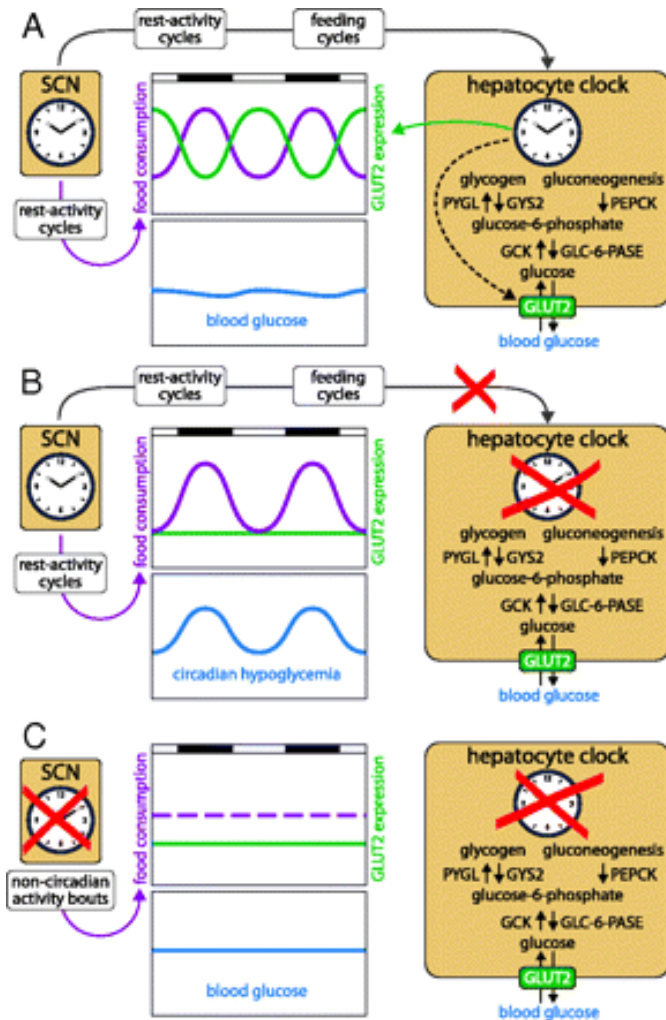
El gen Clock (de sus siglas en inglés "Circadian Locomotor Output Cycles Kaput") codifica una proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos. La proteína CLOCK parece afectar tanto la persistencia como la duración de los ciclos circadianos.

El complejo BMAL1-CLOCK también regula los genes del criptocromo (como Cry1 y Cry2) y los genes Period (como Per1, Per2 y Per3) en mamíferos. Responsables de los ritmos circadianos.

El complejo BMAL1-CLOCK es a su vez regulado por la expresión de los genes Per y Cry.

Influencia de los ritmos circadianos en PYGL

Efecto de los knock-out Bmal1



1. Los ratones "wild type" tienen las oscilaciones circadianas del SNC y del hígado en fase con la alimentación y los ciclos insulina-glucagón.
2. Los ratones Bmal1 -/- con el gen silenciado en hígado pierden la sincronía con el SNC dando lugar a estados transitorios de hipo-glicemia
3. Al desactivar Bmal1 en todos los órganos los ratones pierden los ritmos circadianos.
 1. Los niveles de enzimas del metabolismo de glucógeno son bajos pero suficientes para mantener los niveles de glucosa (muy) estables.
 2. Tienen intolerancia a la glucosa e
 3. hiper sensibilidad a insulina

Fig. 1. Hepatocyte oscillators drive the cyclic expression of many enzymes associated with glucose homeostasis, such as glycogen synthase (GYS2), glycogen phosphorylase (PYGL), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucokinase (GSK), glucose-6-phosphatase (GLC-6-Pase), and the glucose transporter GLUT2. (A) In wild-type animals, the SCN drives feeding rhythms and, thus, rhythms of glucose supply from nutrients. These cycles are counteracted by antiphasic rhythms of hepatic glucose export. (B) In *L-Bmal1^{-/-}* mice, the floxed *Bmal1* alleles have been disrupted only in hepatocytes. Because the SCN master clock is intact in these animals, their activity and feeding rhythms are normal. However, because the disabled liver clock can no longer compensate the lack of food-derived glucose by a burst of GLUT2 expression during the fasting phase, *L-Bmal1^{-/-}* mice display a circadian hypoglycemia. (C) In *Bmal1^{-/-}* mice, the circadian clocks are disabled in all tissues. These arrhythmic animals eat throughout the day, and the nutrient-derived glucose supply is nearly invariable over time. Although GLUT2 is expressed at low levels, it is sufficient to keep blood glucose at nearly normal (and invariable) concentrations.



GYS2 está regulada por CLOCK

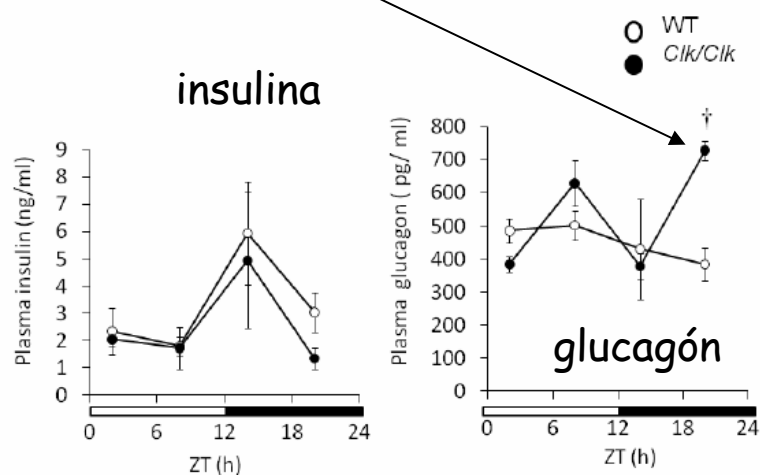
JBC Papers in Press. Published on April 29, 2010 as Manuscript M110.110361

The latest version is at <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.110361>

CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of *Glycogen synthase 2*

Ryosuke Doi^{†1,2}, Katsutaka Oishi^{#3} and Norio Ishida^{#1,2}

Los ratones KO - CLOCK tienen el ritmo del glucagón desregulado



Los ratones KO - CLOCK tienen una baja expresión de GYS

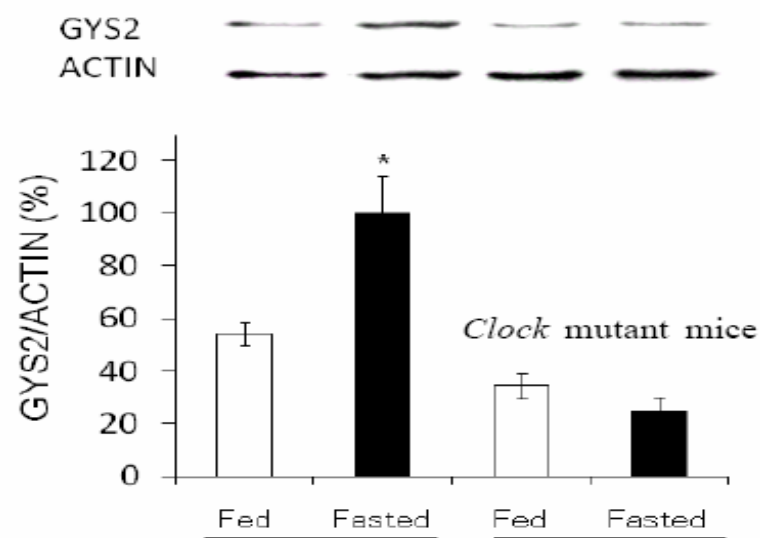



Figure S1. The effects of fasted condition on the GYS2 protein expression.

Mice were maintained under a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 0:00 and lights off at 12:00) and fasted overnight.

¿Puede SBREP1-c regular la transcripción de la glucógeno fosforilasa hepática?. PYGL

Stable Patterns of Gene Expression Regulating Carbohydrate Metabolism Determined by Geographic Ancestry

 PLoS one December 2009 | Volume 4 | Issue 12 | e8183

Jonathan C. Schisler¹, Peter C. Charles^{1,2}, Joel S. Parker³, Eleanor G. Hilliard¹, Sabeen Mapara¹, Dane Meredith², Robert E. Lineberger¹, Samuel S. Wu², Brian D. Alder⁴, George A. Stouffer², Cam Patterson^{1,2*}

Usando una combinación de genética / genómica (microarrays) y bioinformática **identifican un gran número de genes expresados diferencialmente entre los sujetos de ascendencia africana (AA) o europea (CA).**

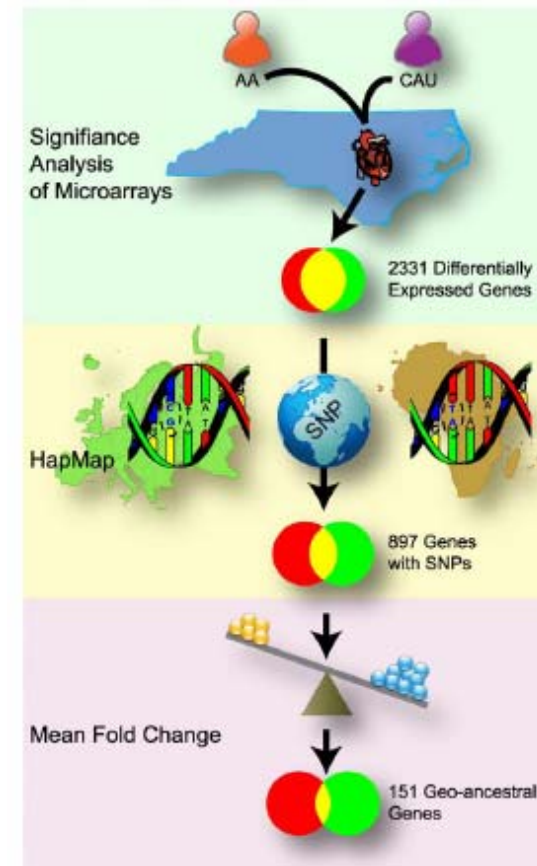
- Los genes en cuestión también contienen SNPs que distinguen a las poblaciones ancestrales.
- Varios de **estos genes controlan el metabolismo de los hidratos de carbono son blancos directos de la SREBP1**, (factor de respuesta a esteroides) también se expresa diferencialmente entre las poblaciones AA-CA.



¿Puede SBREP1-c regular la transcripción de la glucógeno fosforilasa hepática?. PYGL

Estrategia de identificación de los genes diferencialmente expresados
Análisis de microarrays

1. Mediante SAM (Significance analysis of microarrays) se filtran 2531 genes expresados diferencialmente entre las poblaciones (verde);
2. El conjunto de genes de 2531 se restringió a los genes que tenían SNPs depositados dentro del proyecto HapMap, resultando un total de 897 genes (amarillo);
3. Sólo los genes que tienen fold-change medio de 1,3 se seleccionan : 151 genes geo-ancestrales (morado).



¿De muestras de sangre de puede extrapolar a metabolismo hepático?

¿Puede SBREP1-c regular la transcripción de la glucógeno fosforilasa hepática?. PYGL

Expresión tisular de PYGL

Bioinformatics Lab @ Wilmer Institute, Johns Hopkins University

[New Search](#)



PYGL se expresa en gran número de tejidos pero principalmente en:

- Vejiga
- Sangre
- .. Y tambien en tejido adiposo (no mostrado)



vejiga - Sangre??

¿Puede SBREP1-c regular la transcripción de la glucógeno fosforilasa hepática?. PYGL

Resultados de expresión diferencial entre las poblaciones

PYGL está menos expresado en la población AA que en CA

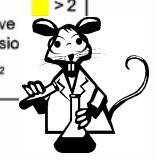
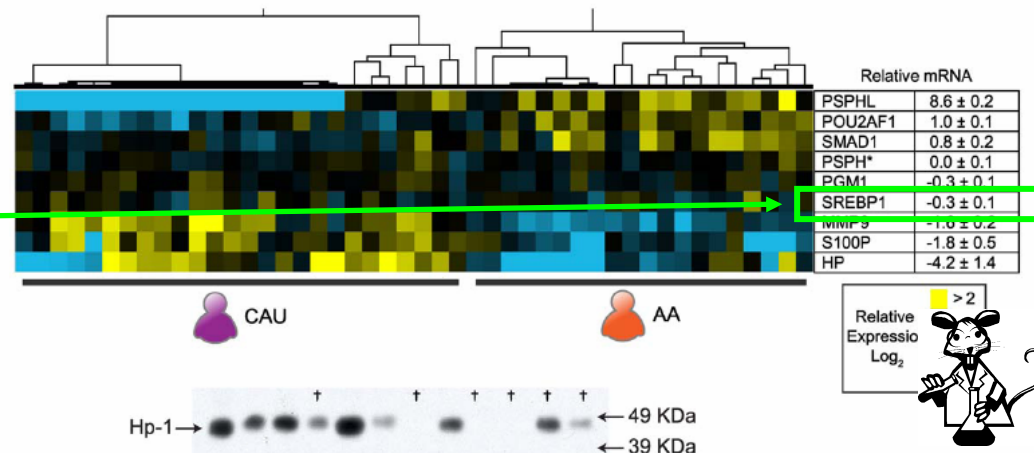
Otros genes del metabolismo de hidratos de carbono diferencialmente expresados: HK2, GPT, PGM1

Los 151 genes identificados se validan por qRT-PCR (PCR cuantitativa)

SREBP1 también está diferencialmente expresado entre las poblaciones AA-CA

Table 2. Genes expressed lower in Americans of African versus European ancestry.

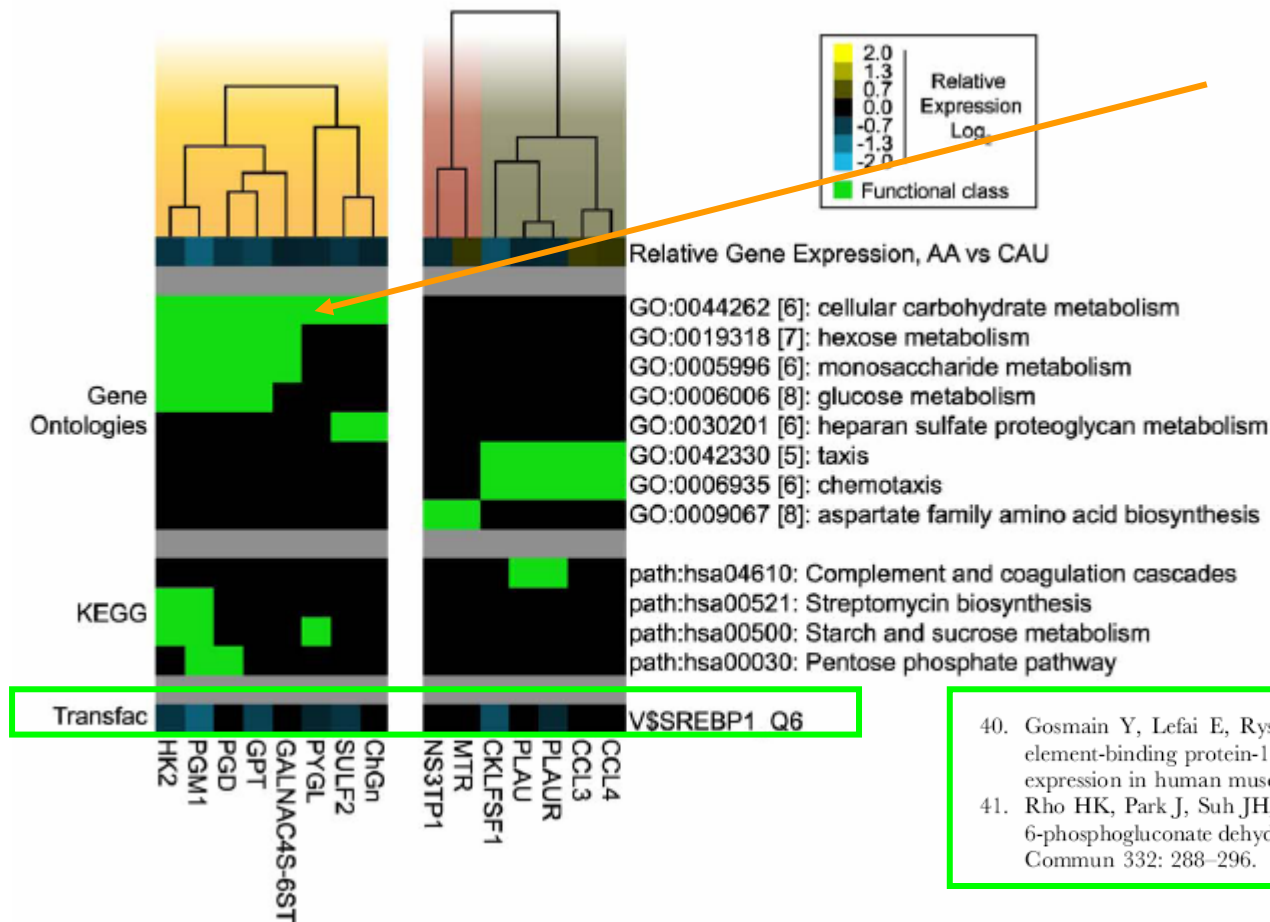
A	Gene Symbol	GBID	A	Gene Symbol	GBID	A	Gene Symbol	GBID
-2.79	S100P	NM_005980	-1.43	SNX27	NM_030918	-1.35	TTRAP	NM_016614
-2.49	SAMD10	NM_080621	-1.43	HOXB2	NM_002145	-1.34	FLOT1	NM_005803
-2.08	PGM1	NM_002633	-1.43	PPP2R5A	NM_006243	-1.34	ABCA7	NM_033308
-1.98	MMP9	NM_004994	-1.42	GPR97	NM_170776	-1.34	HTATIP2	NM_006410
-1.96	HP	NM_005143	-1.42	STX10	NM_003765	-1.34	GPR160	NM_014373
-1.96	EXO5CG	NM_058219	-1.42	TP53I1	BC071606	-1.34	DHRS8	NM_016245
-1.87	C20orf3	NM_020531	-1.42	PKD1-ike	NM_024874	-1.34	FBX5	NM_033535
-1.85	ORM1	NM_000607	-1.41	FLJ13052	NM_023018	-1.34	DNFZp7620076	NM_018710
-1.85	UMSKerB	NM_021046	-1.41	HIST1H2AI	NM_003509	-1.33	TXN	NM_003329
-1.81	CCL45F1	NM_181294	-1.41	IGF2R	NM_000876	-1.33	RAF1	NM_002880
-1.76	COL9A3	NM_001853	-1.41	MME	NM_007289	-1.33	REPS2	NM_004726
-1.69	BMX	NM_001721	-1.40	SNX11	NM_013323	-1.33	C20orf24	NM_018840
-1.68	QPCT	NM_014413	-1.39	HEBP2	NM_014320	-1.33	LBR	NM_194442
-1.67	DIAC1	NM_052952	-1.39	NS3TP1	NM_019048	-1.33	MOSPD2	NM_152581
-1.65	GPT	NM_005309	-1.39	CH13L1	NM_001276	-1.33	SLC40A1	NM_014585
-1.64	RAV16	NM_022749	-1.39	NAV2B2	NM_005534	-1.33	ANAPC	NM_001150
-1.55	ASGR2	NM_001181	-1.39	M				
-1.54	LCE2A	NM_178428	-1.38	G				
-1.52	ANXA3	NM_005139	-1.38	HIST3H2A	NM_033445	-1.33	DREV1	NM_016025
						-1.33	PYGL	NM_002863



¿Puede SBREP1-c regular la transcripción de la glucógeno fosforilasa hepática?. PYGL

Tratan de encontrar patrones de expresión mediante buscando factores de transcripción comunes en TRANSFARC (no dicen como exactamente)

»» El elemento de repetición mas significativo corresponde a SBRP1-c



El motivo V\$SRBP1_Q6 se encuentra en diversos genes del metabolismo de HC.

Existen evidencias experimentales en los genes: HKII y PGD

40. Gosmain Y, Lefai E, Rysler S, Roques M, Vidal H (2004) Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells. Diabetes 53: 321-329.
41. Rho HK, Park J, Suh JH, Kim JB (2005) Transcriptional regulation of mouse 6-phosphogluconate dehydrogenase by ADD1/SREBP1c. Biochem Biophys Res Commun 332: 288-296.

¿Puede SBREP1-c regular la transcripción de la glucógeno fosforilasa hepática?. PYGL

Conclusión final del estudio: Las diferencias interétnicas observadas entre las poblaciones AA y CA son debidas a dos tipos de factores

- Diferentes SNPs entre ambas poblaciones.
- Expresión diferencial de algunos factores de transcripción entre los que se encuentra SBREP1-c

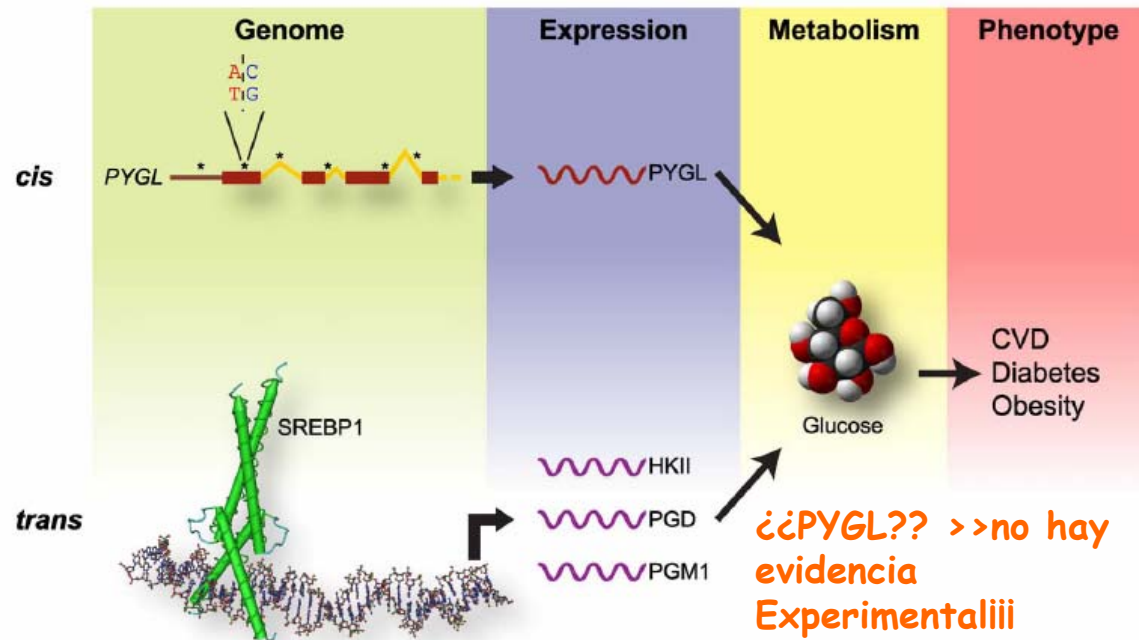


Figure 7. Contributions of *cis*- and *trans*-acting variations to disease pathogenesis. The level of gene expression is influenced by both *cis*- and *trans*-acting factors. Analysis of the carbohydrate metabolic hypercluster identified in the geo-ancestral genes identified both SNPs (*cis*, top) and transcription factors such as SREBP1 (*trans*, bottom) that function on a genomic level (green) contributing to the expression of genes (blue) such as *PYGL* and *HKII*. The enzymes encoded by these genes contribute in carbohydrate and glucose metabolism (yellow) and likely contribute to the increase the predisposition to multi-factorial diseases (red) in Americans of African versus European ancestry. doi:10.1371/journal.pone.0008183.g007

Mecanismo de regulación de SBREP1

Las proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBPs; Sterol-Regulatory Element Binding Proteins) constituyen una familia de factores de transcripción que coordinan el metabolismo de lípidos y recientemente de carbohidratos

- Los SREBPs se detectaron por su capacidad de unirse a elementos de respuesta a esteroides "SRE" presentes en los promotores de genes implicados en la síntesis y captación de colesterol.
- La familia SREBP está constituida por tres miembros: SREBP1a, SREBP1c y SREBP2.
- SREBP1a y 1c son productos de un gen común (*SREBF1*) localizado en el cromosoma 17p11.2.
- La isoforma -1a es mucho más activa transcripcionalmente comparado con la 1c.



Mecanismo de regulación de SBREP1

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. En la proteína SCAP las hélices 2-6 constituyen el dominio sensor de esteroides (SSD;sterol-sensing domain).

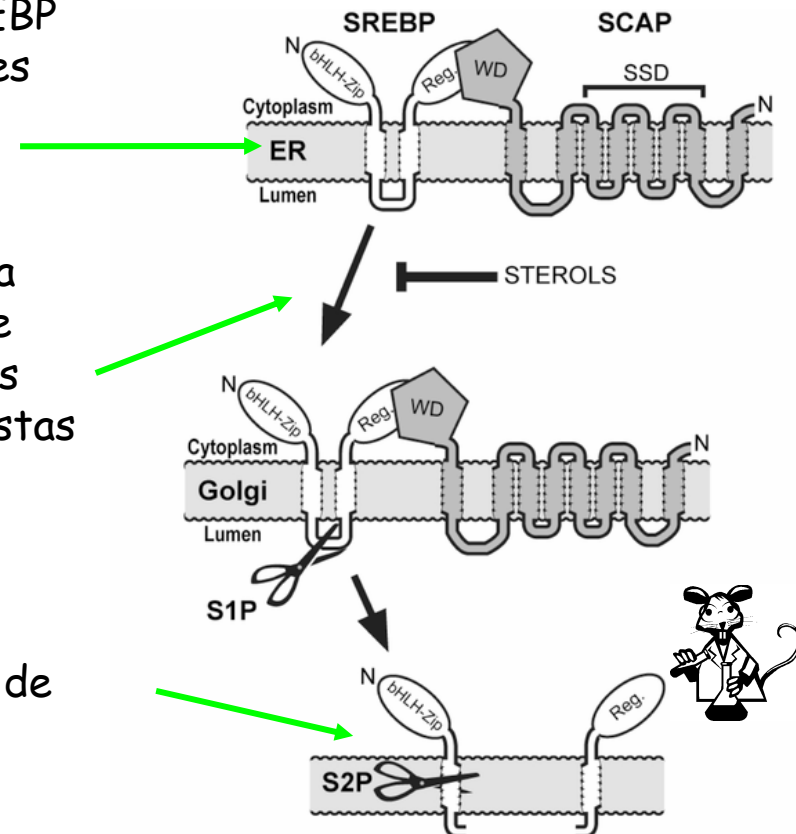
Nature Reviews Molecular Cell Biology 4, 631-640 (August 2003) | doi:10.1038/nrm1174

The SREBP pathway — insights from insigs and insects

- 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 (Site-1 protease; SP1).

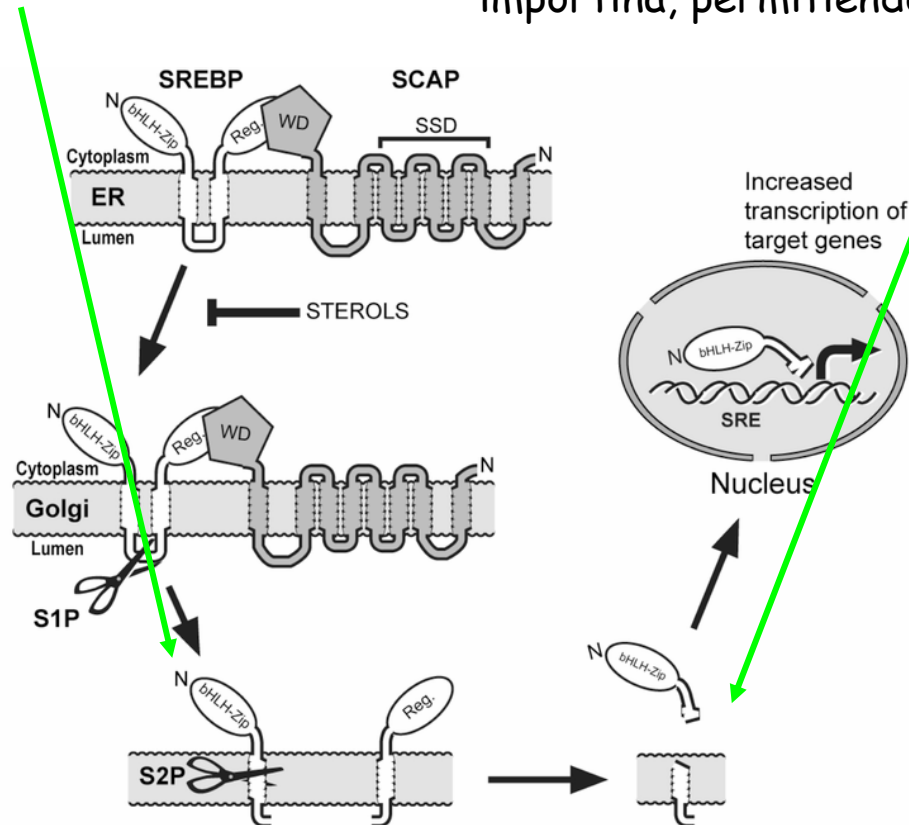
- Una vez incorporadas en la membrana de golgi, la proteasa SP1 se activa y corta SREBP en el medio de su bucle hidrófilo intermembrana.



Mecanismo de regulación de SBREP1

•Tras este corte, SP2, una metaloproteasa transmembrana dependiente de zinc,, vuelve a cortar a SREBP en la región intramembrana del lado citoplasmático.

•Este proceso denominado "RIP" (regulated intermembrane proteolysis) libera la región aminoterminal denominada "forma madura" que en su región bHLH contiene una señal de localización nuclear que interacciona con importina, permitiendo su transporte al núcleo.



Mecanismo de regulación de SBREP1

•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, tejido adiposo y músculo.

•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 y en hepatocitos muestran que SREBP1c es inducido por insulina.

•Los efectos de la insulina sobre la transcripción de SREBP1c son opuestos a los que ejerce el glucagón vía cAMP

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 95, pp. 5987-5992, May 1998
Biochemistry

Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refeed mice

(cholesterol biosynthesis/fatty acid biosynthesis/transgenic mice/transcriptional regulation)

JAY D. HORTON*, YURIY BASHMAKOV, IICHIRO SHIMOMURA, AND HITOSHI SHIMANO

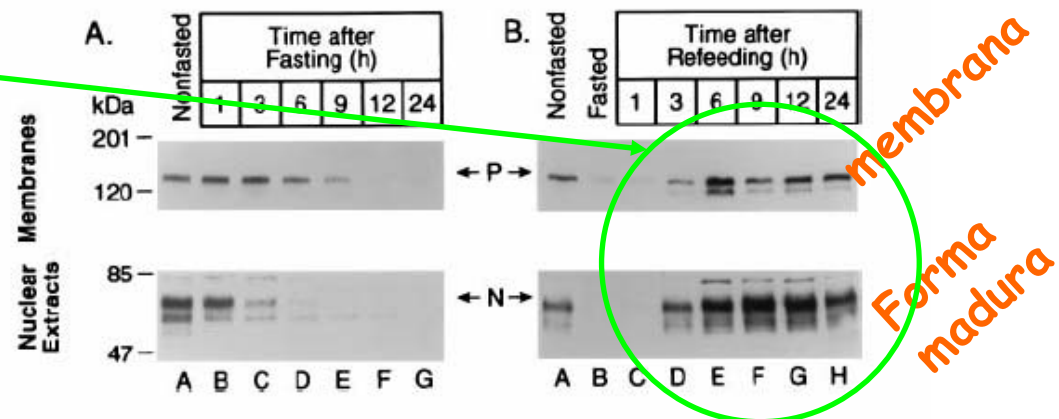
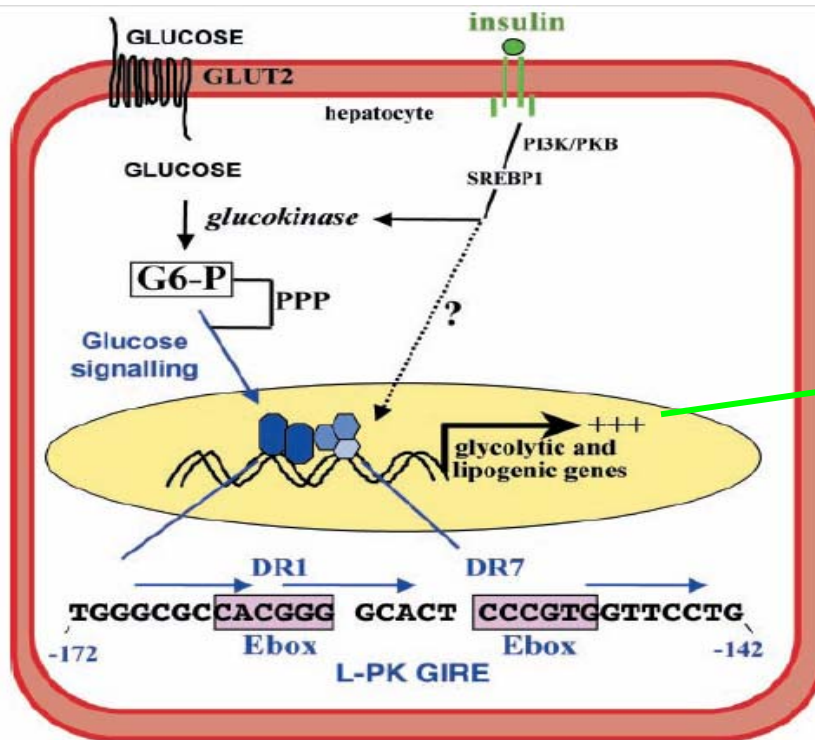


FIG. 2. Changes in SREBP-1 protein in the livers of mice at various times after fasting (A) and refeeding a high carbohydrate/low fat diet after 24-h fast (B). Livers from three 8-wk-old SJL male mice were pooled for each treatment group, and aliquots (30 μ g) of membranes (upper gels) and nuclear extracts (lower gels) were subjected to SDS/PAGE and electrophoretically transferred to a nitrocellulose filter. Immunoblot analysis was carried out with 5 μ g/ml rabbit anti-mouse SREBP-1 IgG. Bound antibodies were visualized as described in the text. Filters were exposed to film for 60 s. P and N denote the precursor and nuclear cleaved forms of SREBP-1, respectively.

Mecanismo de regulación propuesto de SBREP1

Posiblemente uno de los mecanismos de regulación transcripcional de SREBP1 sobre PYGL sea similar al encontrado para
 > FASN (fatty acid syntase) y PKLR (piruvato kinasa)



Son valores de expresión, no de actividad

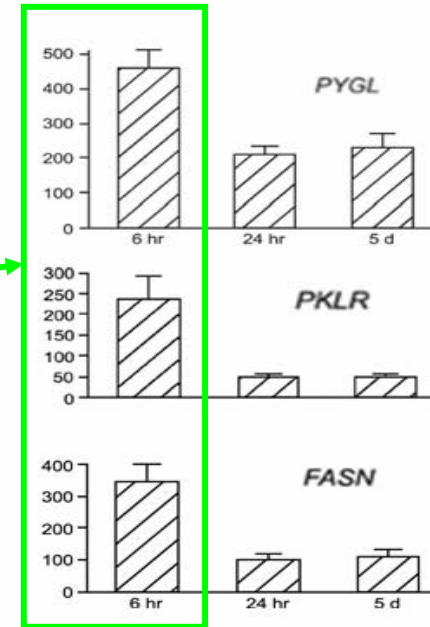


FIG. 2. Role of glucose and insulin in the transcriptional regulation of glycolytic and lipogenic genes in the liver. The involvement of the PI3K/protein kinase B (PKB) pathway in the insulin-dependent activation of the glucokinase gene transcription has been demonstrated recently (80). An overview of the functional DNA element (-144 to -172 base pairs from the start site of transcription of the rat L-PK gene) involved in the glucose-dependent regulation of the L-PK gene transcription is presented. The E boxes and direct repeat (DR1 and DR7) elements in the GIRE are indicated. PPP,

Glucose Regulation of Gene Transcription*

Published, JBC Papers in Press, August 8, 2000,
 DOI 10.1074/jbc.R000016200

Sophie Vaulton¹, Mireille Vasseur-Cognet, and Axel Kahn



¿TRANSFAC? ... tienen validez los resultados de la búsqueda?

TRANSFAC es una base de datos de factores de transcripción

- > Se puede buscar por nombre del gen regulador (SREBP)
- > o por secuencia etc

... se puede enviar una secuencia para que busque elementos reguladores (con diferentes opciones de búsqueda)

gene-regulation.com

> Home

> **Databases**

> Free Trials

> Programs

> Publications

> Subscriptions

> Events (BB Website)

> News (BB Website)

> Links

> About Us

Public Databases for Academic and Non-profit Organizations

TRANSFAC® 7.0 Public 2005

contains data on transcription factors, their experimentally-proven binding sites, and regulated genes. Its broad compilation of binding sites allows the derivation of positional weight matrices.

- Subscription benefits
- **>Search<** the TRANSFAC® Public database
- Classification
- Documentation
- Fungal Metabolic
- Pax factors in TRANSFAC®
- The green site of TRANSFAC®
- Quality Management in TRANSFAC®
- Tfbblast: Search Tool for Sequence Search in the TRANSFAC® Factor Table



TRANSFAC tienen validez los resultados de la búsqueda?

Buscar elementos reguladores en una secuencia ...

- 1.- Descargar la secuencia ... el trozo en donde queremos buscar el promotor.....
- 2.- Elegir búsqueda con BLASTX (nucleotidos)

TFBLAST - BLASTing the Sequences of the TRANSFAC Factor Table
Job Submission Form

BLAST TITLE	SEQUENCE TYPE	IDENTITY THRESHOLD	SCORE THRESHOLD	LENGTH THRESHOLD
TRANSFAC BLAST	Nucleotide	NO LIMIT	NO LIMIT	NO LIMIT

Enter or Paste ONE or MORE SEQUENCES in the Input Window
-- Preferred format is FASTA --

Max. 30000 characters possible in the input window!

```
>pygl_reg_1500kb
CTGAGCGGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGGGAGCTTGCAGTGAGCCAGATCGCCCACTGCACCTGCGCTGGGTA
ACAGAGTGAGACCCCTGTCTCAAAAACAAACAAATAAACTTAGAAGAATATATGTGACTATTGGCCGGCGCGGTGG
CTCAGCCCTGTAATCCAGCCCTTTGGGAGGGCGGAGCGGAGATCAGAGGTCAGGAGATAGAGACCATCTCGCTAA
CATGGTGA AACCTGTCTCTACTAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATGCGAGGTGGCGGGCGCTGTAGTCCAGC
TATTAGGAGGCTGAAGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGGGAGCTTGCAGTGAGCCAGATCGCCCACTGCACCT
CCAGCCTGGCCAAACAGATGAGACTCCGCTCTCAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAGG
AAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GACATCTAAAATGCCAAGTGTGGCTTTACCAAGGTTTAAAGCACACATAAACACCCATATTCAAAATACCAACCAAT
GGAGGTGCAAAAGATCAGCCGTGACCGCACAGTAACACAGACTGGGTTGTTTTTTGTAAGAAGGCCAAGTCCAGTGAG
```

RUN TFBLAST RESET FORM

c-Rel esta relacionado con la respuesta inmunitaria, Pax y Gx2 con el desarrollo embrionario, RXR es el receptor del acido retinoico

TRANSFAC BLAST

BLASTX 2.2.18 [Mar-02-2008]

Hits against TRANSFAC Factor Table
Minimum identity value: 0 %
Minimum score value: 0
Minimum sequence length: 0

pygl_reg_1500kb

Sequences producing significant alignments:	Reading Frame	High Score
T00168	c-Rel (Homo sapiens)	-3 33.1
T02369	Nab1 (Rattus norvegicus)	-2 32.7
T01827	Pax-8d (Homo sapiens)	-2 32.0
T04019	Gbx2 (Homo sapiens)	-2 31.6
T01826	Pax-8c (Homo sapiens)	-2 31.6
T01334	RXR-beta (Homo sapiens)	-2 31.6
T00211	EBN1-1 (Epstein-Barr virus)	+1 31.6
T01558	SREBP-1c (Homo sapiens)	-1 30.0
T01557	SREBP-1b (Homo sapiens)	-1 30.0
T01556	SREBP-1a (Homo sapiens)	-1 30.0
-----	-----	-----



TRANSFAC tienen validez los resultados de la búsqueda?

Buscar elementos reguladores en una secuencia ... ahora de PYGL

3.- Elegimos simple búsqueda con BLAST

TFBLAST - BLASTing the Sequences of the TRANSFAC Factor Table
Job Submission Form

BLAST TITLE	SEQUENCE TYPE	IDENTITY THRESHOLD	SCORE THRESHOLD	LENGTH THRESHOLD
TRANSFAC BLAST	Nucleotide	NO LIMIT	NO LIMIT	NO LIMIT

Enter or Paste ONE or MORE SEQUENCES in the Input Window
-- Preferred format is FASTA --

Max. 30000 characters possible in the input window!

```
>pygl_reg_1500kb
CTGAGCGGGGGAATGGCGTGAACCCGGGAGCGGAGCTTGCAGTGAAGCCAGATCGCGCCACTGCACCTCTGGCTGGGTA
ACAGAGTGAGACCCCTGTCTCAAAAAACAACAACAATAAATTAAGAAATATATGTGACTATTGGCCGGGGGGGGTGG
CTCACGCCTGTAATCCACGCCCTTTGGGAGCGCCGAGCGGGCGGAGATCAGAGGTCAGGAGATAGAGACCATCCTGGCTAA
CATGGTGAACCCCTGTCTCTACTAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATGCGAGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCACG
TATTCAGGAGGCTGAAGCAGGAGATGGCGTGAACCCGGGAGCGGAGCTTGCAGTGAAGCCAGATCGCGCCACTGCAC
CCAGCCTGGGCAACAGAGTGAGACTCCGCTCAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAA
AAAAAGAAAACTTAATCTGGCAATGGACTGTTTCTAAAAATAATATATTAATACTACTTAATGAGGAAGAAAAACCTCT
GACATCCTAAAAATGCCAAGTTTGGCCTTTACCAAGGTTTAAAGCACACATAAACACGCATATTCAAAATACCAACCAAGT
GGAGGTGCAAAAGATCAGCCTGTACCGCACAGTAACAGACTGGGTTGTTTTTTGTAAAGAAAGCCAACTAGTCCAGTGAG
```

RUN TFBLAST RESET FORM

TRANSFAC BLAST

BLASTX 2.2.18 [Mar-02-2008]

Hits against TRANSFAC Factor Table
Minimum identity value: 0 %
Minimum score value: 0
Minimum sequence length: 0

pygl_reg_1500kb

Sequences producing significant alignments:	Reading Frame	High Score
T00168	c-Rel (Homo sapiens)	-3 33.1
T02369	Nab1 (Rattus norvegicus)	-2 32.7
T01827	Pax-8d (Homo sapiens)	-2 32.0
T04019	Gbx2 (Homo sapiens)	-2 31.6
T01826	Pax-8c (Homo sapiens)	-2 31.6
T01334	RXR-beta (Homo sapiens)	-2 31.6
T00211	EBNA-1 (Epstein-Barr virus)	+1 31.6
T01558	SREBP-1c (Homo sapiens)	-1 30.0
T01557	SREBP-1b (Homo sapiens)	-1 30.0
T01556	SREBP-1a (Homo sapiens)	-1 30.0
.....

La búsqueda simple con BLASTX no es significativa iii... solo da una idea



TRANSFAC ... Como se hace?

Buscar elementos reguladores en la secuencia de PYGL

3.- Elegimos búsqueda con AliBaba ... Buscando únicamente motivos de la familia 1.3.2.3

>>> Solo hay un sitio y es de un factor similar a SBREP



AliBaba2.1

Prediction of transcription factor binding sites by constructing matrices on the fly from [TRANSFAC 4.0 sites](#).

```
>mRNA PYGL.fApr07, bp 1 to 948
ctctatttcagtgactgtcacaaagatcaagctagattttccaaa
gcttacctcttagactcaactcaagtaattatcagctgattggc
agatcactgt
aggaatcactaaaataactccttatgcaacttataaaatctagca
tagcattttaaatattatgagatggtatagcttcataaatttc
ctattccatt
tactttcatcactacttgaaatcagatcactgaaaaacctatgcaa
```

Paste pure sequence without header or simple fasta format for multiple sequences (>seqname).

PARAMETERS

Pairsim to known sites: 36 (lazy)
 Mat. width in bp: 10
 Min num of sites: 4
 Min mat. conservation: 70% (low)
 Sim. of seq to mat: 1%
 Factor class level: 5 (e.g. RAR-b'1)
 Optional:
 Search only one factor (e.g. T00320):
 Search only one class (e.g. 43.2.0): **1.3.1.3**
 Position offset in bp (e.g. 500):
 Output format: list

INFO
 Version 2
 What is i **1.3 Class: Helix-loop-helix / leucine zipper factors (bHLH-ZIP).**
 Samples for testing: [Promoters](#) and [Exons](#)

Sequence mRNA PYGL.fApr07bp1to948ctctatttcagtgactgt

```
=====
seq( 300.. 359)      cactttgggaggccgaggtggatggatcacgaggtcaggagatcgs
Segments:
1.3.1.2.2  325  334      =====USF=====
=====
```

- 1.3.1.2 Subfamily: USF
 - 1.3.1.2.1 SpF1 (sea urchin).
 - 1.3.1.2.2 USF (human); USF (rat); USF (mouse); USF (Kenyan clawed frog).
 - 1.3.1.2.3 USF2
 - 1.3.1.2.3.1 USF2a (human); USF2a (mouse); USF2a (rat).
 - 1.3.1.2.3.2 USF2b (human).
 - 1.3.1.2.3.3
- 1.3.1.3 Subfamily: SREBP
 - 1.3.1.3.1 SREBP-1 (rat).
 - 1.3.1.3.1.1 SREBP-1a (human); SREBP-1a (hamster).
 - 1.3.1.3.1.2 SREBP-1b (human).
 - 1.3.1.3.1.3 SREBP-1c (human).
 - 1.3.1.3.2 SREBP-2 (human); SREBP-2

Conclusiones finales

1. La glucógeno fosforilasa hepática esta **principalmente** regulada por mecanismos alostericos y metabolitos (metabolismo clásico).
2. Esta expresada de forma abundante en diferentes tejidos (sangre - vejiga - hígado). Hace presuponer que está regulada por diversos factores de transcripción.
3. Su actividad depende de la fosforilación por la fosforilasa quinasa y protein fosfatasa. **Por tanto puede estar expresada pero no activa.**
4. La regulación transcripcional de **PYGL** está regulada por factores de **transcripción regulados a su vez por ciclos circadianos** diferentes a **GYS2**.
5. Aunque su patrón de expresión se puede explicar mediante SBREP-1c, hasta el momento **no hay evidencia experimental** de que así sea.
6. Una búsqueda sencilla sobre TRANSFAC no es indicativo de regulación transcripcional



Reference List

1. Doi,R., Oishi,K., and Ishida,N. (2010) *CLOCK* regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of *Glycogen synthase 2*. *J.Biol.Chem.*
2. Horton,J.D., Bashmakov,Y., Shimomura,I., and Shimano,H. (1998) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refeed mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95,5987-5992.
3. Morgan,K.T., Jayyosi,Z., Hower,M.A., Pino,M.V., Connolly,T.M., Kotlenga,K., Lin,J., Wang,M., Schmidts,H.L., Bonnefoi,M.S., Elston,T.C., and Boorman,G.A. (2005) The hepatic transcriptome as a window on whole-body physiology and pathophysiology. *Toxicol.Pathol.*, 33,136-145.
4. Rawson,R.B. (2003) The SREBP pathway--insights from *Insigs* and insects. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 4,631-640.
5. Schisler,J.C., Charles,P.C., Parker,J.S., Hilliard,E.G., Mapara,S., Meredith,D., Lineberger,R.E., Wu,S.S., Alder,B.D., Stouffer,G.A., and Patterson,C. (2009) Stable patterns of gene expression regulating carbohydrate metabolism determined by geographic ancestry. *PLoS.One.*, 4,e8183.
6. Vaulont,S., Vasseur-Cognet,M., and Kahn,A. (2000) Glucose regulation of gene transcription. *J.Biol.Chem.*, 275,31555-31558.