

Abstract

Pyruvate carboxylase (PC) is a mitochondrial enzyme which converts pyruvate to oxaloacetate, one of important intermediates in the tricarboxylic acid cycle. As oxaloacetate is utilized as the precursor for many biosynthetic pathways including gluconeogenesis in liver and kidney, lipogenesis in liver and adipose tissue, neurotransmitter synthesis in astrocytes, dysregulation of PC expression is associated with metabolic syndrome including obesity and type 2 diabetes. Understanding regulation of PC will unravel molecular mechanisms underlying the above metabolic disorders, and may lead to the prevention of the disease as well as the development of new anti-diabetic drugs. This enzyme is also involved in the synthesis of coupling factor which supports insulin secretion in pancreatic β -cells. Here we dissected the molecular mechanisms underlying transcription control of PC in hepatocytes and in pancreas. Using AML12 hepatocyte cell line as the model for liver, we demonstrate that the proximal promoter of PC gene is directed by liver-enriched transcription factor, HNF4 α which binds to the novel HNF4-specific binding motif (H4-SBM), allowing the precise control of this promoter in a liver-specific manner. Using rat insulinoma INS-1 832/13 cell line as the model for pancreatic islets, we demonstrate that expression of PC in this cell type is regulated by complex glucose-responsive element (GRE), comprising multiple E-box located in the distal promoter of PC gene. Elevated concentration of glucose stimulates binding of three transcription factors, namely, the carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP), Specificity protein-1 (Sp1) and upstream stimulatory factor-2 (USF2) to the GRE. Suppression of these three transcription factors impairs glucose-mediated transcriptional induction of PC gene indicating the critical role of those proteins in regulation of PC expression. We also cloned and identified the distal promoter of the human PC gene and found that the cis-acting elements and the putative binding sites of general and tissue-specific transcription factors, as well as the GRE therein, are highly homologous to those of the rat PC gene. Metformin, an anti-diabetic drug which is thought to act by lowering elevated plasma glucose in type 2 diabetic patients did not show any inhibitory effect on PC expression in human hepatocyte cell line, HepG2. Our result together with the recent reports by other investigators, confirm that metformin does not lower plasma glucose through inhibition of gluconeogenic genes.

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (PC) เป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนสาร pyruvate ไปเป็น oxaloacetate ซึ่งเป็นตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ สาร oxaloacetate ถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาทางชีวเคมีในร่างกายได้แก่ การสร้างน้ำตาลในตับ การสร้างไขมันในตับและเนื้อเยื่อไขมัน การสร้างสารสื่อประสาทในระบบประสาท รวมทั้งเกี่ยวข้องกับการสร้าง coupling factor สำหรับใช้ในการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน ความผิดปกติในการควบคุมการสร้างเอนไซม์ PC จึงมีความเกี่ยวข้องกับโรคกลุ่มเมตาบอลิกซินโดรมได้แก่ ภาวะอ้วนและเบาหวานชนิดที่ 2 ดังนั้นการเข้าใจกลไกการควบคุมการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวในระดับยีนจึงมีความสำคัญในการนำไปสู่การเข้าใจพยาธิสภาพของการเกิดภาวะดังกล่าว และอาจนำไปสู่การป้องกันและพัฒนารักษาโรคเบาหวาน ในโครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนสร้างเอนไซม์ PC ในเซลล์ 2 ประเภทคือเซลล์ตับและตับอ่อนซึ่งเป็นอวัยวะที่ควบคุมการสร้างน้ำตาลและการลดระดับน้ำตาล จากการศึกษโดยใช้เซลล์ตับเพาะเลี้ยง AML12 พบว่ายีน PC ถูกควบคุมให้มีการแสดงออกจำเพาะในเซลล์ตับผ่านโปรตีนควบคุมคือ hepatocyte nuclear factor 4a ซึ่งทำงานโดยการจับกับลำดับตอบสนอง H4-SBM ในบริเวณโปรโมเตอร์

ด้านไกล์ ของยีน PC ทำให้ยีนนี้มีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์ตับ การทดลองยับยั้งการแสดงออกของ HNF4a ส่งผลให้มีการลดระดับการแสดงออกของ PC ในระดับ mRNA และโปรตีน จากการศึกษาในเซลล์ตับอ่อนเพาะเลี้ยง INS-1 832/13 พบว่าการแสดงออกของยีน PC ถูกควบคุมด้วยโปรตีนควบคุม 3 ตัวคือ carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP), specificity-protein 1 (Sp1) และ upstream stimulatory factor-2 (USF2) ทำงานร่วมกับโดยจับกับลำดับดีเอ็นเอทำหน้าที่เป็นตัวตอบสนองต่อกลูโคส (glucose-responsive element) (GRE) ประกอบด้วย E-box เรียบตัวติดกันในบริเวณโปรโมเตอร์ด้านไกล์ โดยคณะผู้วิจัยพบว่าระดับน้ำตาลความเข้มข้นสูงที่ 25 mM เร่งให้โปรตีนควบคุมทั้ง 3 ตัวดังกล่าวจับกับ GRE ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ายีนสังเคราะห์เอ็นไซม์ PC ในคนก็มีบริเวณควบคุมรวมถึง GRE คล้ายคลึงกับยีนของหนูเชื่อว่ากลไกการตอบสนองต่อระดับน้ำตาลในเลือดมีวิวัฒนาการเหมือนกับระหว่างคนและหนู ยารักษาเบาหวาน metformin ซึ่งเป็นยาออกฤทธิ์โดยลดระดับน้ำตาลในเลือดไม่มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของเอ็นไซม์ PC ในเซลล์ตับมนุษย์ HepG2 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวร่วมกับผลการวิจัยโดยกลุ่มวิจัยต่างประเทศอีกสองกลุ่มก็ให้ผลสอดคล้องกันคือ metformin ไม่ได้ยับยั้งการสร้างน้ำตาลผ่านขบวนการสร้างน้ำตาลจากเซลล์ตับ

Keywords: Pyruvate carboxylase, type 2 diabetes, gluconeogenesis, insulin secretion, transcriptional regulation, metformin, hyperglycemia