



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Isoformes de la lipoproteïna lipasa en humans.

Variacions en l'alletament i en l'obesitat.

Míriam Badia Villanueva



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- SenseObraDerivada 4.0.
Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - SinObraDerivada 4.0.
España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NoDerivatives 4.0.
Spain License.

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

**ISOFORMES DE LA LIPOPROTEÏNA
LIPASA EN HUMANS.
VARIACIONS EN L'ALLETAMENT I EN
L'OBESITAT.**

Míriam Badia Villanueva

Barcelona, 2019



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

ISOFORMES DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA EN HUMANS.

VARIACIONS EN L'ALLETAMENT I EN L'OBESITAT.

Memòria presentada per Míriam Badia Villanueva, llicenciada en Biologia, per
optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.
Programa de Doctorat en Biomedicina, bienni 2015-2017.

La interessada,

Míriam Badia Villanueva

Vist i plau dels directors,

Dra. M^a Dolores López Tejero
Professora Titular
Dept. Bioquímica i Biomedicina Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Dr. Albert Casanovas Torrequebrada
BioSystems S.A.

Barcelona, 2019

Als meus pares,
al Dani i
als meus fills.

Bufa! Si estic escrivint els agraïments de la tesi és que el final ja s'acosta. No sé com descriure els meus sentiments en aquest moment, són una barreja d'il·lusió, d'esperança, de neguit... però, sobretot, de felicitat. Tots sabeu l'esforç que ha representat, per mi, poder concloure la tesi doctoral. I n'estic orgullosa. He complert un dels meus somnis. Ara... a pel següent!

He de començar els agraïments per la Dolores i el Miquel. Ells han estat els meus pares científics i els hi dec la meva formació. Gràcies per totes les reunions, els ànims quan no sortia el que esperàvem, els vostres consells (científics o no)... però, sobretot, us he d'agrair infinitament que mai m'heu jutjat per decidir ser doctoranda i mare al mateix temps. Gràcies per la vostra confiança i paciència.

A ti Dolores, gracias por confiar en mí siempre y por ayudarme a no tirar la toalla. Para mí eres un gran referente, una mujer con un corazón enorme, fuerte y que late para y por la ciencia. Tengo que agradecerle tus numerosas dudas cuando mirábamos resultados, de ti he aprendido a tener más espíritu crítico. También agradezco todos los gazapos que has encontrado durante la escritura de esta tesis, ¡qué suerte contar con una busca gazapos tan buena como tú!

A tu Miquel, gràcies per donar-me la oportunitat de formar part del grup. Recordo les teves classes de Regulació del Metabolisme amb nostàlgia, m'inspiraves un gran respecte i, a dia d'avui, encara me n'inspires més. Si algun dia arribés a ser una dècima part de bona docent com ho ets tu, seria una gran mestra pels meus alumnes, de ben segur! Encara recordo el dia que vaig rebre el teu correu electrònic proposant-me fer una entrevista per formar part d'LPL, el cor em va fer un bot d'alegria! Que poc pensava, en aquell moment, que aquell correu m'obriria la oportunitat de realitzar aquesta tesi!

A la tercera persona que he d'agrair que avui pugui estar escrivint aquestes línies és a l'Albert. En els agraïments de la teva tesi em vas agrair que donés continuïtat a la teva recerca. Ara, em toca a mi donar-te les gràcies per haver-me ensenyat a "fer" ciència. Gràcies per haver-ho fet tot tan fàcil i entenedor, per com em vas transmetre els teus coneixements i el teu rigor científic. Has estat al meu costat en aquesta aventura des del principi fins al final, gràcies.

También quiero agradecer a Julia su inestimable ayuda siempre que la he necesitado, por tener siempre una respuesta a mis preguntas y por enseñarme que la radioactividad puede ser mi amiga si la trato con respeto. Eso sí, tengo que decirte que... ¡nunca seré capaz de realizar una valoración de actividad tan rápido como lo haces tú!

Ara em toca agrair totes les experiències viscudes i tots els bons dies passats a l'ànima del grup LPL, a la seva gent, a tots els LPLencs i LPLenques que en formen part.

He de començar per tu David. Et presentes a tu mateix com a cap del laboratori, però per a mi ets molt més que això, ets un gran mestre. Em fascina com trobes solucions a tots els problemes, això t'ho dona l'experiència i la teva ment oberta. Gràcies per ensenyar-me tant i fer-ho sempre amb un somriure i de manera totalment desinteressada. També gràcies per fer-me riure i per escoltar amb paciència totes les meves històries "particulars".

A tu Eva, gràcies per recolzar-me en tot moment i estendrem la mà sempre que ho he necessitat. Gràcies per acompanyar-me en els dies més importants de la meua vida i convertir-te en la meua amiga amiga, i que això duri per sempre.

A tu Pere, company de tesi, gràcies per haver compartit amb mi aquests anys rere la lleixa, em vas ensenyar a confiar en els altres (i això et ben asseguro no és fàcil!). No tinc paraules per agrair-te totes les valoracions d'activitat que em vas fer, sempre generós i disposat!

A tu Joana, gràcies per totes les xerrades mentre dinàvem, trobar algú que xerri més que jo no és fàcil, però amb tu vaig trobar una gran aliada! La següent de la llista ets tu, ànims que en breu també et trobaràs escrivint aquestes línies!

A tu Anna, callada i reservada però sempre amb una paraula amable, disposada a escoltar i a ajudar en el que calgui. Gràcies pels teus assenyats comentaris en tots els aspectes, científics o no.

He d'agrair també el meravellós tracte rebut per tot el personal del Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular. En especial, però, em permetreu que faci especial esment al Toni i a la Raquel. Tots dos m'heu ajudat sempre en tot en el que us he demanat (fins i tot treballant en un altre lloc) i us estic profundament agraïda. També voldria agrair a la Vanessa el seu treball com a eficient secretaria i a la Teresa el seu gran coneixement sobre tots els temes burocràtics.

Gràcies també a tot el professorat del Departament. En especial vull agrair a l'Octavi la oportunitat de realitzar les pràctiques de Bioquímica Estructural i la confiança dipositada en mi. També, vull agrair a en Josep Maria la oportunitat de formar part del professorat dels I tu?. Aquests cursos van resultar una font d'estímul per a mi. Per últim, vull agrair a la Neus el recolzament rebut aquests últims anys, gràcies per preocupar-te.

Voldria mostrar la meua enorme gratitud cap a en Xavier per haver-me cedit mostres per a aquesta tesi, gràcies per la teua bona disposició en tot moment.

He d'agrair també a la Carmen, de la Unitat Radiològica de la Facultat de Biologia, la seva disposició a donar-me un cop de mà sempre que ha calgut, posant a la meua disposició totes les eines i aparells de les que disposa la unitat. Gracias Carmen por nuestras conversaciones cuando bajaba a descontaminar, en el grupo sabían cuando bajaba, ¡pero nunca cuando volvería!

Gràcies també al Jordi, de l'Estabulari de la Facultat de Biologia, per facilitar sempre la feina. Voldria fer un especial esment a la Tere, la Marta i a tots i totes les treballadores de l'Estabulari de la Facultat de Farmàcia. Vaig estar poc temps com a becaria de l'estabulari, però em va fer sentir una més des del minut zero, gràcies pel vostre bon humor i per ensenyar-me tant en tan poc temps.

Per tots els membres del laboratori de proteòmica del CSIC-UAB només tinc paraules de gratitud. Gràcies en especial, Montse i Joaquín, per la vostra ajuda i per la confiança mostrada en vers la meua persona, sense vosaltres aquesta tesi no hagués estat possible.

Agraixo també la col·laboració desinteressada de l'Albin i el seu alt grau d'implicació. Sense l'enviament del substrat suïcida, sintetitzat pel seu grup de recerca, els resultats aconseguits no haguessin estat possibles. Voldria agrair també a la Sílvia i a la Carolina, de l'IDIBELL, l'ajut rebut amb el *Typhoon*.

Sortint de la Facultat de Biologia, però no de l'àmbit científic, he d'agrair aquests últims anys (en plena fase d'escriptura de la tesi) a tota la gent del grup d'Oncologia Molecular i Translacional de l'IDIBAPS. A tu Àngels, gràcies per donar-me la oportunitat de treballar amb tu i de poder descobrir el món de l'oncologia, han resultat uns anys motivadors i enriquidors. Gràcies per la confiança que m'has mostrat sempre. A tu Pere, gràcies per ser tan proper i ser un pou de ciència. Gràcies a tots els membres del laboratori: la Gemma, la Paloma, l'Anna, la Patri F., el Mario, la Patri J., la Darya, l'Aleix, la Leire, la Núria, l'Estel i el Raul per ser tots tan macos, pels nostres dinars al claustre (o on fos, us he d'agrair també les vostres fantàstiques rutes gastronòmiques), per donar-me un cop de mà sempre i per fer-me sentir tan i tan bé al laboratori (pensava que seria difícil superar el companyerisme d'LPL però vosaltres no us heu quedat pas enrere!). En especial, gracias Paloma por todos tus sabios consejos y por tu apoyo.

Fora de l'àmbit científic, he d'agrair als meus amics el seu suport i la seva preocupació per a aquest projecte encara que no l'hagin arribat a comprendre mai.

Gracias supernenas por vuestro apoyo, sin vosotras yo no sería quien soy. Me habéis escuchado pacientemente siempre que lo he necesitado y vuestras palabras de ánimo han sido claves en muchos momentos, lo sabéis. Gracias Sandra, Jessica, Miriam y Sam por ser las mejores amigas que una podría tener, a vuestra manera también habéis contribuido en esta tesis.

David y Ana, gracias por preguntar siempre: ¿qué tal va la tesis? pero sin llegar a agobiar nunca, por tener siempre unas palabras de ánimo y por vuestra preocupación. Gràcies per la vostra amistat sincera.

Finalment, escric els agraïments més importants. He de donar les GRÀCIES, en majúscules, a la meva família. Gràcies per la vostra paciència i per "aguantar" tots els meus estirabots i el meu mal humor quan les coses es torçaven.

Papa i mama, sense vosaltres aquesta tesi no hagués estat possible. Heu estat sempre al meu costat, m'heu recolzat en totes les meves decisions sense qüestionar-me-les mai, heu fet un gran esforç per a que jo estudiés i us dec tot el que sóc, tant a nivell acadèmic com personal. Gràcies per ajudar-me en la cria dels meus fills per a que jo pogués treballar, acabar la tesi i fer les cinquanta mil activitats que sempre m'embranco a fer. Sé que tinc la sort de tenir els millors pares del món i us estimo infinitament.

Dani, gracias por todos estos años compartidos y por los que nos quedan, por ser mi otra mitad, por apoyarme siempre y por soñar despierto conmigo. No puedo imaginar un mejor referente que tu para nuestros hijos, gracias por quererme tanto y por ser mi apoyo incondicional en esta tesis. Sin ti no la hubiera terminado. Te quiero.

Daniel i Èlia, vosaltres sou el motor de la meva vida. Gràcies per ensenyar-me a ser mare. Us estimo fins a la lluna i tornar.

I a la persona que sosté aquesta tesi entre les seves mans, gràcies per interessar-te per la meva recerca, desitjo que gaudeixis de la lectura i que hi trobis allò que busques.

MOLTES GRÀCIES A TOTS, DE TOT COR!

En la investigación, es incluso más importante el proceso que el logro mismo.

Emilio Muñoz.

La posibilidad de realizar un sueño, es lo que hace que la vida sea interesante.

Paulo Coelho.

RESUM	1
I. INTRODUCCIÓ.....	5
1.1 LIPOPROTEÏNA LIPASA.....	7
1.2 IMPLICACIONS PATOLÒGIQUES DE L'LPL	28
1.3 ISOFORMES DE PUNT ISOELÈCTRIC.....	35
II. OBJECTIUS GENERALS	41
III. MATERIALS I MÈTODES.....	45
IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ	93
4.1 ELS HUMANS PRESENTEN ISOFORMES DE PUNT ISOELÈCTRIC DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA?	95
4.2 ESTUDI FISIOLÒGIC: ALLETAMENT I LIPOPROTEÏNA LIPASA	105
4.3 ESTUDI PATOLÒGIC: OBESITAT I LIPOPROTEÏNA LIPASA.....	140
V. DISCUSSIÓ GLOBAL	193
VI. CONCLUSIONS.....	213
VII. APÈNDIX.....	217
VIII. BIBLIOGRAFIA	225

Índex de taules i figures	VII
Sigles i abreviatures	XIII
RESUM.....	1
I. INTRODUCCIÓ	5
1.1 LIPOPROTEÏNA LIPASA.....	7
1.1.1 Descobriment	7
1.1.2 Expressió i funció	7
1.1.3 Característiques moleculars	8
1.1.4 Síntesi, secreció i processament.....	13
1.1.5 Regulació fisiològica.....	17
1.1.6 Factors moleculars de regulació de l'LPL	20
1.1.6.1 Regulació traduccional (miRNA)	21
1.1.6.2 Regulació post-traduccional.....	21
1.2 IMPLICACIONS PATOLÒGIQUES DE L'LPL.....	28
1.2.1 Aterosclerosi	30
1.2.2 Síndrome metabòlica	31
1.2.3 Resistència a la insulina i diabetis	33
1.2.4 Alzheimer.....	33
1.2.5 Leucèmia limfocítica crònica	34
1.3 ISOFORMES DE PUNT ISOELÈCTRIC	35
1.3.1 Isoformes derivades de modificacions post-traduccionals	35
1.3.2 Isoformes de pI de l'LPL	36
1.3.3 Implicació funcional d'isoformes d'altres proteïnes	38
II. OBJECTIUS GENERALS	41
III. MATERIALS I MÈTODES	45
3.1 PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS EN RATA.....	48
3.1.1 Animals i condicions d'estabulació	48
3.1.2 Obtenció de plasma post-heparínic	48
3.1.3 Obtenció de teixits	49
3.1.4 Obtenció de llet.....	49

3.1.5 Model d'obesitat per dieta de cafeteria.....	50
3.1.6 Model d'obesitat per modificació genètica	50
3.2 PROCEDIMENTS PER A L'OBTENCIÓ DE MOSTRES HUMANES.....	53
3.2.1 Plasma post-heparínic	53
3.2.1.1 Objectiu de l'estudi i selecció de voluntaris	53
3.2.1.2 Obtenció de plasma post-heparínic.....	54
3.2.2 Llet.....	55
3.2.2.1 Objectiu de l'estudi i selecció de donants	55
3.2.2.2 Obtenció de llet.....	55
3.2.3 Teixit adipós blanc subcutani	56
3.2.3.1 Objectiu de l'estudi i selecció de voluntaris	56
3.2.3.2 Obtenció de teixit adipós subcutani d'individus control.....	57
3.2.3.3 Obtenció de teixit adipós subcutani d'individus obesos	57
3.3 DETERMINACIÓ DE METABÒLITS.....	58
3.3.1 Quantificació de proteïna total (PNT 0350600 EXP/016)	58
3.3.2 Quantificació de triacilglicèrids (PNT 0350600 EXP/007).....	59
3.3.3 Quantificació de glucosa	60
3.4 DETERMINACIÓ D'ACTIVITAT LIPOPROTEÏNA LIPASA (PNT 0350600 EXP/013).....	61
3.5 PURIFICACIÓ PARCIAL DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA MITJANÇANT CROMATOGRAFIA D'AFINITAT A HEPARINA- <i>SEPHAROSE</i>	66
3.6 DEPLECIÓ D'IMMUNOGLOBULINA-G	71
3.7 ELECTROFORESI I DETECCIÓ DE PROTEÏNES.....	72
3.7.1 Electroforesi SDS-PAGE (1DE) (PNT 0350600 EXP/017).....	72
3.7.2 Electroforesi bidimensional (2DE) (PNT 0350600 EXP/020).....	74
3.7.3 Tinció amb plata de proteïnes en gels de poliacrilamida (PNT 0350600 EXP/021).....	80
3.7.4 Immunodetecció de lipoproteïna lipasa per <i>Western blot</i> (PNT 0350600 EXP/017).....	82
3.8 ÀNALISI DE L'LPL PER ESPECTROMETRIA DE MASSES.....	84
3.8.1 Digestió de proteïnes en gel.....	84
3.8.2 Identificació per mapatge peptídic	85

3.8.3 Seqüenciació de pèptids per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem en trampa iònica	87
3.8.4 Cerca en bases de dades	88
3.8.4.1 Identificació de proteïnes per mapatge peptídic	88
3.8.4.2 Seqüenciació i identificació de proteïnes	88
3.9 GENERACIÓ DEL PATRÓ D'ISOFORMES DE L'LPL	89
IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ	93
4.1 ELS HUMANS PRESENTEN ISOFORMES DE PUNT ISOELÈCTRIC DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA?	95
4.1.1 Objectius	95
4.1.2 Plasma post-heparínic d'humans	96
4.1.3 Discussió	103
4.1.4 Conclusions	104
4.2 ESTUDI FISIOLÒGIC: ALLETAMENT I LIPOPROTEÏNA LIPASA	105
4.2.1 Objectius	107
4.2.2 Isoelectroenfocament	109
4.2.3 Llet humana	112
4.2.4 Aproximació per la caracterització funcional de les isoformes de l'LPL (alletament en rates)	118
4.2.4.1 Llet de rata	118
4.2.4.2 Glàndula mamària alletant de rata	122
4.2.4.3 Plasma post-heparínic de rates alletants i verges	125
4.2.5 Discussió	134
4.2.6 Conclusions	138
4.3 ESTUDI PATOLÒGIC: OBESITAT I LIPOPROTEÏNA LIPASA	140
4.3.1 Objectius	141
4.3.2 Obesitat mòrbida en humanes	143
4.3.2.1 Substrat suïcida / <i>Activity-based protein profiling</i>	143
A) Mètode del substrat suïcida	144
B) Adaptació del mètode del substrat suïcida	149
4.3.2.2 Estudi de les isoformes d'LPL en l'obesitat mòrbida	157
4.3.2.3 Discussió	161
4.3.3 Obesitat induïda per dieta de cafeteria	164

4.3.3.1 Coprecipitació amb BSA lliure d'àcids grassos	164
4.3.3.2 Estudi de les isoformes d'LPL en el model d'obesitat per dieta de cafeteria.....	166
4.3.3.3 Discussió.....	173
4.3.4 Obesitat induïda per modificació genètica	175
4.3.4.1 Caracterització del model genètic	175
4.3.4.2 Estudi de les isoformes d'LPL en el model per modificació genètica	182
4.3.4.3 Discussió.....	187
4.3.5 Conclusions.....	190
V. DISCUSSIÓ GLOBAL	193
VI. CONCLUSIONS	213
VII. APÈNDIX	217
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	225

Índex de taules i figures

Taula 1. Efectes hormonals sobre l'expressió i/o l'activitat LPL	20
Taula 2. Regulació de l'expressió i/o l'activitat de l'LPL a diferents nivells.....	21
Taula 3. Taula resum dels criteris i els estadis de severitat KOSC.....	32
Taula 4. Classificació dels individus normopès, amb sobrepès i obesos segons el BMI	33
Taula 5. Programes per a l'isoelectroenfocament	78
Taula 6. Proteïnes identificades per PMF com a IgG en plasma post-heparínic humà, a taques del gel A de la Figura 26	100
Taula 7. Proteïnes identificades per PMF o LC-MS/MS com a LPL en plasma post-heparínic humà, a taques del gel B de la Figura 26.....	101
Taula 8. Composició de la llet humana, murina i bovina	135
Taula 9. Pes corporal i pes del teixit adipós blanc epididimal i retroperitoneal en rates Zucker mascle a les 15 setmanes de vida	178
Taula 10. Resum de la caracterització del model Zucker a 5 i 15 setmanes de vida	182

Figura 1. Localització endotelial de l'LPL	7
Figura 2. Models del dímer de l'LPL	10
Figura 3. Dominis funcionals de l'LPL	12
Figura 4. Síntesi, secreció i transport de l'LPL	14
Figura 5. Procés d'N-glicosilació de l'LPL a l'RE i al Golgi	16
Figura 6. Principals estímuls fisiològics que regulen l'activitat LPL en diversos teixits	18
Figura 7. Diverses mutacions al domini Ly6 de la GPIHBP1 associades a hipertriacilgliceridèmia en humans resulten en dímer o multimeritzacions de la proteïna incapacitant-la per transportar l'LPL a la superfície luminal de l'endoteli dels capil·lars	23
Figura 8. Estructura del complex LPL-GPIHBP1	23
Figura 9. Metagel de la proteïna DJ-1	39
Figura 10. Extracció manual de llet de rata	49
Figura 11. Diferències de mida i de quantitat de greix entre <i>Zucker lean</i> i <i>fafa</i>	51
Figura 12. Mesura de la longitud d'una rata	52
Figura 13. Homogenats de teixit	69
Figura 14. Muntatge i components de la cromatografia d'heparina- <i>Sepharose</i>	70
Figura 15. Pas de la mostra per la columna de cromatografia d'heparina- <i>Sepharose</i>	70
Figura 16. Esquema del muntatge per la primera dimensió	78
Figura 17. Esquema del muntatge per l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (segona dimensió)	80
Figura 18. Representació del procés d'ionització amb una font d'ionització/desorció per làser assistida per matriu	86
Figura 19. Metodologia de treball per mantenir la referència de pH en les 2DE-WB	90
Figura 20. Quantificació de la quantitat relativa de cada isoforma	91
Figura 21. Exemple de patró d'isoformes de pI de l'LPL	91
Figura 22. Activitat LPL als plasmes post-heparínics humans	96
Figura 23. Activitat LPL als plasmes pre- i post-heparínics humans	97
Figura 24. Purificació parcial de l'LPL de plasma post-heparínic humà mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	98
Figura 25. Isoformes de pI de l'LPL de plasma post-heparínic humà	99

Figura 26. Identificació d'isoformes de pI de l'LPL de plasma post-heparínic humà deplecionat d'IgG	100
Figura 27. pI i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el plasma post-heparínic humà	102
Figura 28. Aparell Multiphor II Electrophoresis System	110
Figura 29. Isoelectroenfocament de les isoformes de pI de l'LPL i de l'EPO utilitzant dos gels de poliacrilamida amb gradients de pH diferents	111
Figura 30. Activitat LPL de llet humana	112
Figura 31. Purificació parcial de l'LPL de llet humana mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	113
Figura 32. Efecte de la incubació amb anticòs anti-LPL sobre l'activitat lipasa en l'homogenat (A) i en fraccions recollides en el procés de purificació de l'LPL (B) de llet humana	115
Figura 33. Isoformes de pI de l'LPL de llet humana	116
Figura 34. Identificació de les isoformes de pI de l'LPL de llet humana	117
Figura 35. pI i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de llet humana ..	118
Figura 36. Activitat LPL de llet de rata	119
Figura 37. Purificació parcial de l'LPL de llet de rata mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	120
Figura 38. Isoformes de pI de l'LPL de llet de rata	121
Figura 39. pI, pes molecular aparent i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de llet de rata (relacionat amb la Figura 38.)	122
Figura 40. Purificació parcial de l'LPL de glàndula mamària de rata alletant mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	123
Figura 41. Identificació de les isoformes de pI de l'LPL de glàndula mamària de rata alletant	124
Figura 42. pI, pes molecular aparent i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de glàndula mamària alletant de rata (relacionat amb la Figura 41.)	125
Figura 43. Purificació parcial de l'LPL de plasma post-heparínic de rata femella (verge i alletant) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	126
Figura 44. Isoformes de pI de l'LPL de plasma post-heparínic de rata femella (verge i alletant)	127

Figura 45. pI, pes molecular aparent i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de plasma post-heparínic de rata femella (verge i alletant) (relacionat amb la Figura 44.)	129
Figura 46. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el model d'alletament en rata	131
Figura 47. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de plasma post-heparínic de rates mascle i femella	133
Figura 48. Esquema de la reacció d'un substrat suïcida amb un enzim serina hidrolasa	145
Figura 49. Estructura química de la sonda fluorescent NBD-D-HP	145
Figura 50. Aplicació de la tècnica del substrat suïcida per a lipases en homogenats de teixit	149
Figura 51. Estudi de l'activitat esterasa de la BSA i de l'estabilitat de l'activitat lipolítica de les lipases en tampó d'eluïts de cromatografia d'afinitat d'heparina- <i>Sepharose</i> pel mètode del substrat suïcida	151
Figura 52. Estudi de l'activitat LPL en eluït de cromatografia d'afinitat d'heparina- <i>Sepharose</i> a concentracions creixents d'NaCl i en absència o presència de BSA	153
Figura 53. Detecció de l'LPL mitjançant substrat suïcida	154
Figura 54. Detecció d'isoformes de pI de l'LPL mitjançant substrat suïcida	155
Figura 55. Estudi de l'autofluorescència de les isoformes de pI de l'LPL mitjançant substrat suïcida	156
Figura 56. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc subcutani de dones control (A) i obeses (B) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	158
Figura 57. Detecció d'isoformes de pI de l'LPL de teixit adipós blanc subcutani d'humans control i obeses mitjançant <i>Western blot</i> , substrat suïcida i tinció amb plata	159
Figura 58. pI, pes molecular i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL trobades en el teixit adipós blanc subcutani de dones control (A) i obeses (B) (relacionada amb la Figura 57.)	160
Figura 59. Coprecipitació de proteïnes amb o sense BSA	166
Figura 60. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc retroperitoneal de rates femella control (A) i obeses per dieta de cafeteria (B) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	167

Figura 61. Isoformes de pI de l'LPL de teixit adipós blanc retroperitoneal de rates femella control (A) i obeses per dieta de cafeteria (B)	168
Figura 62. pI, pes molecular i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rates femella control (A) i obeses per dieta de cafeteria (B) (relacionada amb la Figura 61.)	170
Figura 63. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rates mascle (A) i femella (B)	172
Figura 64. Evolució del pes corporal en rates Zucker mascle	176
Figura 65. Evolució d'ingesta i consum d'aigua per gàbia en rates Zucker mascle	177
Figura 66. Activitat LPL dels teixits adiposos epididimals i retroperitoneals de les rates Zucker mascle	179
Figura 67. Nivells de triacilglicèrids en plasma a rates Zucker mascle	180
Figura 68. Correlació dels nivells de TAG amb l'índex de massa corporal i amb el pes corporal de rates Zucker mascle	180
Figura 69. Evolució de la glucèmia a les rates Zucker mascle de les 7 a les 15 setmanes de vida	181
Figura 70. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc retroperitoneal de rata mascle Zucker <i>lean</i> (A) i <i>fafa</i> (B) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	183
Figura 71. Detecció d'isoformes de pI de l'LPL de teixit adipós blanc retroperitoneal de rata Zucker <i>fafa</i> i <i>lean</i> mitjançant <i>Western blot</i> , substrat suïcida i tinció amb plata	185
Figura 72. pI, pes molecular i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rata Zucker mascle <i>lean</i> (A) i <i>fafa</i> (B) (relacionada amb la Figura 71.)	186
Figura 73. Comparativa del pI i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el plasma post-heparínic de rates mascle (A) i homes (B)	196
Figura 74. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rates femella obeses per dieta de cafeteria (A), rates mascle obeses per modificació genètica (B) i dones obeses mòrbides (C)	203
Figura 75. Comparativa del pI, pes molecular i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc epididimal (A) i en el retroperitoneal (B) de rata	208

Figura 76. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rates mascle de la soca Wistar control (A) i de la soca Zucker *lean* (B)210

Sigles i abreviatures

1DE	electroforesi unidimensional (1-Dimensional gel Electrophoresis)
2DE	electroforesi bidimensional (2-Dimensional gel Electrophoresis)
ABP	sondes basades en activitat (Activity-Based Probes)
ABPP	perfil de proteïnes basat en l'activitat (Activity-Based Protein Profiling)
ACN	acetonitril
AD	malaltia d'Alzheimer (Alzheimer Disease)
Angptl	semblants a les angiopoietines (Angiopoietin-like)
apo	apolipoproteïna
BAT	teixit adipós marró (Brown Adipose Tissue)
BMI	índex de massa corporal (Body Mass Index)
BSA	albúmina sèrica bovina (Bovine Serum Albumin)
BSSL	lipasa estimulada per sals biliars (Bile Salt Stimulated Lipase)
CLL	leucèmia limfocítica crònica (Chronic Lymphocytic Leukemia)
Da	Dalton
DM	Diabetis Mellitus
DNA	àcid desoxiribonucleic (DeoxyriboNucleic Acid)
DTT	DiThioThreitol
EE	endosoma primerenc (Early Endosome)
EL	lipasa endotelial (Endothelial Lipase)
EPO	eritropoietina
ER	element de reconeixement
RE	reticle endoplasmàtic (Endoplasmic Reticulum)
ESI	ionització per electroesprai (ElectroSpray Ionization)
eWAT	teixit adipós blanc epididimal (Epididimal White Adipose Tissue)
GPIHBP1	GlycosylphosPhatidylInositol-anchored High density lipoprotein Binding Protein 1
GR	grup reactiu
HDL	lipoproteïna d'alta densitat (High-Density Lipoprotein)
HL	lipasa hepàtica (Hepatic Lipase)
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució (High Performance Liquid Chromatography)
HS	heparina-Sepharose
HSPG	proteoglicà de tipus heparan sulfat (Heparan Sulfate ProteoGlycan)

IAA	iodoacetamida
IDL	lipoproteïna de densitat intermèdia (<i>Intermediate-Density Lipoprotein</i>)
IEF	isoelectroenfocament (<i>IsoElectric Focusing</i>)
IgG	immunoglobulina G
IPG	gradient immobilitzat de pH (<i>Immobilized pH Gradient</i>)
LC-MS/MS	cromatografia líquida capil·lar acoblada a espectrometria de masses en tàndem (<i>Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i>)
LDL	lipoproteïna de baixa densitat (<i>Low-Density Lipoprotein</i>)
LE	endosoma tardà (<i>Late Endosome</i>)
LMF1	factor madurador de lipases 1 (<i>Lipase Maturation Factor 1</i>)
LPL	lipoproteïna lipasa
LPS	lipopolisacàrid
LRP	proteïna relacionada amb el receptor de les LDL (<i>Low density lipoprotein receptor-Related Protein</i>)
MALDI	ionització/desorció per làser assistida per matriu (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
miRNA	micro àcid ribonucleic (micro RiboNucleic Acid)
mRNA	àcid ribonucleic missatger (messenger RiboNucleic Acid)
MS	espectrometria de masses (<i>Mass Spectrometry</i>)
MW	pes molecular (<i>Molecular Weight</i>)
mWAT	teixit adipós blanc mesentèric (<i>Mesenteric White Adipose Tissue</i>)
MWM	patró de pesos moleculars (<i>Molecular Weight Marker</i>)
NEFA	àcid gras no esterificat (<i>Non-Esterified Fatty Acid</i>)
NO	òxid nítric (<i>Nitric Oxide</i>)
PHP	plasma post-heparínic (<i>Post-Heparin Plasma</i>)
pI	punt isoelectric
PL	lipasa pancreàtica (<i>Pancreatic Lipase</i>)
PMF	mapatge peptídic (<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>)
PPAR	receptors activadors de la proliferació de peroxisomes (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>)
PTM	modificació post-traducciona (<i>Post-Translational Modification</i>)
pWAT	teixit adipós blanc periovàric (<i>Periovaric White Adipose Tissue</i>)
QM	quilomicro
rWAT	teixit adipós blanc retroperitoneal (<i>Retroperitoneal White Adipose Tissue</i>)
scWAT	teixit adipós blanc subcutani (<i>Subcutaneous White Adipose Tissue</i>)

SDS	dodecil sulfat sòdic (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
Sel1L	Sel-1 <i>suppressor of lin-12 Like protein</i>
smFRET	single-molecule Förster Resonance Energy Transfer
SorLA	receptor relacionat amb la sortilina (Sortilin-related receptor)
SS	substrat suïcida
TAG	triacilglicerol
Tag	agent de detecció
TCA	àcid tricloroacètic (TriChloroAcetic acid)
TFA	àcid trifluoroacètic (TriFluoroAcetic acid)
TGN	xarxa dels trans Golgi (Trans-Golgi Network)
TLGS	subfamília gènica de lipases de triacilglicèrids (Triglyceride Lipase Gene Subfamily)
TNF α	factor de necrosi tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor α)
TO	trioleïna
TO*	trioleïna marcada amb ^3H (triti)
TOF	temps de vol (Time Of Flight)
TRL	lipoproteïnes riques en TAG (Triglyceride-Rich Lipoproteins)
VLDL	lipoproteïna de molt baixa densitat (Very Low Density Lipoprotein)
vWAT	teixit adipós blanc visceral (Visceral White Adipose Tissue)
WAT	teixit adipós blanc (White Adipose Tissue)
WB	Western Blot

RESUM

La **lipoproteïna lipasa (LPL)** és un enzim àmpliament distribuït a l'organisme i, aquest fet li confereix un rol central en el metabolisme lipídic. La seva funció principal és la hidròlisi dels triacilglicèrids (TAG) de les lipoproteïnes circulants. D'aquesta hidròlisi s'alliberen àcids grassos no esterificats que seran captats pels teixits on seran utilitzats en funció del context fisiològic. L'enzim se sintetitza principalment al teixit adipós, al cor, al múscul esquelètic i a la glàndula mamària alletant. En la seva forma madura i activa, l'LPL és un dímer que és secretat per les cèl·lules parenquimals del teixit on es localitza i és transportat fins a la llum dels vasos on exercirà la seva funció.

En estudis anteriors del nostre grup de recerca, es va trobar que l'LPL de cor i de plasma post-heparínic (PHP) de rata presenten isoformes del mateix pes molecular (MW) aparent però diferent punt isoelèctric (pI). Es van estudiar els possibles orígens de l'heterogeneïtat de pI d'aquestes isoformes arribant a les següents conclusions: (i) les isoformes de l'LPL no corresponen a formes intermèdies de maduració intracel·lular i (ii) l'origen no es pot atribuir a fosforilacions de la proteïna però, en part, sí que es pot explicar per diferents graus de glicosilació.

En aquesta tesi, ens vàrem proposar estudiar si l'**espècie humana** també presenta isoformes de pI de l'LPL. Hem comprovat per primera vegada que, tant el PHP, com la llet i el teixit adipós blanc (WAT) subcutani d'humans presenten isoformes de l'LPL. A més, hem descartat que l'origen molecular de les isoformes humanes sigui degut a variacions al·lèliques o provinquin de diferents òrgans, estudiant les isoformes provinents d'un únic teixit d'un sol individu.

A més, hem ampliat l'estudi de la distribució tissular de les isoformes de l'LPL en rata demostrant per primera vegada que, en alguns fluids i teixits de rata (llet, PHP de femella i WAT retroperitoneal), coexisteixen, juntament amb les **isoformes de pI** de l'LPL, **isoformes de MW aparent**. Hem postulat que podrien tenir el seu origen molecular en modificacions post-traduccionals, concretament, en la glicosilació. Cal destacar també en rates que el patró d'isoformes de l'LPL divergeix segons el gènere i el tipus de WAT.

En aquest treball, també, ens vam proposar avançar en la caracterització funcional de les isoformes de l'LPL d'una manera indirecta, ja que actualment no disposem d'eines per estudiar cada isoforma (de pI o de MW) per separat. Així, vàrem estudiar si el patró d'isoformes de l'LPL varia en situacions fisiològiques (**alletament**) i patològiques (**obesitat**) en les quals l'activitat de l'enzim està altament regulada.

Donada la impossibilitat d'obtenir glàndula mamària alletant humana, vàrem estudiar les isoformes de l'LPL en rata alletant. En aquest model hem vist que els patrons de les isoformes dels fluids i teixit estudiats (llet, PHP i glàndula mamària) divergeixen en els seus pI, MW aparents i quantitats relatives. Probablement aquestes variacions tinguin algun significat fisiològic.

També hem comparat els patrons de les isoformes de l'LPL del WAT subcutani d'individus normopès i d'individus obesos. Degut a la dificultat d'obtenir WAT visceral d'humans normopès, vàrem ampliar l'estudi a dos models murins d'obesitat: induïda per dieta de cafeteria i per modificació genètica. Dels resultats concloem que en l'obesitat les isoformes de l'LPL tendeixen a tenir una major representació en la zona bàsica del rang de pH.

Complementant la caracterització funcional, ens vam plantejar estudiar si les diferents isoformes presenten diferències d'activitat lipolítica. Gràcies a la posada al punt del mètode del substrat suïcida per lipases i a la seva adaptació al nostre enzim, podem concloure que **totes les isoformes** de l'LPL, purificada parcialment mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose*, **són actives**.

L'LPL és una proteïna complexa i calen més aproximacions, tant a nivell molecular com funcional, per comprendre el sentit biològic de les seves isoformes.

I. INTRODUCCIÓ

1.1 LIPOPROTEÏNA LIPASA

1.1.1 Descobriment

La glicoproteïna **lipoproteïna lipasa (LPL; EC 3.1.1.34)** la va descobrir l'any 1943 l'investigador Hahn [2] quan va observar que es produïa una ràpida disminució de la hiperlipèmia, associada a l'absorció de lípids provinents de la dieta, amb una injecció intravenosa d'heparina. Aquest factor va resultar ser un enzim lipolític amb característiques antiquilomicronèmiques [3]. Van anomenar, en un inici, a l'LPL com factor aclaridor lipasa activat per heparina [4]. No va ser fins al 1955, quan Korn *et al.* [5] van aconseguir purificar aquest factor a partir de l'homogeneïtzació de cor de rata, que es va anomenar l'enzim com el coneixem, lipoproteïna lipasa.

1.1.2 Expressió i funció

L'LPL s'expressa principalment al cor, la musculatura esquelètica i el teixit adipós. Es pot trobar en altres teixits com per exemple: els pulmons, la glàndula mamària alletant, el cervell, el fetge, les glàndules adrenals, el pàncrees, la melsa i els ronyons [6]. També s'expressa en els macròfags [7]. L'LPL es troba, de manera dimèrica i activa, a la superfície luminal de l'endoteli capil·lar dels teixits unida a proteoglicans de tipus heparan sulfat (HSPG) i a la *glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding protein 1* (GPIHBP1) [8] tenint aleshores accés a les lipoproteïnes circulants (Figura 1.).

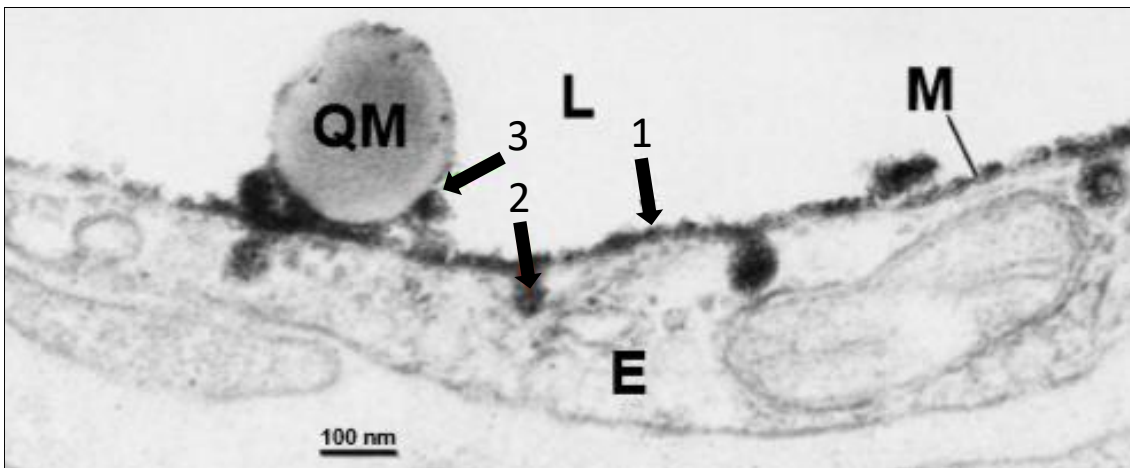


Figura 1. Localització endotelial de l'LPL. Imatge obtinguda per microscòpia electrònica, mitjançant un assaig immunocitoquímic, on es mostra la localització funcional de l'LPL a l'endoteli capil·lar. L'LPL es detecta a la superfície luminal de l'endoteli (1), a invaginacions de la membrana plasmàtica (2) i associat a una partícula lipídica de la mida d'un quilomicro (QM) (3). E, Endoteli capil·lar; L, Llum del capil·lar; M, Membrana plasmàtica. Figura adaptada de Pedersen *et al.* [9].

La funció principal de l'LPL és la d'hidrolitzar els triacilglicèrids (TAG) de les lipoproteïnes riques en TAG com els QM i les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) provinents de la ingesta i del fetge, respectivament.

Com a producte resultant d'aquesta hidròlisi es produeixen QM romanents, lipoproteïnes de densitat intermèdia (IDL) i lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), alliberant àcids grassos no esterificats (NEFA) per a la seva captació per part dels teixits que els utilitzen com a font d'energia o els emmagatzemen [6]. Els QM i les VLDL, contenen en el seu nucli, recobert per una monocapa fosfolipídica i amb apolipoproteïnes, TAG i èsters de colesterol. Les apolipoproteïnes estan involucrades en el transport i la distribució dels lípids entre cèl·lules i teixits, regulant el metabolisme de les lipoproteïnes i, per tant, també el metabolisme lipídic. Les apolipoproteïnes fan la seva funció reguladora a través del seu rol com a cofactors d'enzims involucrats en el metabolisme lipídic o bé a través del manteniment de l'estructura de les lipoproteïnes [10]. Bengtsson-Olivecrona i Olivecrona, van descriure que l'LPL també té activitat fosfolipasa [11]. A l'LPL també se li associa una funció secundària no enzimàtica: facilitar la captació de partícules de lipoproteïnes cap als teixits ancorant-les a les parets dels vasos i servint com a lligant pels receptors d'aquestes lipoproteïnes [7].

1.1.3 Característiques moleculars

El gen de l'LPL en humans es localitza al cromosoma 8p22 i conté 10 exons (uns 30000 parells de nucleòtids (30 kb)) i 9 introns (uns 6000 parells de nucleòtids (6 kb)) [12, 13]. El gen codifica 448 aminoàcids amb 27 aminoàcids de pèptid senyal [14]. La llargada dels nou primers exons està dins la normalitat pels gens de mamífers, en canvi, el desè exó té una llargada inusualment superior [15]. El primer exó codifica la regió 5' no traduïda de 188 nucleòtids i la totalitat del pèptid senyal a més dels dos primers aminoàcids de la proteïna madura. El desè exó codifica la regió 3' no traduïda de 1948 nucleòtids i els 8 exons centrals codifiquen els 446 aminoàcids restants [16]. El segon exó codifica el domini que uneix l'LPL al seu substrat. El quart exó codifica el domini que conté l'aminoàcid serina i els residus aminoacídics dels extrems que han estat identificats com la regió d'unió lipídica. El cinquè exó codifica la seqüència Gly¹⁵⁴-Gly²³¹ de la proteïna madura la qual està involucrada en el procés catalític. El sisè i novè exó codifiquen les seqüències que són relativament riques en aminoàcids bàsics i, per tant, estan involucrades en l'ancoratge de l'enzim a l'endoteli dels capil·lars per la interacció amb els dominis àcids dels HSPG [6]. El desè exó conté dos senyals de poliadenilació que resulten en dos àcids ribonucleics missatgers (mRNA) de mides diferents, 3,35 i 3,75 kb [17]. En humans, s'ha descrit que, depenent del teixit, trobem un o els dos trànscrips, concretament en el múscul un i en el teixit adipós dos. Wion *et al.* [18], postulen que aquesta diferència en la mida del trànscrip segons el teixit podria implicar alguna diferència funcional ja que el trànscrip més llarg (trobat en múscul preferencialment) té una traducció més eficient. En rata, només s'ha descrit l'expressió del trànscrip llarg [18].

La seqüència aminoacídica de l'LPL està altament conservada entre diferents espècies (un 90% o més en mamífers) [19]. S'han descrit regions conservades entre diferents espècies de vertebrats (humana, murina, primat, gos, cavall, vaca, granota, etc.) relacionades amb la triada catalítica

del centre actiu de l'enzim, la tapa del centre actiu i el domini d'unió a lipoproteïnes [20].

L'mRNA de l'LPL en humans codifica una proteïna madura de 448 aminoàcids amb un pes molecular (MW) calculat de 50,4 kDaltons (Da). A aquest pes calculat de manera teòrica se li ha d'afegir un increment del MW al voltant del 8% degut a les glicosilacions de l'enzim [21].

L'LPL, juntament amb la lipasa hepàtica (HL) i la lipasa endotelial (EL), conformen la subfamília gènica de les lipases de triacilglicèrids (TLGS) [22]. Aquestes lipases es diferencien en la seva expressió gènica específica de teixit i en l'especificitat del seu substrat. Així, l'LPL es troba majoritàriament expressada a teixits adiposos i múscul mentre que l'HL s'expressa a fetge i l'EL a les cèl·lules endotelials vasculares, a les cèl·lules epitelials tiroïdals i als hepatòcits. Pel que fa al seu substrat, l'LPL principalment hidrolitza els TAG dels QM i de les VLDL, mentre que l'EL té una elevada activitat fosfolipasa en les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) i menys capacitat d'hidrolitzar TAG. L'HL té la mateixa capacitat hidrolítica en els TAG, en els fosfolípids de les lipoproteïnes romanents i en les HDL [22]. La lipasa pancreàtica (PL) pertany a la família de les lipases de triacilglicèrids i té una relació gènica molt propera a la TLGS [23], concretament la similitud de la seva seqüència gènica comparada amb la de les tres lipases, entre elles l'LPL, és d'un 30% aproximadament [24].

En l'actualitat, encara no s'ha aconseguit determinar per cristal·lografia de raigs X l'estructura molecular de l'LPL [25]. Aprofitant la similitud entre les lipases LPL i PL, Van Tilbeurgh *et al.* l'any 1994 van proposar una primera estructura tridimensional per l'LPL basant-se en la trobada per la PL per cristal·lografia de raigs X [24]. Fins ara, el model d'estructura tridimensional acceptat per al dímer de l'LPL era l'obtingut mitjançant el sistema de modelatge molecular INSIGHT II i va ser proposat per Kobayashi *et al* [26]. Per a generar aquest model dimèric van superposar els monòmers de l'LPL sobre l'estructura dimèrica cristal·lografiada de la PL. El model mostra els monòmers en una configuració cap-cua (*head-to-tail*) amb ambdues tapes del centre actiu posicionades a la mateixa cara del complex (Figura 2. veure model Kobayashi).

L'any 2018, Hayne *et al.* [25], mitjançant la tècnica *single-molecule Förster resonance energy transfer* (smFRET), van proposar un nou model estructural per l'LPL. Aquesta tècnica permet estudiar les interaccions proteïna-àcid desoxiribonucleic (DNA) i proteïna-proteïna, concretament, permet estimar les distàncies entre les proteïnes de manera individual o entre complexes proteics que han estat units prèviament amb dos fluoròfors diferents que són capaços de transferir energia a través de les interaccions dipol-dipol. Hayne *et al.* van fer algunes crítiques al model original proposat per Kobayashi *et al.* basat en l'estructura de la PL: (i) el lloc d'unió de l'apolipoproteïna CII (apo CII) no està exposat en la superfície del dímer de l'LPL, (ii) les tapes del dímer xoquen si ambdues estan obertes, (iii) dues mutacions (R75A i G188E) que fan que l'LPL sigui secretada com a monòmer i no dimeritzi no es troben al lloc de contacte

entre els dímers, i (iv) les distàncies entre alguns residus que tenen un paper important en la unió a heparina no són coincidents.

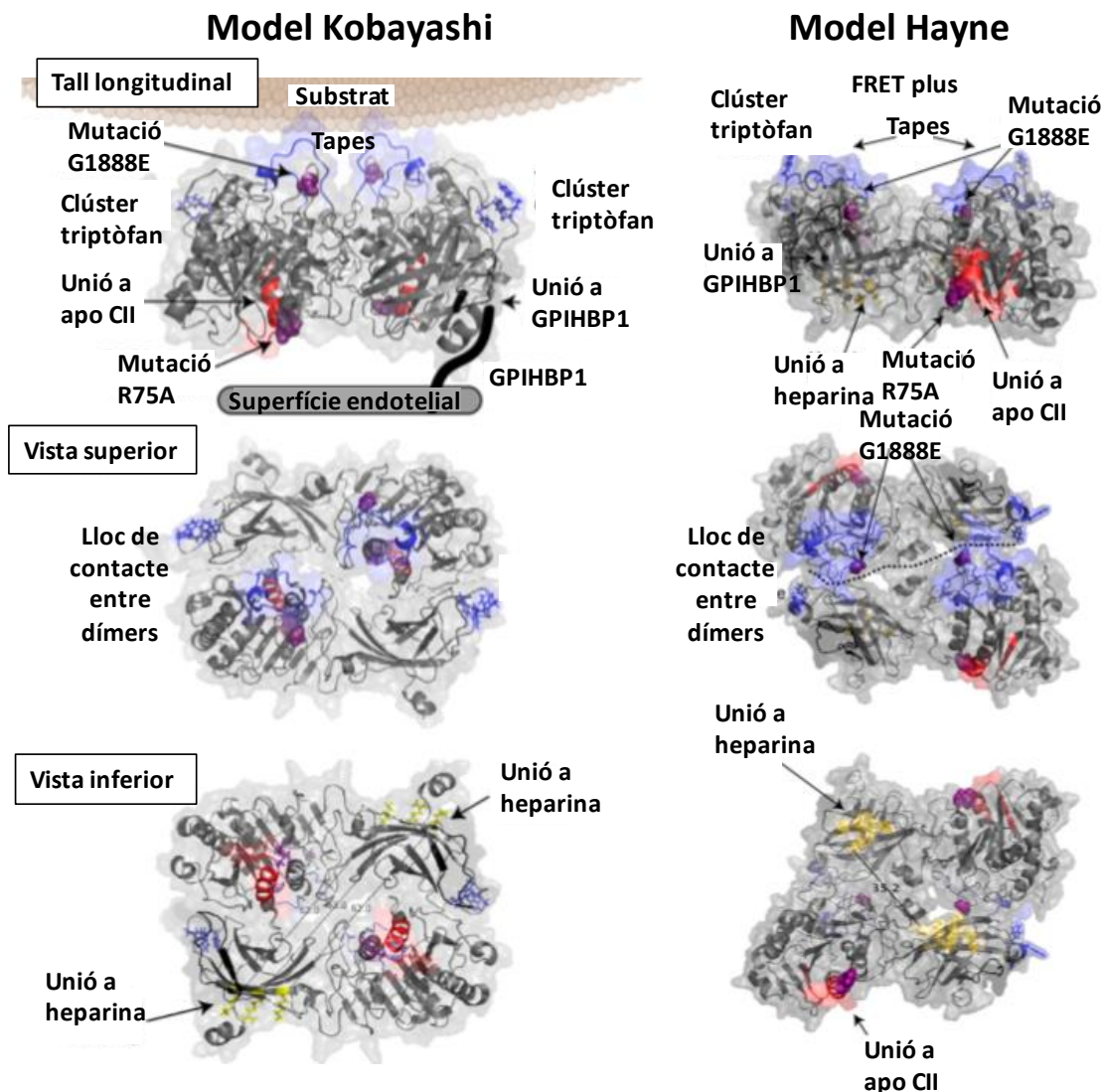


Figura 2. Models del dímer de l'LPL. En ambdós models es mostren 3 punts de vista del dímer: la del dímer amb un tall longitudinal, la superior, i la inferior. El model original es basa en l'estructura cristal·lografiada del dímer de la PL i el nou model s'ha construït mitjançant la tècnica smFRET. La tapa (blau) es troba en tots dos models en la part superior del dímer però el nou model permet l'obertura d'ambdues tapes sense que aquestes xoquin. El lloc d'unió per l'apo CII (vermell) es troba en el model original ocult entre les superfícies d'unió dels dímers i, en el nou model, es troba accessible en la part superior. La mutació G188E (lila) en el model original no apareix en la zona de contacte entre els dímers, en canvi, en el nou model sí. Les distàncies entre els diferents residus implicats en la unió a heparina (groc) són diferents en els dos models. Figura adaptada de Hayne *et al.* [25].

El nou model (Figura 2. veure model Hayne) doncs, proposa un canvi entre la zona d'exposició a la superfície i la zona de contacte entre dímers provocant unes conseqüències directes: (i) que el lloc d'unió a l'apo CII

estigui exposat a la superfície del dímer de l'LPL, (ii) que el mutant G188E estigui en la zona de contacte entre dímers, (iii) que les tapes es puguin obrir sense xocar i (iv) que els residus d'unió a heparina estiguin posicionats de manera compatible amb la unió a la molècula octasacàrid d'heparina.

Basant-se en la comparació amb la seqüència de la PL i en altres estudis, com els realitzats per mutagènesi dirigida, s'han establert els diferents dominis estructurals i funcionals de l'LPL [27]. En l'estructura de l'LPL trobem característiques que són comunes a la família gènica de les lipases com per exemple el domini d'unió a heparina i el lloc actiu α/β hidrolasa. L'LPL s'organitza estructuralment en dos dominis connectats per un pèptid flexible i té 27 aminoàcids corresponents al pèptid senyal [14]. El domini més gran és l'extrem N-terminal (residus 1-312) [13] el qual conté el lloc d'unió a heparina [28], el lloc d'unió de l'apo C-II [29], el lloc catalític o centre actiu de l'enzim comprenent la tríada catalítica (Ser132, Asp156 i His241) [30], el lloc d'unió a lípids [14] i un *loop* de 22 aminoàcids que cobreix el lloc catalític, la tapa [27]. El domini més petit és el C-terminal (residus 313-448 [13]) i és el lloc d'unió de les lipoproteïnes, facilitat per un altre lloc d'unió a heparina [14].

A continuació es descriuen amb més detall aquests dominis i els seus llocs funcionals:

Domini N-terminal

Lloc d'unió a heparina: Gràcies al domini d'unió a heparina, l'LPL s'uneix als HSPG ubicats a la membrana plasmàtica de cèl·lules endotelials i parenquimàtiques. Els HSPG són macromolècules que contenen glicosaminoglicans (heparan sulfat) units covalentment a un nucli proteic. Els heparan sulfats estan carregats negativament, aquest fet possibilita la interacció amb molècules carregades positivament com l'LPL [31, 32]. L'heparina desplaça l'LPL unida als HSPG [21]. Està descrit que la forma dimèrica, i per tant activa, de l'LPL té una afinitat per l'heparina 6000 vegades superior a la forma monomèrica [33]. S'han identificat llocs d'unió a l'heparina en ambdós dominis, l'N-terminal i el C-terminal. A l'extrem N-terminal s'han identificat dos llocs d'unió a heparina (residus 279-282 i 292-304) que són seqüències consens [13].

Lloc d'unió d'apo CII: L'activitat enzimàtica de l'LPL es veu estimulada per l'acció del cofactor apo CII [13, 31]. L'activació de l'LPL pel seu cofactor es veu reduïda per una elevada força iònica, fent palès la interacció iònica existent entre les dues proteïnes [13]. Diversos estudis apunten que el lloc d'unió a l'apo CII es troba a l'extrem N-terminal de l'LPL [13, 34].

Tapa: Cobrint el lloc catalític, l'LPL té una tapa de 22 aminoàcids que és essencial per la interacció amb els substrats lipídics [7, 27] i també per l'especificitat de substrat [35]. Aquesta tapa controla l'estat inactiu o actiu de la proteïna, de manera que quan es troba en estat inactiu la cara hidrofòbica de la tapa es troba exposada a l'interior. Amb la interacció de l'LPL amb els seus substrats lipoproteïcs, la tapa canvia de conformació de

manera que la cara hidrofòbica queda exposada a l'exterior [27, 36]. Aquest control per part de la tapa també existeix en la lipasa pancreàtica i en altres lipases [13].

Lloc catalític (centre actiu): Els monòmers de l'LPL dimeritzen de manera contraposada (cap-cua) i formen un dímer actiu [37, 38]. Els monòmers es situen de la següent manera: l'extrem C-terminal d'un monòmer està tocant el centre actiu de l'altre monòmer (veure Figura 3.). Els substrats lipídics són presentats al centre actiu per la interacció prèvia amb l'extrem C-terminal. S'ha postulat que aquesta orientació és clau per l'activitat de l'enzim i que els monòmers són inactius [39, 40]. S'ha demostrat, mitjançant mutagènesi dirigida, que qualsevol mutació en algun dels 3 aminoàcids que formen part de l'altament conservada tríada catalítica (Ser132, Asp156 i His241), dona lloc a la inactivació de l'enzim [30].

Lloc d'interacció entre monòmers: S'han descrit certs aminoàcids (Ala176, Gly188, Gly195 a l'extrem N-terminal i els residus 415-438 [37] a l'extrem C-terminal) essencials per a la dimerització i l'estabilitat del dímer de l'LPL [13]. La forma activa de l'LPL és un homodímer unit de manera no covalent i la seva separació comporta la inactivació irreversible de l'enzim [13, 39].

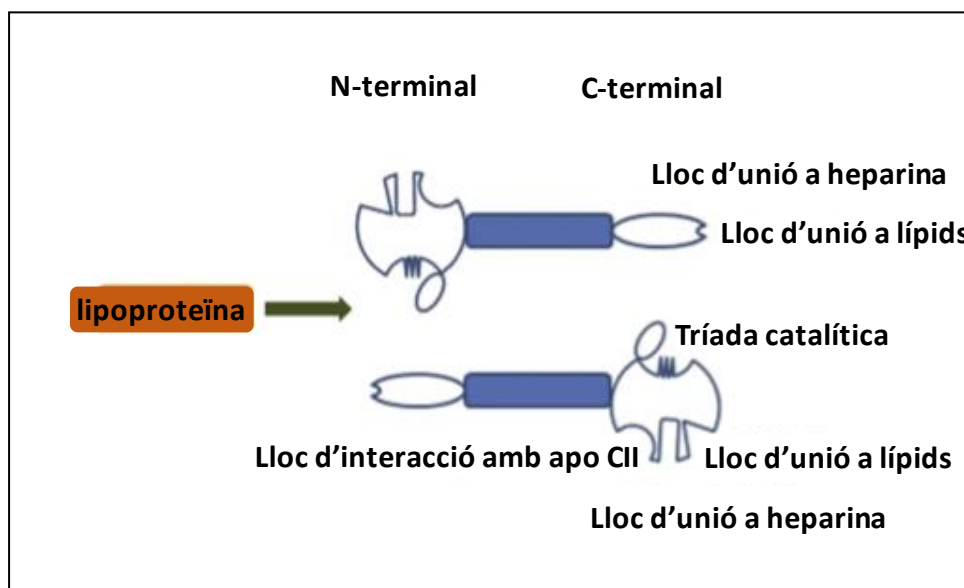


Figura 3. Dominis funcionals de l'LPL. L'LPL funcional és un dímer amb una configuració cap-cua dels dos monòmers. El domini N-terminal conté el lloc catalític, el lloc d'interacció amb l'apo CII, la tapa que cobreix el centre actiu, un lloc d'unió a lípids i un lloc d'unió a heparina. L'extrem C-terminal conté un lloc d'unió a heparina i un lloc d'unió a lípids. Aquest lloc d'unió a lípids de l'extrem C-terminal d'una subunitat del dímer està posicionat de manera molt propera al centre actiu, on trobem la tríada catalítica, de l'extrem N-terminal de l'altre subunitat del dímer. D'aquesta manera els substrats lipídics són presentats al centre actiu d'una subunitat gràcies a la seva interacció amb el domini C-terminal de l'altre subunitat del dímer. Figura adaptada de Li *et al.* [14].

Domini C-terminal

Lloc d'unió a heparina: Com s'ha esmentat més amunt, a l'extrem C-terminal també s'han trobat residus implicats en la unió a heparina. Concretament, uns 50 residus entre els que destaquen: l'Arg405 i les lisines 319, 403, 407, 413 i 414 [13].

Lloc d'unió d'apo CII: També s'ha postulat que l'extrem C-terminal té llocs d'unió a l'apo CII. De fet, es creu que l'apo CII interactua amb el dímer de l'LPL de manera complementària en els dos dominis (amino i carboxi) que es troben contraposats [23, 26].

Lloc d'unió de les lipoproteïnes: Està àmpliament acceptat que els substrats lipídics són presentats al lloc catalític mitjançant la interacció amb l'extrem C-terminal de la proteïna [13, 41]. S'ha comprovat que els triptòfans 390, 393 i 394 juguen un paper important en l'orientació de l'enzim en la interfície aigua-lípids [42]. Les mutacions d'aquests residus hidrofòbics eliminen la capacitat de l'extrem C-terminal d'unir-se a les VLDL [26].

Lloc d'unió a LRP: En l'extrem C-terminal també es troba el lloc d'unió a la proteïna relacionada amb el receptor de les LDL (LRP) entre el residus 378 i 423 [43]. Concretament, s'ha demostrat que la Lys407 és clau per la unió a l'LRP [44]. La unió de les lipoproteïnes a l'LRP depèn de l'estructura dimèrica de l'LPL, ja que només el dímer pot unir-se al mateix temps a la lipoproteïna i a l'LRP [43].

També trobem un grup d'aminoàcids altament conservat en la seqüència de l'LPL, que són importants des del punt de vista estructural de la proteïna.

Cisteïnes: Un grup de cisteïnes implicades en la formació de 5 ponts disulfur (27-40, 216-239, 264-283, 275-278 i 418-438) [34].

Asparagines: La seqüència consens de l'LPL Asn-X-Ser/Thr conté tres llocs potencials d'N-glicosilació en l'espècie humana que es localitzen a les asparagines 43, 257 i 359. L'Asn257 forma part del tripèptid Asn-Pro-Ser que rarament es glicosila en eucariotes [13].

1.1.4 Síntesi, secreció i processament

Encara que trobem l'LPL activa a la cara luminal de les cèl·lules endotelials, aquestes cèl·lules no les sintetitzen [45]. La síntesi i secreció de l'LPL té lloc a les cèl·lules parenquimàtiques dels adipòcits, els miòcits, les cèl·lules de la glàndula mamària alletant i els macròfags entre altres. A la Figura 4. podem veure esquematitzat tot el procés de síntesi, secreció i processament de l'enzim. El gen de l'LPL es transcriu al nucli de les cèl·lules parenquimàtiques i el seu mRNA és conduït al reticle endoplasmàtic (RE) rugós on es durà a terme la seva traducció. Quan l'LPL arriba a l'RE es troba de forma monomèrica i, per tant, inactiva [6]. S'ha demostrat que la seva activació té lloc a l'RE [46], de manera que és on té lloc la seva dimerització [47].

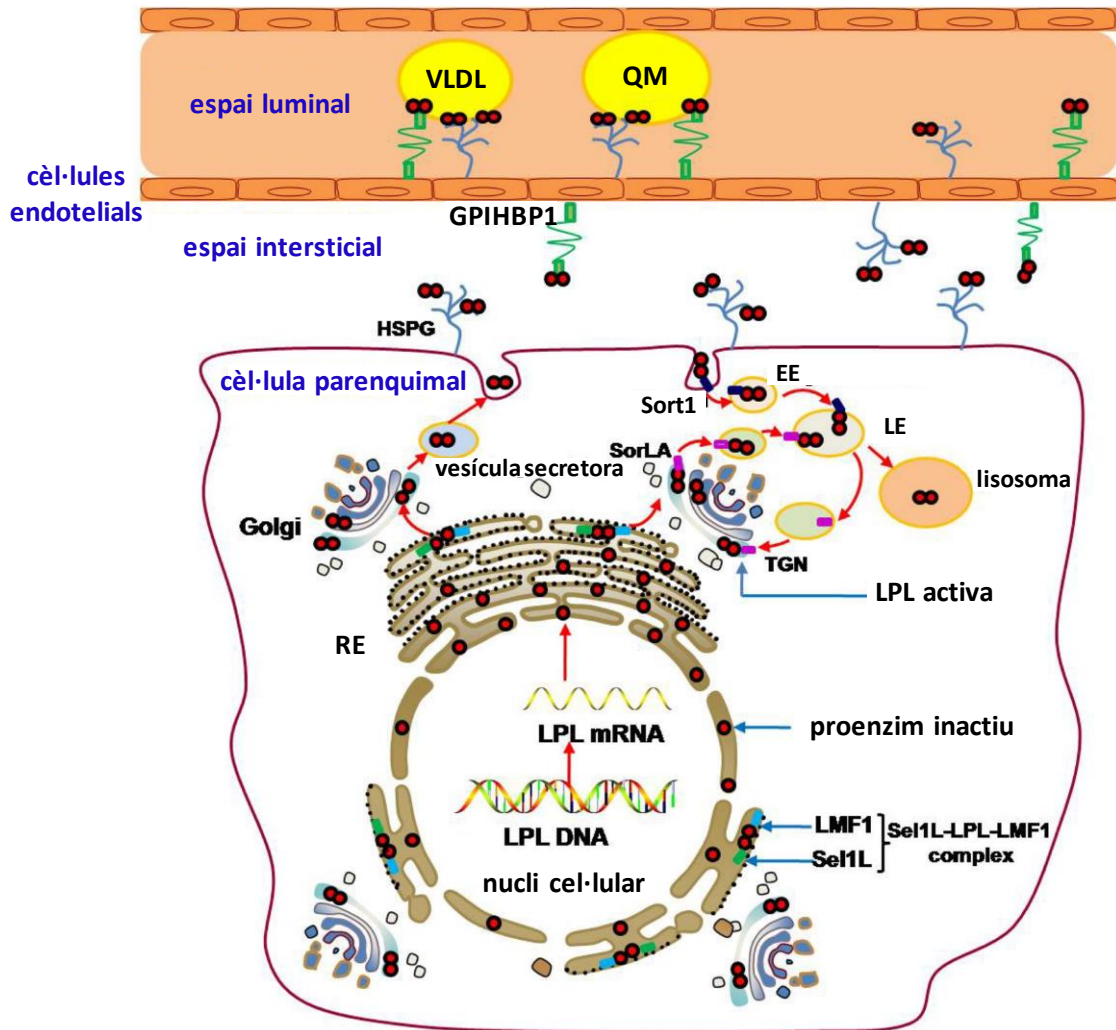


Figura 4. Síntesi, secreció i transport de l'LPL. Després de ser sintetitzada i secretada com a un proenzim monomèric i inactiu en l'RE rugós de les cèl·lules parenquimàtiques, l'LPL és empaquetada en homodimers actius amb l'ajut de la proteïna factor madurador de lipases 1 (LMF1). La proteïna *Sel-1 suppressor of lin-12 Like protein* (Sel1L) forma un complex funcional amb LPL-LMF1 a la membrana de l'RE que ajuda a estabilitzar els dímers naixents d'LPL i els permet ser secretats de l'RE amb èxit. Aleshores, d'una banda l'LPL s'unirà al receptor relacionat amb la Sortilina (SorLA) en la xarxa del trans Golgi (TGN) i serà dirigida cap als endosomes primers (EE), passant pels LE i acabant als lisosomes per a la seva degradació. Un cop secretada de les cèl·lules parenquimàtiques, l'LPL s'unirà als HSPG de la superfície d'aquestes cèl·lules i serà posteriorment translocada a la GPIHBP1. Aquesta proteïna, localitzada a ambdós costats de les cèl·lules endotelials, és la responsable del transport de l'LPL de l'espai intersticial al luminal d'aquestes cèl·lules dels capil·lars. A la superfície luminal de les cèl·lules endotelials, unida a GPIHBP1 i/o a HSPG, és on hidrolitzarà els TAG de les lipoproteïnes circulants (VLDL i QM). Figura adaptada de He *et al.* [6].

La proteïna transmembrana LMF1, que es localitza a l'RE, és essencial per la maduració de l'LPL, facilitant l'ensamblatge dels homodímers en la seva orientació cap-cua [48]. A part, l'LMF1 també estabilitza els nous dímers de l'LPL en l'RE [7]. L'LPL que no ha superat el procés d'ensamblatge anterior és dirigida a la degradació associada a l'RE, un sistema de control de qualitat que regula la degradació de les proteïnes mal ensamblades de l'RE [6, 47]. La Sel1L té una doble funció respecte l'LPL: per una banda està involucrada en la degradació de l'LPL mal plegada [49] i, per una altra, és essencial per a la seva secreció de l'RE formant un complex, junt amb l'LMF1, estabilitzador dels dímers [50]. En l'RE, també té lloc l'inici de l'N-glicosilació de l'LPL que finalitzarà al Golgi [31, 51] (veure Figura 5.).

Aquest procés de glicosilació s'inicia amb la transferència d'un oligosacàrid a un residu d'asparagina de la seqüència consens Asn-X-Ser/Thr de l'LPL a la cara luminal de l'RE. Aquest oligosacàrid patirà diverses modificacions en l'RE i, després, al Golgi. La maduració de l'oligosacàrid finalitza al Golgi amb l'addició de sucres terminals. Els oligosacàrids resultants són complexos i de llargades diferents segons les modificacions rebudes, de forma que es generen diversos oligosacàrids [31]. La glicosilació de l'LPL és clau en la seva activació ja que s'ha demostrat que la seva inhibició comporta la síntesi d'LPL inactiva [52].

Un cop ha tingut lloc la traducció i activació de l'LPL en l'RE, els dímers viatgen fins al Golgi on maduraran. En el Golgi, l'LPL pot ser: (i) secretada fora de les cèl·lules parenquimàtiques de manera constitutiva mitjançant vesícules de secreció (sense regulació fisiològica), (ii) secretada fora de les cèl·lules parenquimàtiques de manera regulada mitjançant vesícules de secreció (resposta a regulació fisiològica), o (iii) degradada via lisosomal de manera que s'uneix al SorLA, el qual fa de mitjancer de l'activitat endocítica i del transport entre vesícules intracel·lulars a la TGN, i és enviada als LE. En els LE l'LPL és enviada als lisosomes per a la seva degradació, i el SorLA retorna a la TGN [53].

Un cop l'LPL activa ha estat secretada de l'interior de les cèl·lules parenquimàtiques, s'uneix als HSPG que es troben a la membrana d'aquestes cèl·lules. Són proteoglicans modificats amb cadenes d'heparan sulfat que poden interaccionar amb diverses proteïnes [6]. La interacció entre els dominis d'unió a heparina de l'LPL (carregats positivament) i els HSPG (carregats negativament) és molt important pel transport de l'enzim a través de la cèl·lula endotelial [32], pel seu acoblament a la superfície cel·lular i per l'estabilitat de la seva activitat [54]. Els dímers d'LPL units als HSPG de les cèl·lules parenquimàtiques [55] o als de les cèl·lules endotelials [56] poden ser reinternalitzats per a tornar a ser secretats, o bé, només en el cas dels units a les cèl·lules parenquimàtiques, poden ser degradats. S'ha vist que, per la transcitosi de l'LPL de l'espai intersticial a la cara luminal de les cèl·lules endotelials, a part dels HSPG, el receptor de les VLDL és un factor clau [57].

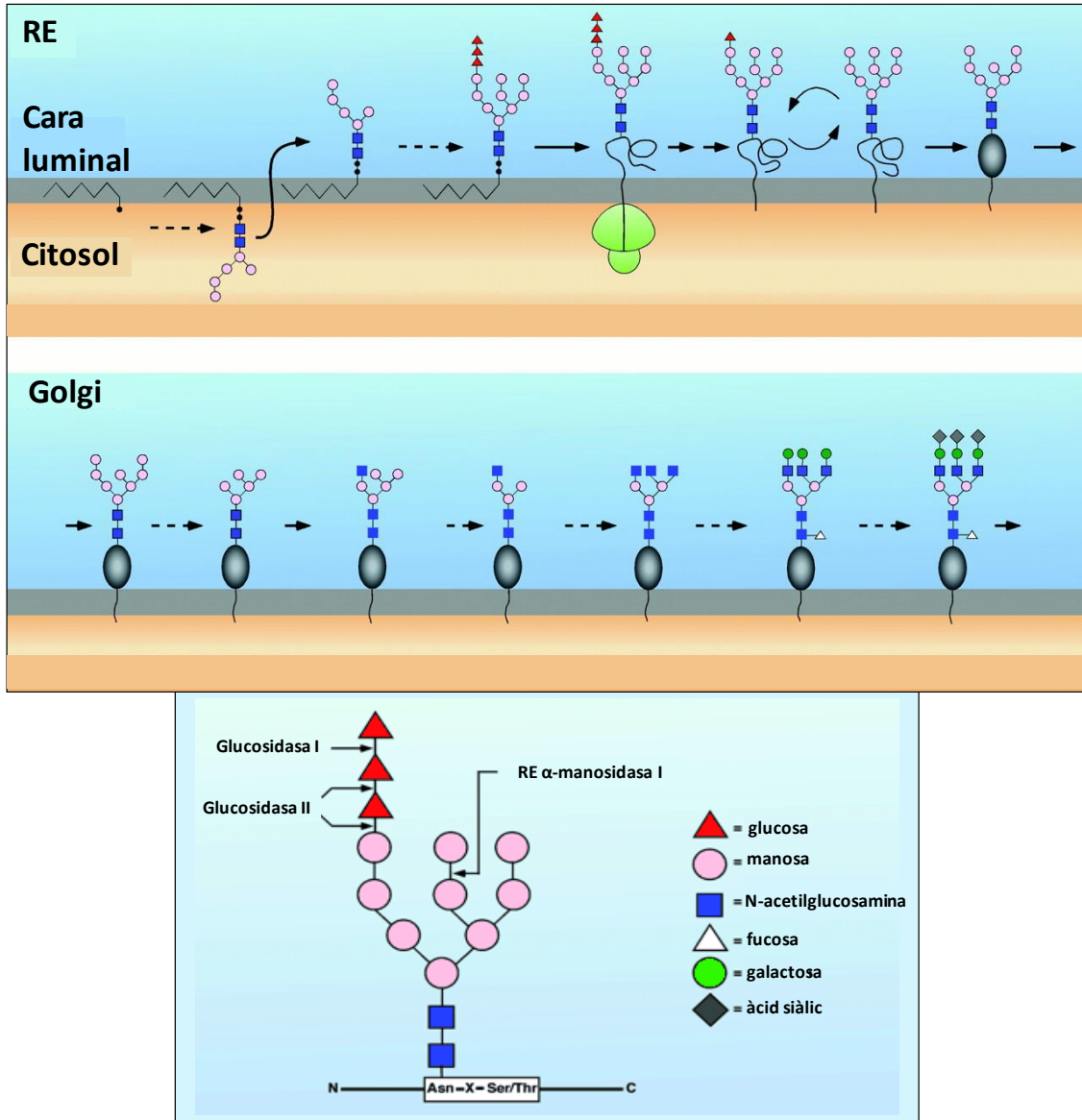


Figura 5. Procés d'N-glicosilació de l'LPL a l'RE i al Golgi. El procés comença a la cara citosòlica de la membrana de l'RE amb l'addició de sucres. Després de passar a la cara luminal, a l'oligosacàrid se li afegeixen més sucres i és transferit a un residu d'asparagina de la proteïna naixent. Aleshores, actuen diferents glucosidases i manosidases. Quan ha tingut lloc el plegament de la glicoproteïna (oval gris), aquesta és transferida al Golgi on es continua el procés d'addició de sucres. Al final de la glicosilació, s'afegeixen sucres terminals com per exemple l'N-acetilglucosamina, la galactosa, l'àcid siàlic i/o la fucosa. Per tant, hi ha moltes possibles terminacions de la glicosilació, donant lloc a diferents glicoproteïnes. Figura adaptada d'Helenius *et al.* [51].

En els últims anys, s'ha descobert que la glicoproteïna GPIHBP1 es troba a ambdues cares de les cèl·lules endotelials i és responsable del transport de l'LPL a través d'aquestes [58]. S'ha demostrat que l'absència de GPIHBP1 causa la deslocalització de l'LPL en l'espai intersticial provocant hipertriacilgliceridèmia [59]. Així, l'LPL aconsegueix arribar a l'espai luminal de l'endoteli on realitzarà la seva funció com a lipasa, gràcies a l'estabilitat que li proporcionen tant la GPIHBP1 com els HSPG [60, 61].

La vida mitjana de l'enzim en la llum endotelial és molt curta, d'uns 30 minuts [62] i, després d'hidrolitzar els TAG de les lipoproteïnes circulants, l'LPL monomeritza i perd afinitat pels HSPG. En aquest moment, els monòmers, i també els dímers, d'LPL poden ser: (i) transportats pel torrent sanguini associats a lipoproteïnes circulants (sobretot LDL i HDL [63]) fins al fetge on seran internalitzats i degradats [64] o (ii) importats de nou a l'espai intersticial a través de la GPIHBP1 [65]. La Sort1, pot transferir un excés d'LPL de l'espai intersticial facilitant el seu retorn a l'interior de la cèl·lula parenquimàtica on la transferirà als EE, per després passar als LE i ser, finalment, degradada als lisosomes [66].

1.1.5 Regulació fisiològica

L'LPL està àmpliament distribuïda a l'organisme, aquest fet li confereix un rol clau en el metabolisme lipídic. Les activitats LPL més elevades es troben al cor, a la musculatura esquelètica, als teixits adiposos (blanc i marró) i a la glàndula mamària alletant [13], i en menor mesura al cervell, al ronyó, a la glàndula adrenal, a les cèl·lules β del pàncrees, al pulmó, a la melsa, als macròfags, als ovaris, als testicles, a la placenta i a l'intestí prim [6, 13, 31, 67]. L'LPL es considera un enzim extrahepàtic ja que no s'expressa en el fetge de l'adult (excepte en situacions de regeneració hepàtica [68]) a nivells considerables [13]. La mínima activitat que hi pot haver és deguda a la internalització, per part del fetge, d'una quantitat mínima d'LPL activa que viatja per sang per seguir la via de degradació [64]. En canvi, sí que s'ha trobat una elevada activitat LPL en el fetge de nounat de rata [69].

Segons a quin teixit tingui lloc la hidròlisi dels TAG per part de l'LPL, els NEFA generats seran utilitzats per a diferents funcions: (i) en el cor o en la musculatura esquelètica seran utilitzats com a font d'energia, (ii) en el teixit adipós blanc (WAT) seran emmagatzemats com a reserva energètica, (iii) en el teixit adipós marró (BAT) seran utilitzats per a la termogènesi, i (iv) en la glàndula mamària alletant seran reesterificats i exportats a la llet. D'aquesta manera, l'enzim presenta una regulació específica de teixit que li permet distribuir els substrats lipídics entre els diferents teixits on s'expressa l'LPL segons el context fisiològic [67].

A continuació es descriuen diferents situacions fisiològiques que poden alterar els nivells d'activitat o l'expressió d'LPL en un teixit concret o en varis teixits a la vegada (Figura 6.):

- **Termoregulació:** L'exposició al **fred** fa augmentar l'activitat i l'mRNA d'LPL al BAT, aquest fet comporta una regulació a nivell traduccional i post-traduccional de l'enzim [70].
- **Ingesta/dejuni:** En una situació d'**ingesta** el WAT augmenta l'activitat LPL per tal d'emmagatzemar TAG provinents de la dieta, i mantenir-los com a reserva energètica [71]. En canvi, en una situació de **dejuni**, l'activitat LPL disminueix en el WAT i augmenta en la musculatura esquelètica [72] i en el cor [71]. Hi ha una exportació dels TAG emmagatzemats al WAT, per a cobrir les necessitats metabòliques dels teixits musculars [71]. Aquesta regulació s'ha postulat que és a nivell post-traduccional [71, 73].

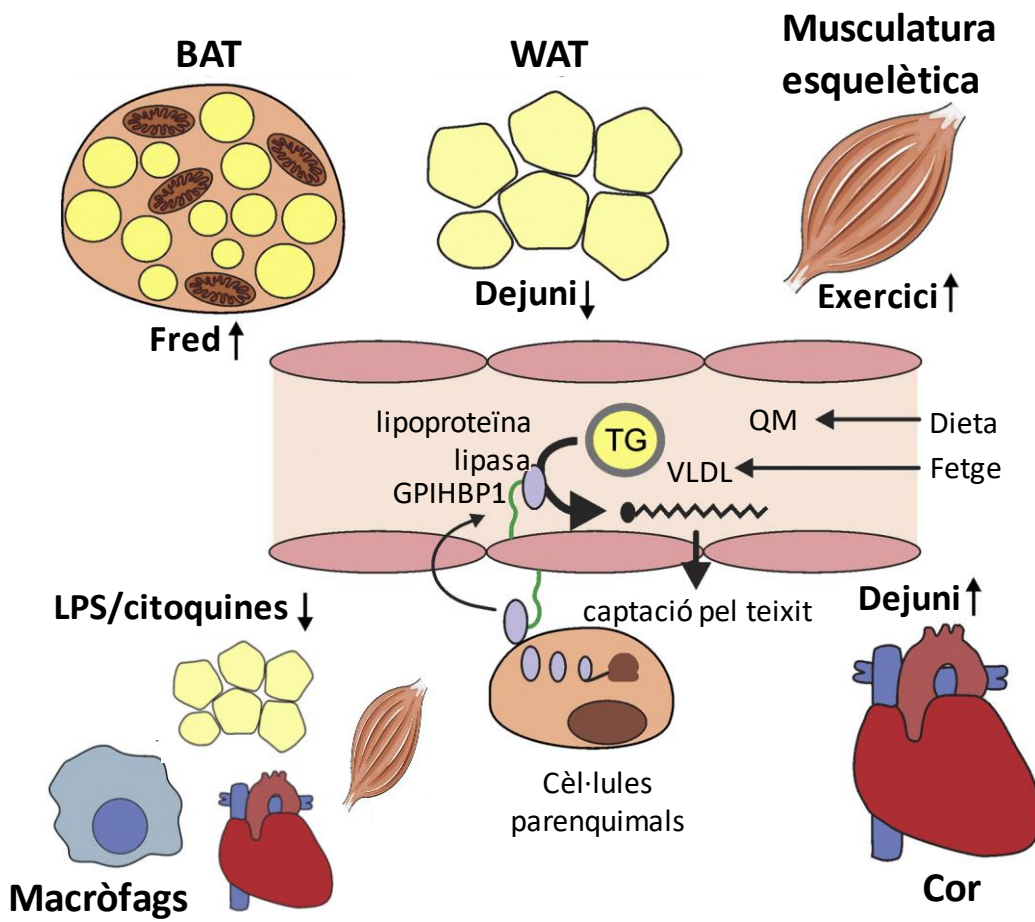


Figura 6. Principals estímuls fisiològics que regulen l'activitat LPL en diversos teixits. La fletxa ↑ indica un augment de l'activitat enfront de l'estímul escrit al costat i la fletxa ↓ una disminució. Figura adaptada de Kersten [74].

- **Exercici físic:** Quan la musculatura esquelètica es veu sotmesa a exercici físic l'activitat LPL augmenta en aquest teixit. Ara bé, aquest augment d'activitat no és en detriment de l'activitat LPL del WAT [75].
- **Inflamació:** En un procés inflamatori el factor de necrosi tumoral alfa (TNF α ,) que és una citoquina proinflamatòria, afecta l'activitat LPL. S'ha vist que, *in vitro*, el TNF α inhibeix l'activitat LPL i estimula la lipòlisi en cèl·lules 3T3 [76]. També s'ha comprovat *in vivo* que el TNF α disminueix l'activitat LPL en el fetge i el plasma [77]. Un altre estudi va demostrar que el TNF α estimula l'expressió d'òxid nítric sintasa induïble en adipòcits del BAT, fent que es produeixi òxid nítric (NO) i, alhora, una disminució de l'activitat LPL [78]. El nostre grup de recerca, va demostrar que el ràpid increment d'NO en el WAT (via òxid nítric sintasa endotelial) provoca un ràpid alliberament d'LPL des de les cèl·lules endotelials d'aquest teixit al torrent sanguini [79]. Diversos autors descriuen que l'administració *in vivo* de lipopolisacàrid (LPS), desencadena una disminució de l'activitat LPL en el WAT, la musculatura esquelètica

[80] i el cor [81]. En el nostre grup de recerca, s'ha comprovat que l'administració de LPS indueix una disminució de l'activitat LPL en el WAT i en el cor, encara que no es va veure una disminució significativa de l'activitat en la musculatura esquelètica [82].

Altres situacions fisiològiques en les quals els nivells d'activitat o l'expressió d'LPL estan alterats són l'estrès i l'alletament:

- **Estrès agut/crònic:** En el nostre grup d'investigació, es va descriure que l'administració *in vivo* d'adrenalina o d'isoproterenol (agonista dels receptors β -adrenèrgics) indueix una disminució de l'activitat LPL en el WAT i un augment en el plasma [83]. També, es va estudiar l'efecte fisiològic de producció endògena d'adrenalina, en una situació d'estrès agut per immobilització (30 minuts) i en un estrès crònic (2 hores d'immobilització diàries), sobre l'activitat i l'mRNA de l'LPL del WAT, el cor i la musculatura esquelètica [84]. Es va veure que, en l'estrès crònic, hi havia una disminució de l'activitat LPL en el WAT mesentèric (mWAT) i epididimal (eWAT). Al mateix temps, hi havia un augment de l'activitat i de l'mRNA de l'LPL en el cor i en la musculatura esquelètica. En canvi, en el cas d'estrès agut, es va trobar una disminució de l'activitat LPL només en el WAT retroperitoneal (rWAT). En ambdós tipus d'estrès hi ha un augment de l'activitat LPL en plasma. Es va proposar que aquests canvis eren deguts probablement per l'acció de catecolamines. Estudis posteriors en el nostre grup, van revelar que l'estrès agut provoca un canvi molt ràpid en els nivells d'activitat LPL (disminució en l'rWAT i augment en el plasma en només 5 minuts d'immobilització) de manera que es va proposar que l'alliberament de l'LPL, des de les cèl·lules endotelials cap al torrent sanguini, constituïa un mecanisme de regulació ràpida de l'activitat LPL dels teixits implicats [85].
- **Alletament:** En aquesta situació fisiològica hi ha un redireccionament dels TAG circulants cap a la glàndula mamària alletant, de manera que augmenta l'activitat LPL en aquest teixit en detriment de l'activitat del WAT [86, 87]. L'LPL té, doncs, un rol important durant l'alletament redistribuint els TAG circulants cap a la glàndula mamària alletant per a la síntesi de llet [87]. L'activitat LPL en la llet humana [88] i en la de rata [89] és molt elevada. Es creu que l'LPL trobada a la llet és un excedent procedent de la glàndula mamària alletant [90-92] i que l'activitat LPL a la llet podria indicar l'activitat a la glàndula mamària alletant de manera indirecta [92].

1.1.6 Factors moleculars de regulació de l'LPL

La modificació de l'activitat LPL en diferents situacions fisiològiques, lògicament, és deguda a l'efecte hormonal (veure *Taula 1*). Aquesta regulació hormonal pot modular l'expressió d'mRNA de l'LPL o l'activitat de l'enzim [13].

Hormona	Teixit	Activitat LPL	mRNA LPL
Catecolamines	Teixit adipós blanc	↓	↓
	Teixit adipós marró	↑	↑
	Cor	↑	n.d.
	Musculatura esquelètica	↑	n.d.
Glucocorticoides	Teixit adipós blanc	↑	↑
	Cor	↑	↑
Insulina	Teixit adipós blanc	↑	↑
	Teixit adipós marró	↑	n.d.
	Musculatura esquelètica	↓	n.d.
	Cor	↓	n.d.
Prolactina	Teixit adipós blanc	↓	n.d.
	Glàndula mamària	↑	↑
Glucagó	Teixit adipós blanc	↑	n.d.
Tiroxina	Teixit adipós blanc	↑	n.d.
	Teixit adipós marró	↑	n.d.
Hormona del Creixement	Teixit adipós blanc	↓	n.d.
	Cor	↑	n.d.
	Musculatura esquelètica	↑	n.d.
Testosterona	Teixit adipós blanc	↓	n.d.
	Cor	↑	n.d.
	Musculatura esquelètica	↑	n.d.
Estrògens	Teixit adipós blanc	↓	↓
	Cor	↑	n.d.
	Musculatura esquelètica	↑	n.d.

Taula 1. Efectes horminals sobre l'expressió i/o l'activitat LPL.

Diferents hormones modifiquen l'activitat i/o els nivells d'mRNA de l'LPL en diferents teixits. n.d. = no determinat. Informació extreta de: [13, 14, 74, 84, 93-99].

L'expressió de l'LPL pot ser regulada a nivell transcripcional, traduccional (en la síntesi de l'enzim) o post-traduccional (en el procés de maduració i secreció de l'LPL). A la Taula 2. es presenten diferents factors que regulen l'expressió i/o l'activitat de l'LPL en els diferents nivells i, també, es mostren proteïnes que interaccionen amb l'enzim i intervien en la seva regulació post-traduccional.

Nivell de regulació	Factor	LPL
TRANSCRIPCIONAL	PPAR, RXR, LXR	↑
	TNF, INF, PKA	↓
	CRP	↑
TRADUCCIONAL	miR-27, miR-29, miR-467	↓
	CRP	↑
	Calci	↑
POST-TRADUCCIONAL	Proteïnes d'interacció	
	LMF1, Sel1L, GPIHBP1	↑
	SorLa, Sort1	↓
	Apolipoproteïnes	
	apoA-V, apoC-II, apoD	↑
	apoE, apoC-I, apoC-III	↓
	Angiopietines	
	Angptl4, Angptl3, Angptl8	↓

Taula 2. Regulació de l'expressió i/o l'activitat de l'LPL a diferents nivells. A la taula es mostren una sèrie de factors i la proteïna C-reactiva (CRP) que actuen a nivell transcripcional regulant l'expressió de l'LPL en teixits determinats. També es mostren factors i/o proteïnes que regulen l'expressió de l'LPL a nivell de la traducció de l'mRNA de l'enzim (microRNA i CRP) i a nivell post-traducciona. Taula adaptada de Li *et al.* [14].

1.1.6.1 Regulació traducciona (miRNA)

Els microRNA (miRNA) són petites molècules d'RNA no codificant (molècula d'RNA no traduïda a proteïna) capaces de regular l'expressió gènica. Aquesta regulació la fan per aparellament de bases amb l'extrem 3'UTR dels mRNA diana [6]. S'ha demostrat que, en ratolins deficients en apo E, els miR-27 [100] i miR-467 [101] disminueixen l'expressió d'LPL tenint un efecte preventiu de l'ateroesclerosi en suprimir l'acumulació de lípids induïda per l'LPL i disminuir la resposta inflamatòria. També s'ha vist que miR-29, en cèl·lules dendrítiques, pot inhibir l'expressió de l'LPL [102]. A més a més, l'LPL pot ser regulada negativament pels dos miRNA (27 i 29) de manera sinèrgica en adipòcits madurs [103]. Com a últim exemple, miR-467 és un regulador de l'LPL en casos d'esteatosi hepàtica [104].

1.1.6.2 Regulació post-traducciona

L'**LMF1** és una xaperona transmembrana específica de lipases que té un rol essencial en facilitar l'ensamblatge dels monòmers inactius de l'enzim cap als dímers actius així com també manté l'estabilitat del dímer de l'LPL en l'RE [105]. Una nansa de l'LMF1 es localitza al lumen de l'RE on interactua amb l'LPL. L'absència d'LMF1 fa que s'acumuli LPL com a agregats que són retinguts a l'RE. A més a més, la mutació del gen d'LMF1 és una de les causes de la síndrome de la deficiència combinada de lipases que es caracteritza per hipertriacilgliceridèmia i hiperquilomicronèmia amb una disminució molt pronunciada de l'activitat LPL [7, 105].

La **Sel1L** és una proteïna adaptadora que es localitza a l'RE i que forma un complex amb l'LPL i l'LMF1 [50]. Aquest complex és necessari per l'alliberament de l'LPL activa de l'RE. S'ha demostrat que els ratolins amb

el gen *Sell1L* silenciats tenen hipertriacilgliceridèmia post-prandial severa i l'LPL queda retinguda a l'RE formant agregats [7, 50].

El **SorLA** és un receptor regulador post-traduccionals de l'LPL [53]. Pertany, juntament amb la **Sort1**, a la família de receptors de domini Vps 10p (Vps10p-D) dels mamífers. Tant el SorLA com la Sort1, són receptors associats a diversos lligants i, per tant, tenen associades diferents funcions. Per exemple, el SorLA protegeix la proteïna precursora amiloide de la proteòlisi donant lloc a la proteïna soluble beta i al pèptid insoluble amiloide beta. És a dir, el SorLA està associat genèticament a la malaltia d'Alzheimer [53]. La Sort1 és un receptor multifuncional que s'uneix a l'LPL quan s'expressa a la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques i mitjança la seva endocitosis i degradació [66].

Fins fa uns anys, es creia que a la cara luminal de l'endoteli l'LPL només era ancorada a les cèl·lules mitjançant els HSPG. Aquesta interacció iònica és la base del procediment experimental d'alliberament a sang de l'LPL, el qual es realitza mitjançant una injecció intravenosa d'heparina. Ara, aquest rol exclusiu dels HSPG ha variat amb el descobriment d'una proteïna implicada en aquest procés, la **GPIHBP1**. S'ha vist que la GPIHBP1 s'expressa a l'endoteli dels capil·lars però no a l'endoteli dels grans vasos sanguinis o dels capil·lars del cervell (en aquests endotelis l'LPL és dependent dels HSPG) [106]. Aquesta glicoproteïna forma part de la família dels *lymphocyte antigens 6* (Ly6) i conté un domini Ly6 amb 10 cisteïnes. La mutació de qualsevol d'aquestes cisteïnes elimina la capacitat de la GPIHBP1 d'unir-se a l'LPL [106] (veure Figura 7.). També s'ha vist que el seu domini àcid estabilitza l'activitat catalítica de l'LPL evitant la dissociació dels dos monòmers que conformen l'homodímer [107]. La unió de l'LPL a aquesta glicoproteïna depèn només del domini C-terminal de l'enzim i no de la totalitat del dímer [108].

Estudis més recents, realitzats per cristal·lografia, del complex LPL-GPIHBP1 (veure Figura 8.) demostren que el domini LU (de 75 residus de llargada) de la GPIHBP1 és el que s'uneix a l'extrem C-terminal de l'LPL mitjançant interaccions hidrofòbiques [109]. Està demostrat que la GPIHBP1 també estabilitza l'LPL impeding la inhibició de la seva activitat hidrolítica per part d'inhibidors fisiològics com les proteïnes semblants a les angiopoietines 3 i 4 (Angptl3 i Angptl4) [110]. Alguns estudis han posat de manifest que el transport de la GPIHBP1 i l'LPL a través de les cèl·lules endotelials es dona per invaginacions de la membrana plasmàtica o bé per vesícules i és bidireccional [65].

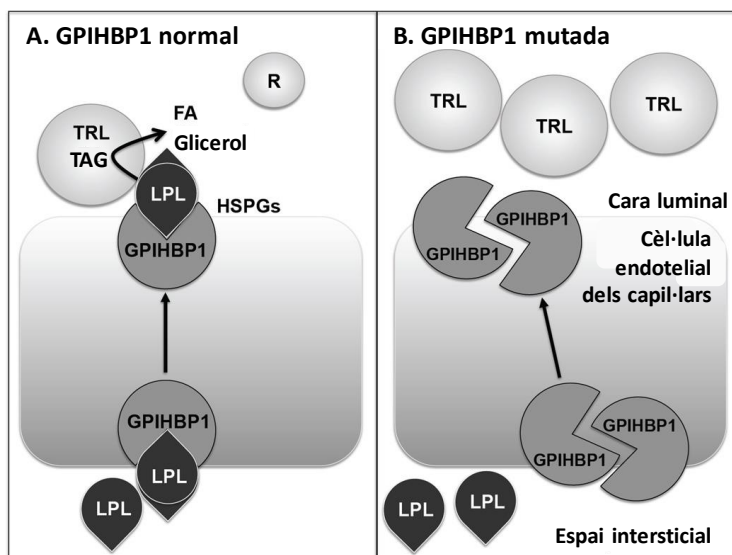


Figura 7. Diverses mutacions al domini Ly6 de la GPIIIBP1 associades a hipertriacilgliceridèmia en humans resulten en dímer o multimeritzacions de la proteïna incapacitant-la per transportar l'LPL a la superfície luminal de l'endoteli dels capil·lars. A) GPIIIBP1 normal actua com a monòmer transportant l'LPL des de l'espai intersticial cap al costat luminal de les cèl·lules endotelials dels capil·lars. Aquí, l'LPL hidrolitzarà els TAG de les lipoproteïnes riques en TAG (TRL) a àcids grassos (FA) i glicerol. Aquest procés dona lloc a la formació de lipoproteïnes romanents (R). B) Moltes mutacions, però no totes, a GPIIIBP1 que causen hipertriacilgliceridèmia donen lloc a una dimerització o a una multimerització d'aquesta proteïna impedit la seva unió a l'LPL. Figura adaptada de Vallerie *et* Bornfeldt [106].

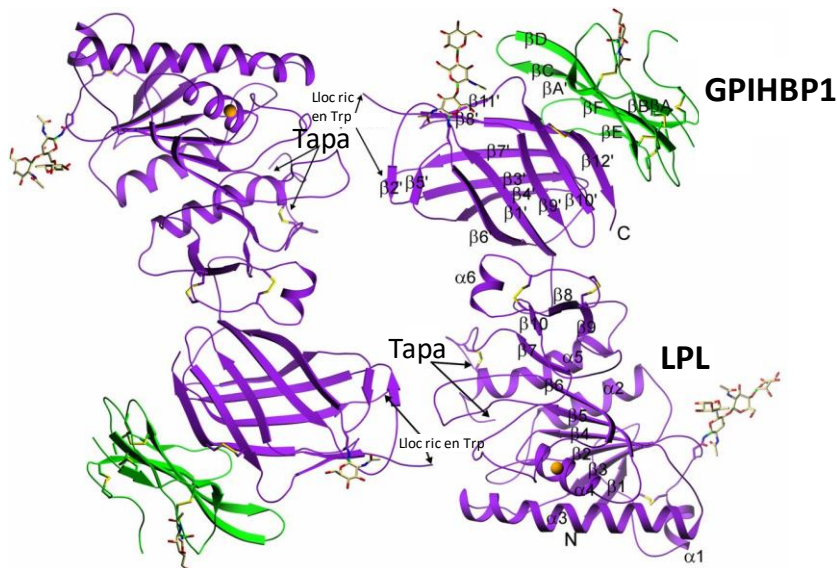


Figura 8. Estructura del complex LPL-GPIIIBP1. L'LPL (lila) té 5 ponts disulfur (Cys54–Cys67, Cys243–Cys266, Cys291–Cys302, Cys305–Cys310, i Cys445–Cys465); un ió de calci (esfera taronja) coordinat pels residus Ala194, Arg197, Ser199, Asp201, i Asp202; i dues N-glicosilacions (Asn70 i Asn386). La GPIIIBP1 (verd) té una N-glicosilació a Asn78. L'LPL conté en el domini N-terminal un domini α/β hidrolasa (N) que conté 6 hèlix α i 10 cadenes β . El domini C-terminal de l'LPL és flanquejat per un domini β barril (C) que conté 12 cadenes β . Els dos dominis estan connectats per una regió frontissa. La numeració de les cadenes β a GPIIIBP1 segueix la nomenclatura proposada pel domini LU de les proteïnes [111]. Figura adaptada de Birrane *et al.* [109].

Un conjunt d'**apolipoproteïnes**, sintetitzades principal o exclusivament al fetge, estan associades amb diverses lipoproteïnes, entre elles les lipoproteïnes riques en TAG. Les podem agrupar com a **estimuladores** de l'LPL (apo CII, apo AV) o com a **inhibidores** (apo CI, apo CIII, apo E) [7]:

- **Apo CII:** Està reconeguda com a cofactor essencial per a l'activitat hidrolítica de l'LPL [112, 113]. En el seu extrem C-terminal hi ha una hèlix que guia a les lipoproteïnes al centre actiu de l'LPL [114]. S'ha proposat que la regulació de l'activitat LPL per part de l'apo CII depèn de la pressió que hi hagi a la superfície de les lipoproteïnes [115]. Quan l'LPL hidrolitza els TAG augmenta la densitat lipídica a la superfície de les lipoproteïnes i, per tant, també la seva pressió. Es creu que aquesta elevada pressió fa que l'hèlix de l'extrem C-terminal de l'apo CII es separi del centre actiu de l'LPL i, per tant, s'aturi la hidròlisi dels TAG. La deficiència d'aquesta apolipoproteïna està associada a una elevació dels nivells de TAG, VLDL i QM en el plasma i a una disminució de l'activitat LPL i dels nivells d'LDL, IDL i HDL [116] a plasma. De manera contraposada, s'ha vist que elevades concentracions d'apo CII condueixen a una hipertriacilgliceridèmia [117] i es creu que aquest fet és degut a que l'apo CII provoca una disfunció de la lipòlisi i de l'eliminació del romanent. És a dir, un excés d'apo CII a les lipoproteïnes es relaciona amb una inhibició de la hidròlisi dels TAG per part de l'LPL provocant hipertriacilgliceridèmia [6]. Hi ha diversos factors que poden implicar un augment en els nivells d'apo CII a plasma com per exemple l'obesitat, la diabetis o alguns fàrmacs hipolipidèmics [118]. Existeixen tractaments farmacològics per a la hipertriacilgliceridèmia, basats en els efectes reductors de la concentració d'apo CII com per exemple: estatines, fibrats, àcid nicotínic, ezetimibe i orlistat [118]. També existeixen pèptids mimètics a l'apo CII, que en els casos d'hipertriacilgliceridèmia causada per deficiència d'apo CII, estimulen la lipòlisi aprofitant el seu efecte estimulador sobre l'LPL [119].
- **Apo AV:** L'apolipoproteïna AV ha estat incorporada a la família de les apolipoproteïnes plasmàtiques l'any 2001, per dos grups d'investigació [120]. El grup de Pennacchio *et al.* la va descriure utilitzant seqüències comparatives i el grup de van der Vliet *et al.* després d'observar una marcada regulació a l'alça del gen de l'apo AV durant la regeneració hepàtica. S'associa a les VLDL, HDL i, en menor mesura, als QM. L'efecte que fa l'apo AV sobre l'LPL podria ser degut: (i) a l'activació dels proteoglicans units a l'enzim, estabilitzant el complex LPL-HSPG, o bé unint-lo a la lipoproteïna HDL [121] o (ii) a l'estabilització del complex LPL-GPIHBP1 [122]. S'ha vist que la sobreexpressió de l'apo AV, en ratolins amb deficiència d'LPL i també en humans, correlaciona amb l'elevació dels nivells de TAG en plasma [123]. Existeixen diferents mutacions de l'apolipoproteïna que tenen com a conseqüència una disminució dels efectes estimuladors sobre l'LPL. S'han descobert tres (p.(Ser232_Leu235)del, p.Leu253Pro i p.Asp332ValfsX4)) que són

una causa directa d'hipertriacilgliceridèmia [124]. Es pot destacar que qualsevol mutació en el residu Gly185 de l'apo AV comporta una disminució de l'activitat LPL, és a dir, té un paper central en la hidròlisi dels TAG mitjançada per l'LPL [125]. Encara que l'apo AV té un paper molt important en el metabolisme dels TAG, es desconeix quin és el mecanisme directe pel qual actua. S'han postulat 3 hipòtesis: (i) en el fetge, un mecanisme intracel·lular afecta a la producció de VLDL, (ii) en la superfície luminal de l'endoteli dels vasos sanguinis, estimula la unió de l'LPL als HSPG i (iii) en el fetge, millora l'eliminació de les TRL via receptors específics [122].

- **Apo CI:** La quantitat endògena d'apo CI és suficient per disminuir o inhibir l'activitat lipolítica de l'LPL [126]. S'ha demostrat que quan l'apo CI es troba unida a les TRL dificulta que l'LPL es pugui unir a la interfície lípid/aigua de la lipoproteïna, de manera que desplaça l'enzim de les partícules lipídiques i, per tant, s'inhibeix la lipòlisi [127]. Encara que l'apo CI es secreta principalment al fetge, també s'ha comprovat la seva secreció al WAT. Quan és secretada en aquest teixit s'inhibeix l'activitat LPL en el mateix i, per tant, disminueix la hidròlisi de les TRL al WAT. En base a aquests estudis, s'ha proposat disminuir la secreció d'apo CI al WAT per tal de millorar l'eliminació de les TRL post-prandials en humans amb obesitat [128].
- **Apo CIII:** L'apo CIII inhibeix l'activitat LPL d'igual manera que l'apo CI, per desplaçament de l'enzim de les lipoproteïnes [127]. Aquesta apolipoproteïna també inhibeix la lipòlisi mitjançada per l'LPL desplaçant el seu cofactor, l'apo CII, de la superfície de la lipoproteïna [129, 130]. També s'ha comprovat *in vitro* que desplaça les lipoproteïnes de la superfície cel·lular [130]. Alguns fàrmacs inhibidors de l'expressió d'apo CIII, com els fibrats, s'usen fa dècades en la clínica pel tractament de la hipertriacilgliceridèmia millorant l'activitat lipolítica de l'LPL [131]. Recentment, s'ha comprovat *in vitro* que l'apo CIII inhibeix la hidròlisi dels TAG quan l'LPL està unida a la GPIHBP1 de manera molt més pronunciada que quan l'LPL no hi està unida [132].
- **Apo E:** És sintetitzada al fetge però també en cèl·lules i teixits extrahepàtics, especialment en macròfags [74]. L'apo E redueix la capacitat lipolítica de l'LPL fent augmentar els nivells circulants de les TRL [133] (també es veuran augmentats per l'estimulació de la producció de VLDL al fetge per part de l'apo E [134]).

En els últims anys, una família de proteïnes semblants a les **angiopoïetines (Angptl)**, s'han establert com a reguladores clau del metabolisme lipídic a plasma essent unes potents inhibidores de l'LPL [6]. La sobreexpressió de qualsevol d'elles comporta hipertriacilgliceridèmia. A continuació es descriuen les Angptl 3, 4 i 8, associades a l'LPL:

- **Angptl3:** Es sintetitza exclusivament al fetge on la seva expressió està regulada a la baixa per la leptina i la insulina i a l'alça pel receptor nuclear LXR [74]. És un polipèptid que en el seu extrem N-terminal té un domini helicoidal que afecta als nivells plasmàtics de TAG inhibint de manera reversible l'activitat lipolítica de l'LPL [135]. Alguns estudis han establert que la inhibició de l'activitat LPL per part del domini N-terminal de l'Angptl3 és a través de la facilitació de la seva escissió mitjançant convertases proproteïna (com per exemple la furina) i, per tant, dissociant-la de la superfície cel·lular. Aquesta dissociació es dona amb l'LPL unida a HSPG o a GPIHBP1 [136]. Estudis en ratolins i macacos dislipidèmics revelen que l'anticòs monoclonal humà REGN1500 és capaç de reduir els efectes inhibitoris de l'Angptl3 sobre l'LPL, posicionant-lo com a possible tractament per a pacients hiperlipidèmics [137]. Estudis recents, indiquen que l'Angptl3 podria cooperar amb l'Angptl8 [138].
- **Angptl4:** És una proteïna molt ubiqüa ja que encara que es sintetitza principalment al fetge i al teixit adipós, també es troba a la musculatura cardíaca i esquelètica, a l'intestí, als vasos sanguinis, al cervell, als pulmons, als ronyons, a les glàndules tiroïdes i adrenals, als macròfags, etc. [7, 74]. L'expressió d'Angptl4 està sota el control dels receptors activadors de la proliferació de peroxisomes (PPAR), de manera que es veu estimulada per l'acció d'àcids grassos (són agonistes dels PPAR) [74]. S'ha establert que l'Angptl4 inhibeix l'activitat LPL [139] però el mecanisme exacte pel qual ho fa no està clar. Alguns dels mecanismes que s'han descrit són els següents: (i) l'Angptl4 inhibeix l'LPL bloquejant la seva dimerització [140] o bé convertint els dímers en monòmers inactius [141], (ii) l'Angptl4 pot unir-se al complex LPL-GPIHBP1 i inactivar-lo, de manera que l'LPL es dissocia de la GPIHBP1 i ja no serà capaç de tornar-s'hi a unir, és a dir, es tracta d'una inhibició irreversible [142], (iii) en adipòcits l'Angptl4 promou la pèrdua intracel·lular d'LPL estimulant la seva degradació un cop han tingut lloc les modificacions post-traduccionals a l'RE [143, 144], (iv) en macròfags l'Angptl4 suprimeix l'activitat LPL i, en conseqüència, també la formació de cèl·lules escumoses i l'expressió de gens inflamatoris (es redueix el risc d'aterosclerosi) [145], (v) l'Angptl4 es veu estimulada pels àcids grassos que indueixen l'activació dels PPAR que inhibiran l'LPL [146], (vi) l'Angptl4 funciona com un inhibidor no competitiu que s'uneix a l'LPL per inhibir la hidròlisi del substrat en un mecanisme reversible [147], i, per últim, (vii) sembla ser que l'Angptl4 és el principal regulador de l'activitat LPL a nivell fisiològic sota condicions d'ingesta/dejuni, exercici i fred [148-150]. En teixit adipós d'humans s'ha establert una forta relació entre l'Angptl4 i

l'LPL, establint-se, per part de la proteïna semblant a l'angiopoietina, una funció fisiològica i reguladora en humans [151].

- **Angptl8:** Va ser descoberta l'any 2012 per tres grups d'investigació els quals la van anomenar Angptl8 o TD26 (Quagliarini et al.), RIFL (Ren et al.) i Lipasin (Zhang et al.) [6]. Es sintetitza al fetge, al cervell, al teixit adipós i al pulmó [7]. S'ha demostrat que té un efecte sobre l'LPL disminuint la seva activitat i, conseqüentment, augmentant els nivells plasmàtics de TAG [152]. Com les Angptl3 i 4, té en el seu extrem N-terminal un domini helicoidal però li falta en l'extrem C-terminal el domini fibrinogen globular que sí tenen les altres proteïnes semblants a les angiopoietines [74]. L'Angptl8 pot inhibir l'LPL de manera directa o bé, indirecta, promovent l'activació de l'Angptl3 [138]. Haller *et al.* [153] han postulat que l'Angptl8, per tal d'inhibir l'LPL i afavorir un augment dels TAG a plasma, requereix de la presència de l'Angptl3.

1.2 IMPLICACIONS PATOLÒGIQUES DE L'LPL

Degut al fet que l'LPL és un enzim clau del metabolisme lipídic el trobem implicat de manera directa o indirecta en moltes condicions patològiques en les quals acostuma a haver una marcada hipertriacilgliceridèmia. La deficiència d'LPL és una malaltia recessiva autosòmica rara que s'associa a una sèrie de símptomes com: dolor abdominal, pancreatitis, xantomes, hepatomegàlia, esplenomegàlia, etc. [154]. Aquesta deficiència es caracteritza per un augment dels nivells de TAG per l'acumulació de lipoproteïnes circulants [155].

La **síndrome quilomicronèmica familiar**, deriva de la deficiència d'LPL i es caracteritza per una hiperquilomicronèmia o per un augment dels nivells de VLDL en sang, presentant el plasma un aspecte lletós [156]. En aquesta síndrome també intervenen factors secundaris que incrementen la producció de TAG com per exemple l'alcohol, o que dificulten l'eliminació de les TRL com per exemple la resistència a la insulina o la diabetis [157].

S'han descrit més de 100 mutacions possibles en el gen de l'LPL. La deficiència es pot presentar tant en individus homozigots com en heterozigots per a les diferents mutacions del gen de l'LPL i té una prevalença de 1:1.000.000. La deficiència en LPL és especialment comuna entre els francesos canadencs, degut a l'efecte fundador, encara que s'ha trobat en totes les ètnies [155]. La deficiència d'LPL en heterozigots (l'any 2013 a l'1% de la població) requereix de factors secundaris (com l'edat, el ser fumadors, la resistència a la insulina o la presa d'un excés d'alcohol) per a causar **hipertriacilgliceridèmia** [157]. La majoria de les deficiències d'LPL són causades per la inactivació de l'enzim, però també se n'ha trobat en les que la producció de la proteïna és inexistent. Aquestes últimes tenen un fenotip de la deficiència molt més marcat. Una deficiència o un defecte en el cofactor de l'LPL, l'apo CII, també resulta en una deficiència de l'activitat LPL. A part, uns altres tres defectes moleculars relacionats amb l'LPL també causen hipertriacilgliceridèmia [156]: (i) la deficiència en GPIHBP1 impedeix la seva unió amb l'LPL i, per tant, la lipòlisi es veu truncada (el 20% dels malalts de quilomicronèmia familiar tenen la GPIHBP1 mutada), (ii) les mutacions en l'LMF1 impossibiliten l'empaquetament i posterior activació de l'LPL i (iii) les mutacions en l'apo AV [154]. Les mutacions de pèrdua de funcions del gen de l'LPL amb més prevalença, com l'Asn291Ser i l'Asp9Asn, són al·lels defectuosos associats a una pèrdua d'activitat LPL significativa. Aquestes mutacions s'associen a un augment del risc cardiometabòlic i a tenir una major susceptibilitat de patir quilomicronèmia o pancreatitis. Només les mutacions associades a la pèrdua total d'activitat LPL donaran lloc a deficiència real d'LPL i a quilomicronèmia familiar [154].

El **diagnòstic de la deficiència genètica d'LPL** es mesura en el plasma post-heparínic (PHP) dels pacients [158]. Existeixen diverses opcions terapèutiques per al tractament de la deficiència d'LPL:

- i) Dieta: la ingesta de greixos ha de disminuir en un 20-25% de les calories totals diàries de manera que els nivells de TAG es mantinguin per sota de 20 mmol/L i el risc de pancreatitis disminueixi. S'ha vist, però, que aquest tractament no sol ser prou efectiu per reduir la quilomicronèmia i els nivells de TAG en sang [154, 155].
- ii) Fàrmacs: fibrats, niacina o estatines tampoc són capaços de modular la deficiència [154, 155]. Per exemple, els Fibrats redueixen la producció hepàtica de VLDL i milloren, doncs, la seva eliminació de la circulació sanguínia. Aquest mecanisme d'acció comporta que, malgrat que els nivells de VLDL en sang són inferiors, el problema de la deficiència d'LPL persisteix i, per tant, els nivells de TAG en sang es veuen poc reduïts [155]. Un altre fàrmac utilitzat tant en casos de deficiència d'LPL moderada com severa és l'orlistat, un inhibidor de les lipases gàstrica i pancreàtica que actua en el lumen del tracte gastrointestinal i redueix la disponibilitat de greixos [157, 159].
- iii) Teràpia de recanvi enzimàtic: No es postula com un tractament efectiu degut a la curta vida mitjana intracel·lular que té l'LPL (d'aproximadament 15 minuts) [154].
- iv) Teràpia gènica: Es basa en l'estratègia d'afegir còpies gèniques extres de l'enzim funcional en el teixit muscular dels pacients amb LPL mutada. Aquesta estratègia no serveix per les mutacions en altres gens com l'apo CII, la GPIHBP1, l'LMF1 o l'apo AV. Alipogene tiparvovec (AAV1-LPL^{s447x}) és un vector adeno associat viral desenvolupat per uniQure com a agent farmacològic de teràpia gènica [154]. El producte està dissenyat per alliberar i expressar la variant genètica S447X, un polimorfisme de nucleòtids individuals, de l'LPL humana. Aquesta variant natural es troba aproximadament al 20% dels caucàsics i s'associa a un increment de l'activitat LPL causada per un increment de l'expressió de l'mRNA de l'LPL i una reducció de la sensibilitat a la inhibició per part de l'apo CIII. Aquesta variant també s'associa a una millora a la resposta a les dietes baixes en greixos i a la teràpia amb fibrats [157]. Cada vial d'Alipogene tiparvovec conté 3×10^{12} còpies genòmiques de AAV1-LPL^{s447x} [154]. Un tractament d'immunosupressió és necessari en el protocol previ al tractament per a reduir les respostes antivirals [157]. S'injecta en múltiples llocs de la musculatura dels membres inferiors. Aquest tractament redueix, de manera transitòria, un 40% dels TAG i millora el metabolisme dels quilomicrons en un estat post-prandial. Ara bé, és un tractament agressiu i requereix de monitorització del pacient per la teràpia immunosupressora. A més a més, és un tractament car i el seu cost-benefici no està clar [157].

- v) Estan apareixent noves estratègies per al tractament de la deficiència de l'LPL però encara no han estat testades en humans i falten més estudis experimentals. Dues d'aquestes estratègies són: (i) agents que redueixen la síntesi de partícules riques en TAG, els *microsomal transfer protein inhibitors* (MTPI) [157], i (ii) agents que redueixen els nivells de TAG inhibint la diacilglicerolacil-transferasa-1 (DGAT-1), el Pradigastat [160].

1.2.1 Aterosclerosi

L'aterosclerosi és la primera causa de mortalitat en la malaltia cardiovascular. Les lesions arterioescleròtiques es caracteritzen per una infiltració de cèl·lules mononuclears, per l'acumulació de lípids en els macròfags derivats de monòcits, per dany de les cèl·lules endotelials i per la proliferació de les cèl·lules musculars llises vasculars [6]. L'LPL té un rol important en l'acumulació de lípids als macròfags i la seva progressió a plaques arterioescleròtiques [161]. S'ha demostrat que la regulació a la baixa d'LPL als macròfags mitjançant microRNA té un efecte preventiu d'aterosclerosi en ratolins apo E^{-/-} [161]. No obstant, el rol de l'LPL en el desenvolupament de l'aterosclerosi és controvertit, ja que s'han descrit efectes **pro-aterogènics** i **anti-aterogènics**. De manera general, s'ha establert que l'LPL plasmàtica (que prové principalment del teixit adipós i de la musculatura esquelètica i s'uneix a les cèl·lules endotelials) exerceix efectes anti-aterogènics, mentre que l'LPL de la paret dels vasos (que prové principalment de macròfags) confereix uns efectes pro-aterogènics.

Alguns dels efectes **pro-aterogènics** descrits de l'LPL són els següents [14]:

- i) millora l'adhesió dels monòcits a l'endoteli
- ii) l'acció catalítica de l'LPL dona lloc a la formació de productes pro-aterogènics (lipoproteïnes petites romanents, àcids grassos lliures, fosfolípids, monoacilglicèrids i diacilglicèrids)
- iii) els productes derivats de la lipòlisi per part de l'LPL actuen en les cèl·lules endotelials vasculars promovent l'entrada de lipoproteïnes a la capa íntima de l'artèria causant dany vascular (provocant un augment de macròfags en la zona) i aquest augment de la permeabilitat de les artèries provoca una acumulació de lípids a l'espai subendotelial provocant inflamació i formació de cèl·lules escumoses
- iv) l'LPL promou la retenció de lipoproteïnes romanents, com l'LDL, a la capa íntima de l'artèria i actua com a pont entre elles i els proteoglicans de la matriu extracel·lular
- v) l'LPL actua com un cofactor estructural facilitant l'acumulació de tot tipus de lipoproteïnes a la superfície cel·lular
- vi) la major font d'LPL a les parets arterials prové dels macròfags i aquesta promou la formació de cèl·lules escumoses i, per tant, d'aterosclerosi.

1.2.2 Síndrome metabòlica

La síndrome metabòlica es defineix com una combinació de, com a mínim, tres de les següents característiques: obesitat central, alts nivells de TAG en sèrum, baixos nivells d'HDL en sèrum, nivells elevats de colesterol, hipertensió i elevats nivells de glucèmia en dejuni o basal [1]. L'obesitat és un desordre multifactorial altament complex causat per factors genètics, metabòlics o de comportament. L'LPL està implicada en l'obesitat ja que és l'enzim clau de la provisió de NEFA a la musculatura (funció de consum) i/o al teixit adipós (funció d'emmagatzematge) influint en el pes corporal. S'ha demostrat que, tant en murins com en humans, l'activitat LPL s'incrementa en el teixit adipós en l'obesitat [13]. En el nostre grup d'investigació, s'ha demostrat que:

- i) l'activitat LPL està augmentada en el WAT (subcutani i visceral) d'individus obesos mòrbids i que aquesta activitat disminueix dotze mesos després d'una cirurgia bariàtrica. És a dir, que quan els obesos perden pes després de la cirurgia també perden part de la capacitat d'emmagatzemar TAG als dipòsits de greix [162].
- ii) els individus amb obesitat mòrbida presenten una activitat LPL més elevada en el fetge que els individus controls i que l'enzim podria ser sintetitzat en el fetge dels obesos perquè aquest expressa mRNA d'LPL. La presència d'activitat LPL en el fetge dels obesos podria ser, en part, la responsable de l'acumulació de TAG en aquest òrgan que afavoririen l'esteatosi hepàtica observada en aquests individus [163].

Existeixen dues classificacions per establir l'impacte de l'obesitat en els individus: l'*Edmonton Obesity Staging System* (EOSS) i la *Kings Obesity Staging Criteria* (KOSC).

EOSS → Classifica l'impacte de l'obesitat en cinc estadis de severitat.

- Estadi 0: fenotip obès sense comorbiditats
- Estadi 1: obesitat subclínica controlada amb tractament farmacològic
- Estadi 2 i 3: pacients obesos candidats a tractaments quirúrgics
- Estadi 4: últim estadi de la malaltia, es desaconsella intervenció quirúrgica perquè no sembla tenir beneficis a llarg termini i és altament perillosa

KOSC → Inclou 12 criteris relacionats amb l'obesitat. Estan ordenats alfabèticament i no per ordre d'importància. Cada criteri està classificat en quatre estadis. En la Taula 3., podem veure tots els criteris amb les seves classificacions per estadis de severitat.

- Estadi 0: normal o saludable
- Estadi 1: en risc
- Estadi 2: malaltia establerta
- Estadi 3: malaltia avançada

Criteri	Estadi 0	Estadi 1	Estadi 2	Estadi 3
Vies respiratòries al dormir	Normal	Roncar	Apnea que requereix CPAP	<i>Cor pulmonale</i>
BMI (kg/m²)	< 30	30 - 35	35 - 50	> 50
Cardiovascular	< 25% de risc	> 25% de risc	Malaltia cardíaca	Fallida cardíaca
Diabetis	Normal	Alteració de la glucosa en dejú	DM2	DM2 descontrolada
Econòmic	Normal	Pateix discriminació	Obesitat deguda a desocupació	Requereix suport econòmic
Funcional	Pot gestionar	Pot gestionar	Gestiona < 1 escala de vol	No pot sortir de casa
Gonadal	3 escales de vol	1 o 2 escales de vol	o requereix ajuda per caminar	
	Normal	Períodes irregulars	Síndrome ovari poliquístic / impotència	Infertilitat
Estat de salut	Normal	Baix estat d'ànim	Depressió moderada o qualitat de vida pobre	Depressió severa
Imatge	Normal	No li agrada mirar-se al mirall	Evita els miralls, disgust amb la imatge corporal	Desordre alimentari sever
Unió gastroesofàgica	Normal	Ardor d'estómac	Esofagitis	Esofag de Barrett
Ronyó	Normal	Proteinúria	GFR < 60 mL/min	GFR < 30 mL/min
Fetge	Normal	Elevat LFT/NAFLD	NASH	Fallida hepàtica

Taula 3. Taula resum dels criteris i els estadis de severitat KOSC. CPAP, pressió positiva continua en la via aèria; GFR, taxa de filtració glomerular; LFT, test de funció hepàtica; NAFLD, malaltia del fetge gras no alcohòlic; NASH, esteatohepatitis no alcohòlica. Taula adaptada d'Abdelaal *et al.* [1].

En humans, l'obesitat es pot mesurar seguint dos criteris epidemiològics: l'índex de Quetelet o índex de massa corporal (BMI) i/o la relació entre el perímetre de cintura i el perímetre de maluc. El més comú és el BMI en el qual es divideix el pes (kg) entre l'alçada al quadrat (m²). A la Taula 4., tenim la representació de la classificació per BMI. L'obesitat mòrbida es considera quan BMI > 40 kg/m².

Classificació	Classe d'obesitat	BMI (kg/m ²)
Sotapès		< 18,5
Normal		18,5 - 24,9
Sobrepès		25,0 - 29,9
Obesitat	I	30,0 - 34,9
Obesitat severa	II	35,0 - 39,9
Obesitat mòrbida	III	40,0 - 49,9
Obesitat mòrbida severa	III	> 50,0

Taula 4. Classificació dels individus normopès, amb sobrepès i obesos segons el BMI. Taula adaptada d'Abdelaal *et al.* [1].

1.2.3 Resistència a la insulina i diabetis

En el teixit adipós l'activitat LPL es veu regulada positivament per l'acció de la insulina. En el teixit adipós de malalts de diabetis (DM) tipus 1 o 2, aquests últims amb resistència a la insulina, l'activitat LPL es veu disminuïda. Aquest fet també s'ha comprovat en models animals de diabetis [13]. A causa de la davallada en l'activitat LPL aquests individus solen tenir una hipertriacilgliceridèmia molt marcada i un augment del risc de patir una malaltia coronària [164].

1.2.4 Alzheimer

Hi ha estudis que demostren que l'LPL i el seu cofactor, l'apo CII, s'expressen en el cervell i en el sistema nerviós central de diferents espècies de mamífers. La presència de lípids al cervell és necessària per a regular el balanç energètic, en el qual l'LPL pot tenir un paper important [6]. S'ha demostrat, en rosegadors, que una disminució de l'activitat LPL cerebral s'associa a un increment de la síntesi de ceramides i a neurogènesi a l'hipocamp, de manera que es postula que l'LPL neuronal, especialment l'LPL que es troba al hipocamp, és una reguladora clau de la homeòstasi lipídica en les neurones. També, s'ha demostrat que la deficiència d'LPL s'associa a un deteriorament en l'aprenentatge i la memòria en ratolins [165].

L'hipocamp és la regió més afectada en la malaltia d'Alzheimer (AD). S'ha vist que, a l'hipocamp, els nivells d'mRNA d'LPL, la seva massa i activitat enzimàtica són superiors als trobats a altres regions del cervell. S'ha demostrat que l'LPL colocalitza amb les plaques senils de malalts d'AD i que els seus mutants s'associen amb la severitat de la malaltia [6, 13]. L'LPL s'associa amb la patologia neuronal i els seus nivells es veuen reduïts en el gir dentat dels cervells de l'AD [166]. A més a més, l'LPL cerebral pot actuar com a factor tròfic per a la supervivència i diferenciació

neuronal [6]. Hi ha estudis que demostren que l'LPL s'uneix a la proteïna amiloide- β i promou la seva associació amb la superfície cel·lular i, també, que promou la captació de la proteïna amiloide- β en astròcits de ratolí [167]. Aquests dos fets contribuirien a una disminució de la formació de plaques amiloides, de manera que l'LPL tindria un efecte preventiu de l'AD.

1.2.5 Leucèmia limfocítica crònica

La leucèmia limfocítica crònica (CLL) és la leucèmia més freqüent entre els adults de la població d'origen caucàsic. En ella els limfòcits B madurs s'acumulen en la sang, el moll de l'os i altres teixits limfoides. El seu diagnòstic suposa la presència i persistència de més de 5000 limfòcits B per microlitre de sang perifèrica durant més de tres mesos. El pronòstic de la malaltia i la seva evolució clínica altament heterogènia es pensa que, en part, estan relacionats amb la senyalització cel·lular del microambient tumoral. Els marcadors pronòstic de l'evolució de la CLL són vitals per als malalts. El marcador més fiable i universal és l'estat mutacional de la regió variable de la cadena pesada dels gens de les immunoglobulines (IgHV). Els pacients amb una hipermutació als gens IgHV (coneguts com Mutants CLL (Mut)) tenen una millor prognosi de la malaltia que els pacients que no tenen la mutació (Um) [168].

L'LPL està sobreexpressada en els limfòcits B dels pacients sense la mutació, els Um, i per tant, l'expressió de l'mRNA de l'LPL s'associa a una pitjor prognosi de la CLL. Aquesta sobreexpressió de l'LPL és un fet sorprenent ja que en els limfòcits B normals no trobem expressió d'LPL. Es creu que el rol funcional de l'LPL en les cèl·lules de la CLL podria ser que l'expressió de l'enzim en aquestes cèl·lules ajudaria a incrementar la senyalització de la supervivència i la proliferació ajudant a la progressió de la malaltia. S'han postulat diversos mecanismes moleculars pels quals es regula l'expressió de l'LPL entre els quals podríem destacar tres: (i) un canvi epigenètic en el qual la sobreexpressió de l'LPL als pacients Um és deguda a la falta de metilació a l'illa CpG del DNA de l'LPL, (ii) l'expressió de l'LPL pot ser regulada transcripcionalment per la fosforilació d'STAT3 i, (iii) l'expressió de l'LPL pot ser regulada traduccionalment per miR-29 (la seva expressió està regulada a la baixa en els pacients Um) [168]. Recentment, s'ha vist que l'expressió gènica de l'LPL en pacients amb CLL correlaciona amb l'expressió gènica dels gens IgHV, de manera que l'LPL es postula com a un bon marcador pronòstic de la malaltia [169].

No obstant, la funció de l'LPL en la CLL no està gens clara. No s'han trobat diferències entre els nivells d'activitat LPL extracel·lular o els nivells de proteïna dels pacients de CLL i individus control [6]. S'ha postulat que l'LPL podria tenir una funció de pont entre lipoproteïnes i els HSPG de diferents cèl·lules, entre elles els limfòcits B. Aquest fet podria afavorir la difusió cel·lular, la migració, i la senyalització intracel·lular produint un microambient molt actiu que activés les cèl·lules tumorals [168].

1.3 ISOFORMES DE PUNT ISOELÈCTRIC

1.3.1 Isoformes derivades de modificacions post-traduccionals

En termes generals, la diversitat proteica que deriva d'un únic gen pot tenir el seu origen a nivell de: DNA, RNA o proteïna. Per tant, aquesta diversitat pot ser deguda a: i) variacions al·lèliques, ii) maduració alternativa d'mRNA o iii) diferents modificacions post-traduccionals (PTM) [170].

S'han definit diversos termes per anomenar les diferents proteïnes derivades de diferents combinacions de PTM: variants de proteïnes, proteoformes, espècies de proteïnes, isoenzims, etc. [170]. Aplicat només als enzims, la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) reconeix el terme isoenzim però, aquest, només inclou modificacions en l'estructura primària d'origen genètic [171]. L'any 2011, es va descriure el terme isoforma o variant per anomenar les variacions d'una proteïna des del nivell genètic fins al post-traduccional [172]. L'any 2013, no estant encara ben establert el concepte, es va proposar el terme proteoforma per, també, anomenar la diversitat proteica derivada d'un únic gen incloent tots els seus possibles orígens [170].

Les PTM són modificacions covalents en la seqüència primària d'aminoàcids de les proteïnes i poden tenir lloc just després de la traducció o bé en un estadi de la maduració de la proteïna més tardà. Aquestes modificacions poden tenir diverses funcions: regular l'ensamblatge de les proteïnes, l'estabilitat, la localització cel·lular, l'activitat, o les interaccions amb altres proteïnes o biomolècules. Per això, les PTM són clau per entendre el funcionament biològic de moltes proteïnes. Metodologies basades en l'espectrometria de masses (MS) i la bioinformàtica es combinen per l'estudi de les PTM. S'ha demostrat que les PTM poden ser essencials com a biomarcadors de malalties pels canvis associats a condicions patològiques com la malaltia cardiovascular, el càncer, les malalties neurodegeneratives o la diabetis [173]. Una sola PTM pot canviar la funció d'una proteïna, de manera que pot ser diana d'estratègies terapèutiques o tests diagnòstics en diverses malalties. Al 2015, més de 100 dels 469 tipus de PTM que existien en la base de dades UniProt s'havien observat en humans [174].

A continuació, es detallen les PTM més comunes i estudiades:

- **Fosforilació:** És una de les modificacions més estudiades i té lloc d'una manera molt ràpida. Provoca un increment de pes de més de 80 Da [175]. En general, la trobem regulant moltes vies de senyalització en diverses malalties i en processos d'activació/inactivació enzimàtica. Per exemple, la hiperfosforilació de Tau en la malaltia d'Alzheimer [173].
- **Glicosilació:** Aquesta PTM és clau en l'estructura i la funció de les proteïnes i s'ha demostrat que està involucrada en àmbits com el desenvolupament o la immunitat. La glicoproteòmica estudia els oligosacàrids (glicans) que s'uneixen a les proteïnes. Aquests

oligosacàrids, són diversos estructuralment ja que poden estar formats per una o més cadenes, més o menys llargues, de monosacàrids units a asparagina, serina o treonina. Aquesta diversitat estructural provoca variacions de pes de més de 800 Da en les proteïnes [175]. Aquesta PTM també està implicada en diverses malalties com per exemple l'específica glicosilació de proteïnes en determinades regions del cervell i en el còrtex frontal en el cas de la malaltia de Parkinson [173].

- **Ubiquitinació:** La ubiquitina és una proteïna de 76 aminoàcids la qual pot modificar altres proteïnes unint-s'hi covalentment (generalment als residus de lisina). Provoca variacions de pes de més de 1000 Da [175]. La poli-ubiquitinació en proteïnes acostuma a ser un senyal per a la seva degradació. S'han trobat diverses ubiquitinacions de proteïnes associades a diferents tipus de càncers, com per exemple, el de pulmó o el de ronyó [173].
- **Acetilació:** Aquesta PTM té un paper important en l'estructura i estabilitat de les proteïnes i en la seva funció, així com en la regulació de la interacció de les proteïnes amb el DNA. Provoca increments de pes de més de 42 Da [175]. S'han trobat hiperacetilacions associades a malalties com la malaltia pulmonar obstructiva crònica [173].
- **Metilació:** La majoria de metilacions es donen en arginines i en lisines, i solen estar associades a regulació de la transcripció o a senyalització cel·lular. Provoca un increment de MW de més de 14 Da [175]. S'han vist diferents patrons d'expressió de metilacions d'histones en el còrtex frontal en la malaltia d'Alzheimer [173].
- **Nitració de tirosines:** La nitració està relacionada amb el dany o estrès oxidatiu durant un procés d'inflamació. La nitració en les proteïnes pot causar canvis estructurals i funcionals que poden ser significatius des d'un punt de vista fisiopatològic. La nitració es dirigeix només cap a residus de tirosines [176]. Provoca un increment de MW de més de 45 Da [175].

1.3.2 Isoformes de pI de l'LPL

Des del punt de vista teòric es pot calcular el pI de l'LPL a partir de la seva seqüència aminoacídica. En humans, s'obté un valor de 8,23 i en rates de 8,22. S'han descrit diversos valors experimentals de pI per l'LPL: en teixit adipós un pI de 4 [177], en PHP humà un pI de 4,5 [178] i en diferents teixits de rata un pI proper a 7,5 [179].

El nostre grup de recerca ha estat el primer en descriure les isoformes de pI de l'LPL. L'existència d'isoformes s'ha observat en diversos teixits i espècies de mamífers, a continuació es detallen les troballes demostrades fins ara pel nostre grup:

- i) S'ha descrit l'existència d'isoformes de pI de l'LPL en cor i PHP de rata [180].
- ii) S'han descrit isoformes de pI d'LPL en altres teixits de rata: eWAT, BAT i musculatura esquelètica [181].
- iii) S'ha descrit l'existència d'isoformes de pI en WAT visceral (vWAT) de macaco de Java [181].
- iv) S'han trobat isoformes de pI d'LPL en diversos teixits de cries de rata (cor, BAT i fetge) [181], demostrant: primer, que les isoformes de pI són presents des del naixement i, segon, que l'LPL trobada al fetge de cries de rata [69] també presenta isoformes de pI.
- v) En tots els estudis publicats pel nostre grup d'investigació, s'ha trobat l'existència d'un mínim de 7 isoformes de diferent pI però amb el mateix MW aparent. Aquestes isoformes de pI s'han trobat en un rang de pH d'entre 6,5 i 8,5.
- vi) Les isoformes s'havien descrit, inicialment, a partir de teixits de diferents individus. No obstant, s'ha demostrat, que totes les isoformes de pI de l'LPL es presenten en un sol cor de rata, de manera que, en rata, es descarta que el seu origen sigui degut a variacions al·lèliques i que sigui multi-orgànic [181].
- vii) S'ha demostrat, tant en rata com en macaco [180, 181], que part d'aquestes isoformes es poden explicar per les glicosilacions que es donen en l'LPL durant la seva maduració, però no totes tenen el seu origen en aquesta PTM. En els mateixos treballs, s'ha demostrat que la fosforilació no està implicada en la formació de les isoformes de pI.
- viii) Ha identificat residus nitrats de tirosina en l'LPL de rata en resposta a una estimulació amb LPS, i ha proposat que aquesta PTM, *in vivo*, podria causar una pèrdua d'afinitat per l'ancoratge o per l'homodímer i alliberar l'LPL cap al torrent sanguini [82].
- ix) S'ha demostrat que les isoformes del vWAT de macaco presenten una afinitat similar per heparina [181], de manera que la unió de les diferents isoformes de pI a l'endoteli no sembla ser una característica diferencial entre elles.
- x) S'ha demostrat que les isoformes de pI de l'LPL poden tenir una implicació funcional en la regulació fisiològica de l'enzim [181]. En aquest sentit, s'ha trobat que les isoformes més àcides del WAT es perden en favor de les més bàsiques en situacions de baixada d'activitat LPL tissular. Concretament, en situacions de fred i dejuni. En la situació fisiològica de fred, també s'ha comprovat que el pI de les isoformes del BAT varia. En el cas de la situació fisiològica de dejuni, la realimentació fa que l'LPL del WAT recuperi l'activitat i la distribució de les isoformes característiques d'una situació d'ingesta.

- xi) En la tesi de Pere Carulla [181], desenvolupada de manera simultània a la present tesi, s'ha proposat un mètode estadístic per a classificar les isoformes de pI segons el seu pI i la seva abundància relativa (patró d'isoformes). Aquest mètode, diferencia en rata fins a tres poblacions d'isoformes: àcida, bàsica i neutra.

Recentment [182], s'ha descrit que el residu Trp417 de l'LPL està C-mannosilat (és un tipus de glicosilació única en la qual s'afegeix una α -D-mannosa al segon àtom de carboni d'un residu de triptòfan via unió C-C). En general, l'addició d'una mannososa a un Trp provoca una alteració en la polaritat, de manera que en l'LPL podria significar un augment de la seva activitat. Aquesta C-mannosilació de l'LPL afecta positivament a la seva secreció i a la seva activitat lipolítica, de manera que és clau a nivell funcional. No obstant, encara falta elucidar més PTM que puguin explicar l'origen molecular de totes les isoformes de pI de l'LPL.

1.3.3 Implicació funcional d'isoformes d'altres proteïnes

A continuació es detallen algunes isoformes de pI o de MW de diverses proteïnes amb implicacions funcionals conegudes.

La **proteïna 49kDa**, en un protozou anomenat *Tetrahymena*, la podem trobar com a enzim citrat sintasa a les mitocòndries o bé com a una proteïna del citoesquelet que forma filaments de 14 nm. La forma enzimàtica està formada per dues isoformes de pI (7,7 i 8,0) i la forma citoesquelètica per aquestes dues isoformes de pI més una tercera de pI 8,4.

L'activitat citrat sintasa està present en les isoformes 7,7 i 8,0 de les dues formes de la proteïna 49kDa. S'ha vist que les tres isoformes de pI estan fosforilades. Els autors [183], van desfosforilar en un estudi de *time course* la citrat sintasa i van comprovar que la seva activitat disminuïa i que apareixia la tercera isoforma de pI de 8,4 (la mateixa que es troba en la forma citoesquelètica de la proteïna). Amb la desfosforilació, la forma enzimàtica aconsegueix ensamblar filaments de 14 nm, hi ha un canvi en la seva funció. És a dir, la PTM de fosforilació, regula la doble funció de la proteïna 49kDa convertint-la en una forma enzimàtica (funció d'activitat citrat sintasa) o citoesquelètica (funció d'ensamblatge de filaments de 14 nm).

L'**hormona estimuladora de fol·licles (FSH)** està formada per diferents isoformes de pI de rang de pH entre 4 i 8 degudes principalment a variacions en el nombre total d'àcids siàlics. En ratolí, s'ha comprovat que les formes menys àcides (pI > 5) produeixen més monofosfat d'adenosina cíclic [184] i indueixen a la reanudació de la meiosi [185], de manera que estan implicades en una millora de l'activitat biològica en el període periovulatori.

Un estudi en humans ha demostrat que l'expressió de la **proteïna S100A6**, que s'uneix a calci, correlaciona amb la progressió del càncer de colon [186]. Aquesta proteïna està formada per quatre isoformes de pI (5,05, isoforma I; 5,15, isoforma II; 5,23, isoforma III i 5,32, isoforma IV)

amb un mateix MW aparent de 10 kDa. S'ha vist que les isoformes I i III es troben en mostres de teixit de carcinoma de colon mentre que la isoforma IV està més present en mostres de teixit sa. La troballa també es va demostrar en línies cel·lulars de càncer de colon i controls. Els autors, apunten que l'origen d'aquestes isoformes es deu a PTM com l'acetilació i la formilació.

La **proteïna DJ-1** està altament conservada, és molt ubiqua i s'ha relacionat amb la malaltia de Parkinson. DJ-1 és, sovint, modificada post-traduccionalment mitjançant oxidacions (correlaciona positivament amb l'edat), ubiquitinacions o SUMOilacions (*small ubiquitinlike modifier*) [187]. Aquestes dues últimes PTM afecten al pI i al MW de la proteïna. Les PTM en la proteïna DJ-1 provoquen canvis diversos com per exemple: una regulació de l'homodimerització, afecta a la seva unió a l'mRNA o a la proteïna Parkin, mitjança la unió a la histona desacetilasa 6, etc. La DJ-1, com pot observar-se a la Figura 9., està formada per dos conjunts d'isoformes de pesos moleculars aparents diferents que, a la vegada, estan formats per isoformes de pI diferents. S'ha descrit, en humans, que el conjunt d'isoformes amb un MW de 20 kDa i un pI de mitjana més àcid correlaciona més específicament amb models cerebrals i neuronals, i, que en les malalties de Parkinson i d'Alzheimer, hi ha una tendència a que els malalts presentin un patró d'isoformes àcides.

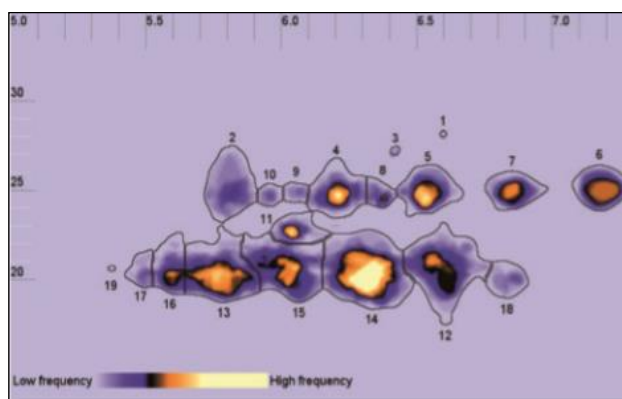


Figura 9. Metagel de la proteïna DJ-1. El metagel deriva de 160 experiments d'electroforesi bidimensional i representa el conjunt de les isoformes possibles de la DJ-1 en humans. Les taques conservades estan numerades i bordejades en negre. L'escala de colors va des del blau (taques poc representades en els experiments) al blanc (taques molt freqüents en els experiments). Figura de Natale *et al.* [187].

II. OBJECTIUS GENERALS

El nostre grup d'investigació, va descobrir que l'LPL no és una proteïna amb unes propietats fisicoquímiques úniques sinó un conjunt d'isoformes de diferent pI però mateix MW aparent [180]. Aquesta Tesi Doctoral es va desenvolupar de manera coetània amb la d'en Pere Carulla [181], i en ambdues es va abordar l'estudi de les isoformes de pI de l'LPL aprofundint en diferents aspectes. En general, vam decidir estudiar la distribució tissular de les isoformes en diferents espècies i, també, conèixer quin era el seu origen molecular. A més, ens vam plantejar estudiar algunes de les característiques funcionals més rellevants de les isoformes de l'LPL, com ara la seva activitat lipolítica i la seva afinitat per heparina. Aquests estudis representen un esforç compartit en ambdues tesis per avançar en la caracterització funcional de les isoformes de pI de l'LPL.

La primera descripció de les isoformes de pI de l'LPL es va fer en l'espècie murina. Atenent a la importància de l'LPL en la fisiologia i en diferents patologies humanes, el primer objectiu de la present tesi va ser:

- 1. Conèixer si l'espècie humana també presenta isoformes de pI de l'LPL.** Vam estudiar la possible existència d'isoformes de pI de l'LPL en PHP humà, fluid que recull l'LPL dels diferents teixits on s'expressa. A més, de confirmar-se la presència d'isoformes en PHP d'humans, preteníem avaluar la seva existència i distribució en altres mostres humanes, incloent la llet i el teixit adipós blanc (WAT), on sabem que l'activitat LPL és molt important.

La caracterització funcional de les isoformes de pI de l'LPL representava un gran repte a nivell metodològic ja que, actualment, no disposem de les eines per estudiar la funció de cada isoforma per separat. Per això, vam decidir realitzar aproximacions experimentals indirectes: estudiar i comparar les possibles isoformes de l'LPL en situacions fisiològiques o patològiques en les quals s'ha demostrat que l'activitat LPL varia de forma important. Per aquest estudi funcional indirecte vàrem triar l'alletament i l'obesitat. Per tant, el segon objectiu de la present tesi va ser:

- 2. Avançar en l'estudi de la possible funcionalitat de les isoformes de l'LPL en humans.**

2.1 Alletament

Tenint present la importància de l'LPL en l'alletament (és clau en la distribució dels TAG circulants cap a la glàndula mamària alletant per a la síntesi de llet [87]) i donada l'elevada activitat LPL trobada en la llet humana [88] (com també passa en altres espècies [89]), vam estudiar la possible existència d'isoformes de pI de l'LPL en la llet humana.

A més, aquest tipus d'estudi en la llet ens permetria aprofundir en possible origen al·lèlic i/o multi-orgànic de les possibles isoformes de l'LPL en humans analitzant cada mostra de llet humana per separat, ja que totes les possibles isoformes de la llet provindrien d'un únic teixit, la glàndula mamària alletant, i d'un sol individu (mare donant).

Per a realitzar l'estudi d'aproximació a la caracterització funcional de les possibles isoformes de l'LPL en l'alletament calia comparar els possibles patrons d'isoformes en dos fluids i un teixit implicats en aquest procés fisiològic: la llet, la glàndula mamària alletant i el PHP. L'obtenció de glàndula mamària alletant humana va resultar impossible, de manera que vam traslladar aquest estudi a l'espècie murina (soca Wistar).

2.2 Obesitat

És conegut l'important paper que té l'LPL en l'obesitat [12]. En aquest sentit, l'activitat de l'enzim en el WAT, tant d'humans com de murins, es veu augmentada amb l'obesitat [13]. Vam estudiar la possible existència d'isoformes de pI de l'LPL en el WAT subcutani (scWAT) d'humans. En el cas de confirmar-se aquesta existència, preteníem avançar en l'estudi funcional indirecte de les isoformes comparant-les entre les descrites en l'scWAT d'humans normopès i en l'scWAT d'obesos.

Es coneix que el WAT associat als estudis d'obesitat no és l'scWAT sinó el vWAT [188, 189]. Degut a la dificultat d'obtenir vWAT d'individus normopès, vàrem ampliar l'estudi analitzant l'LPL del WAT retroperitoneal en models d'obesitat en l'espècie murina (soques Wistar i Zucker) per assegurar una aproximació més acurada per la caracterització funcional de les possibles isoformes en l'obesitat.

III. MATERIALS I MÈTODES

La majoria dels mètodes que s'han emprat en aquesta tesi han estat posats al punt en el Grup de Recerca Metabolisme Lipídic -LPL- del Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. Des de l'any 2011 el nostre grup ha estat certificat per la normativa ISO9001:2008 i, actualment, per la ISO9001:2015. Aquesta normativa és un sistema de gestió de la qualitat dels processos que es duen a terme al laboratori, com ara, diferents metodologies o tècniques. Aquestes metodologies estan descrites en procediments normalitzats de treball (PNT), de manera que tots els integrants del grup segueixen el mateix protocol per a dur a terme la mateixa metodologia i els resultats són més estandaritzables. Al costat del títol de les diferents metodologies descrites a continuació hi consta la referència del PNT fet servir.

En tots els experiments realitzats en aquesta tesi hem seguit una adequada gestió i eliminació dels residus, d'acord amb l'Oficina de Seguretat, Salut i Medi Ambient (OSSMA) de la Universitat de Barcelona.

3.1 PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS EN RATA

3.1.1 Animals i condicions d'establució

Tots els procediments d'experimentació amb animals han estat aprovats prèviament pel Comitè Ètic d'experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (CEEA) i pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya. S'ha seguit el PNT 0350600 APR/011 (Ús i manteniment de la sala d'establució d'animals de laboratori), per a l'establució dels animals.

- Els animals emprats per als estudis de PHP (veure 3.1.2) i obtenció de teixits (veure 3.1.3) van ser rates mascle i femella de la soca Wistar (Harlan Interfauna Ibérica, actualment Envigo) amb un pes d'entre 220 i 250 g en el moment de l'establució. Les rates van ser establucades per parelles durant una setmana en una cabina insonoritzada amb condicions controlades de llum (període de llum de 8 a 20 h), temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) i humitat relativa ($50 \pm 5\%$) a la Sala d'animals del Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia. Es van alimentar *ad libitum* amb pinso estàndard (Teklad Global 16% Protein Rodent Diet, Envigo) i aigua.

- Els animals emprats per a l'estudi de l'obtenció de llet (veure 3.1.4) van ésser rates femella Wistar (Envigo) amb un pes d'entre 250 i 300 g en el moment de l'arribada a l'establucari i previ a ser gestants. Les rates van ser establucades en les mateixes condicions descrites abans. Les rates van ser creuades amb un mascle provinent de l'establucari de la Facultat de Biologia i la seva ventrada es va ajustar a 10 nadons per mare.

- Els animals emprats per a l'estudi de l'obesitat utilitzant el model de dieta de cafeteria (veure 3.1.5) van ser rates mascle i femella Wistar (Envigo) amb un pes d'entre 250 i 300 g en el moment de l'arribada a l'establucari. Van ser establucades en les mateixes condicions descrites abans.

- Els animals emprats per a l'estudi de l'obesitat per modificació genètica (veure 3.1.6) van ser rates mascle Zucker *fafa* i Zucker *lean* (Charles River) de 5 setmanes d'edat. Les rates van ser establucades en les mateixes condicions descrites abans.

3.1.2 Obtenció de plasma post-heparínic

Per tal d'alliberar l'LPL madura de l'endoteli al torrent sanguini cal fer una administració intravenosa prèvia d'heparina. L'heparina allibera l'LPL ancorada als heparan i dermatan sulfat de l'endoteli dels capil·lars sanguinis. Aquest procediment s'utilitza tant en models animals com en humans [190, 191].

Per tal d'obtenir el plasma es van anestesiar les rates (mascle i/o femella) amb isoflurà (Inibsa, Rhodia Organique Fine, Bristol, Regne Unit) amb una dosi d'inducció del 4% v/v en O_2 i una dosi de manteniment del 2,5-3% v/v en O_2 . Un cop adormits se'ls injectava 50 U/kg pes corporal d'heparina (USB Corporation) per una vena caudal. La solució d'heparina

es preparava amb salí estèril, NaCl al 0,9% p/v (Sigma). 15 minuts després de l'administració, els animals ja recuperats de l'anestèsia es tornaven a anestesiar i es sacrificaven mitjançant decapitació amb guillotina. Es recollia la sang del coll dins un vas on hi havia EDTA. La sang es transferia a un tub que es mantenia en gel fins al moment de la seva centrifugació a 2000 g, durant 15 minuts i a 4°C. El plasma obtingut s'emmagatzemava a -80°C.

3.1.3 Obtenció de teixits

Per a l'obtenció de qualsevol teixit, les rates es van sacrificar per decapitació amb guillotina. Aquests animals no havien estat sotmesos a cap tractament, només havien estat estabulats en una cabina insonoritzada de la Sala d'animals. Un cop l'animal estava mort s'extreien tots els teixits que es volguessin conservar i aquests es congelaven ràpidament en nitrogen líquid i es conservaven a -80°C. Alguns exemples de teixits que es van conservar són: cor, fetge, eWAT, mWAT, rWAT, WAT periovàric (pWAT), BAD, múscul esquelètic, etc.

3.1.4 Obtenció de llet

Abans de començar l'extracció de llet de les mares alletants, es van separar les cries de la mare durant un període de 4 h. Per a l'obtenció de la llet de rates alletants calia anestesiar-les amb isoflurà amb una dosi d'inducció del 4% v/v en O₂ i una dosi de manteniment del 2% v/v en O₂. Per augmentar la producció de llet es va administrar intraperitonealment oxitocina (Syntocinon 10 UI/mL) a una dosi d'1 UI/100 g pes corporal, 15 minuts abans de l'extracció. Un cop adormides es munyia cada glàndula mamària alletant amb dos dits d'una mà i a mesura que sortia la llet, en forma de gotes, es recollia dins un *Eppendorf* (veure Figura 10.).

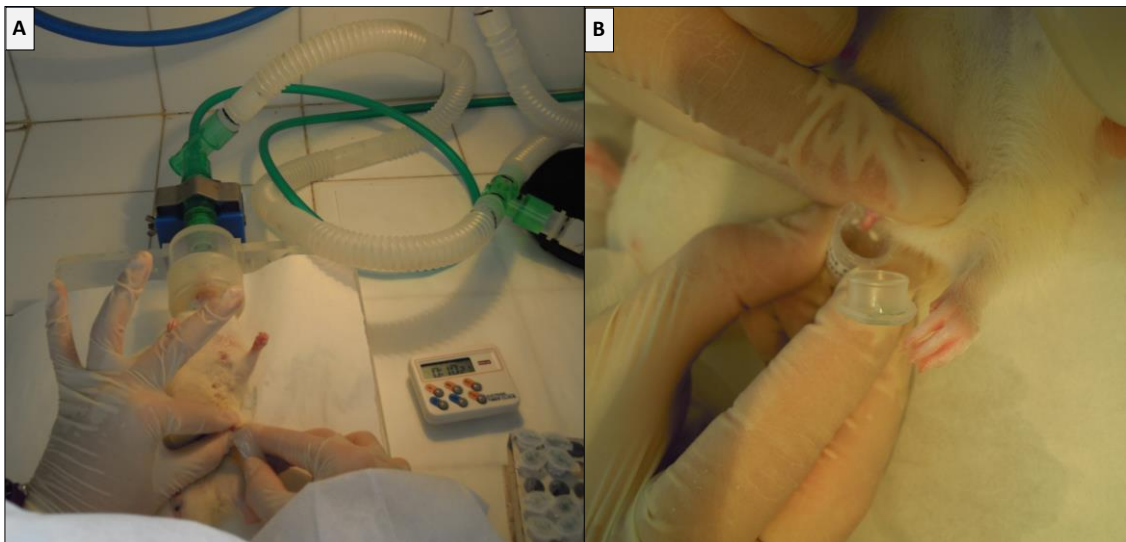


Figura 10. Extracció manual de llet de rata. A) S'observa la rata alletant anestesiada amb l'isoflurà mentre se li practica l'extracció manual de llet. B) Moment en el que s'extreuen dues gotes de llet que es col·lecten en un *Eppendorf*.

Es recollien aproximadament uns 2 mL de llet per rata alletant que es mantenen en gel fins al moment de ser congelats a -80°C . Les mares no es deixaven recuperar de l'anestèsia i eren sacrificades per decapitació amb guillotina obtenint posteriorment diferents teixits segons si s'obtenia el PHP o no.

Disseny experimental

- 10 rates alletants → glàndula mamària alletant, cor, fetge, rWAT i pWAT
- 10 rates alletants → PHP

3.1.5 Model d'obesitat per dieta de cafeteria

L'alimentació amb dieta de cafeteria és un model que reflecteix de manera precisa l'alimentació humana amb una varietat d'aliments altament energètics que són relativament freqüents en la societat occidental i que s'associa amb l'actual pandèmia de l'obesitat. Els animals d'aquest model experimental tenen accés *ad libitum* a pinso estàndard, aigua i aliments altament energètics com per exemple: xocolata, formatge, cacauets, galetes, etc. Aquest fet promou la hiperfàgia [192, 193] provocant que els animals incrementin el seu pes, la quantitat total de greix corporal i que apareguin paràmetres prediabètics com un augment de la glucèmia i una resistència a la insulina [193].

El grup del Dr. Xavier Remesar, del Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, ens va cedir mostres d'rWAT per a l'estudi de l'obesitat utilitzant un model de dieta de cafeteria de 30 dies de duració. Concretament, les alimentaven de manera diària amb: dues galetes Maria Marbú Dorada, mig tall de cansalada, 25 mL de llet enriquida amb 300 g/L de sucre, 10 g de paté La Piara Tapa Negra i pinso estàndard i aigua *ad libitum*.

Disseny experimental

- 6 rates mascle Wistar control
- 6 rates mascle Wistar seguint dieta de cafeteria
- 6 rates femella Wistar control
- 6 rates femella Wistar seguint dieta de cafeteria

3.1.6 Model d'obesitat per modificació genètica

Per l'estudi de l'obesitat utilitzant un model genètic es van emprar rates mascle Zucker *fafa* (obeses) i *lean* (primes o control). En la Figura 11. es poden observar els dos tipus de rates. Les Zucker *fafa* tenen una mutació en el gen del receptor de la leptina i aquest fet els hi provoca hiperfàgia i altres alteracions semblants a les que apareixen en la síndrome metabòlica humana [194]. La leptina és una hormona que es sintetitza al teixit adipós i té una gran importància en la regulació del balanç energètic. L'hormona és alliberada al torrent sanguini de forma proporcional a la quantitat de

lípid emmagatzemats al teixit adipós. Al cervell, interacciona amb els seus receptors produint una disminució de la ingesta i un augment de la despesa energètica. La mutació en el gen del receptor de la leptina (*lepr*) causa, doncs, obesitat en les rates homozigotes per aquesta mutació. Aquests animals també poden ser utilitzats com a models de resistència a la insulina perquè presenten hiperinsulinèmia. Com a model de DM tipus 2 no es poden fer servir perquè només presenten una lleugera intolerància a la glucosa.

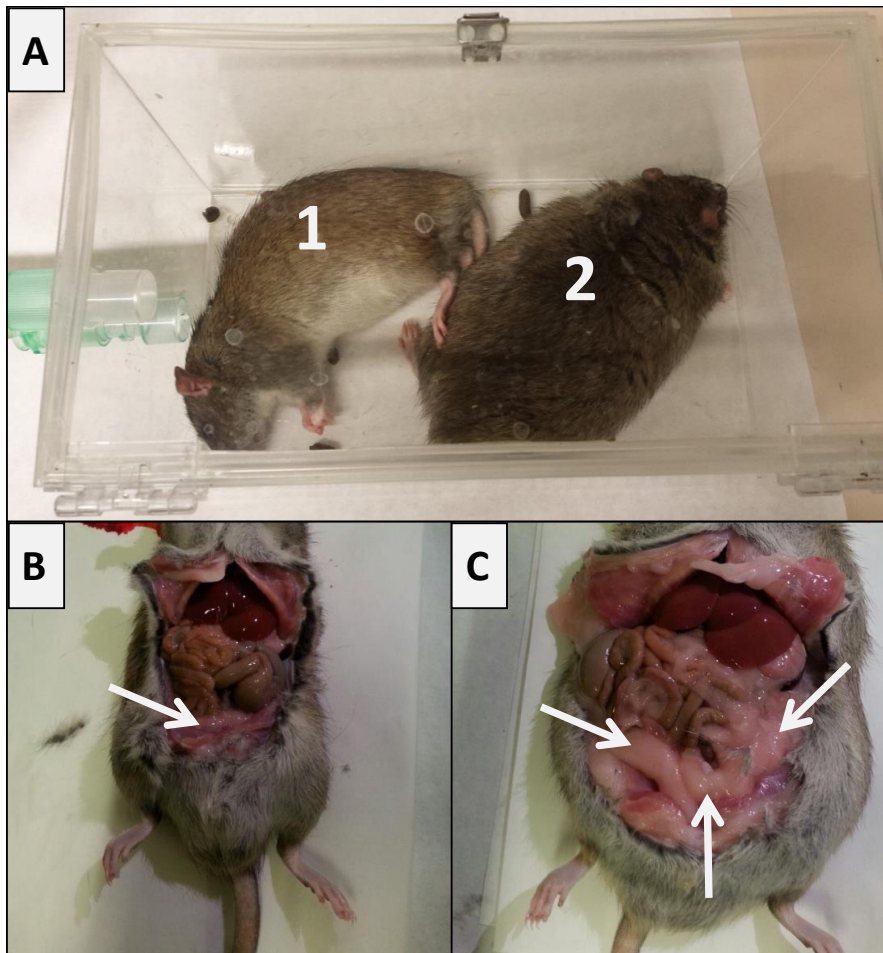


Figura 11. Diferències de mida i de quantitat de greix entre Zucker lean i fafa. A) La rata número 1 és una rata Zucker lean i la número 2 és Zucker fafa o obesa. B) La fletxa indica el WAT d'una rata Zucker lean. C) Les fletxes indiquen el WAT d'una rata Zucker fafa.

Disseny experimental

- 8 rates mascle Zucker lean de 5 setmanes
- 8 rates mascle Zucker fafa de 5 setmanes

Un cop passada la setmana de quarantena es van realitzar una sèrie de mesures fins al moment del seu sacrifici a les 14 setmanes d'edat:

- Es pesaven les rates dos cops per setmana
- Es mesurava la seva longitud des del musell fins la base de la cua un cop per setmana a partir de les 11 setmanes de vida (veure Figura 12.). Per fer-ho calia anestesiàr-les amb isoflurà amb una dosi d'inducció del 4% v/v en O₂ i una dosi de manteniment del 2,5-3% v/v en O₂. Aquesta mesura, juntament amb el pes corporal, ens servia per calcular el BMI de les rates [195, 196].



Figura 12. Mesura de la longitud d'una rata. Es mostra el sistema per mesurar la longitud d'una rata des del musell fins a la base la cua.

- Dos cops per setmana, per diferència de pesada, es calculava la quantitat d'aigua i de pinso que havien ingerit.
- Un cop per setmana, es va mesurar la seva glucèmia a partir de la setena setmana de vida. La gota de sang necessària per a la valoració de la glucosa en sang s'agafava fent un petit tall superficial a l'extrem de la cua.

En el sacrifici de les rates Zucker es van emmagatzemar a -80°C els següents teixits: cor, fetge, rWAT i eWAT (segons procediment descrit en l'apartat 3.1.3).

3.2 PROCEDIMENTS PER A L'OBTENCIÓ DE MOSTRES HUMANES

3.2.1 Plasma post-heparínic

3.2.1.1 Objectiu de l'estudi i selecció de voluntaris

L'objectiu de l'estudi era l'obtenció de mostres de PHP d'individus humans adults sans representatius de la població mediterrània, per a realitzar un estudi proteòmic de l'LPL. L'estudi era un assaig clínic en fase I (voluntari sa) de tipus obert, amb una duració d'un període d'ingrés d'1 dia i amb un seguiment de fins a 4 h post-administració d'heparina.

L'estudi es va dur a terme amb 4 voluntaris que complien una sèrie de criteris d'inclusió. A continuació es detallen els criteris d'inclusió i els d'exclusió:

Criteris d'inclusió

1. Homes amb edats compreses entre els 20 i els 30 anys.
2. Població europea.
3. Pes corporal dins el rang de la normalitat (BMI entre 20 i 25 expressat com pes (kg)/talla (m²)).
4. Història clínica, exploració física per aparells, dins de la normalitat.
5. Sense evidència de malaltia significativa, orgànica o psiquiàtrica, basada en l'anamnesi, exploració física i proves complementàries.
6. Proves de laboratori (hemograma i bioquímica) dins del rang de la normalitat, d'acord als valors de referència del laboratori de Bioquímica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Es podien admetre variacions segons criteri clínic CIM-Sant Pau.
7. Signes vitals (tensió arterial sistòlica i diastòlica, freqüència cardíaca i temperatura) i registre electrocardiograma (ECG) dins de la normalitat.
8. No haver participat en cap altre assaig clínic durant els tres mesos precedents a l'inici de l'estudi actual.
9. No haver donat sang en les quatre setmanes prèvies a l'inici de l'estudi.
10. Acceptació lliure de participar en l'assaig, amb consentiment informat per escrit del voluntari.

Criteris d'exclusió

Els individus que presentaven un o més dels següents criteris no eren seleccionats per a participar en l'estudi.

1. Història prèvia d'alcoholisme o consum de drogues o substàncies d'abús durant el mes previ a l'inici de la selecció.
2. Consumidor important de begudes estimulants (> 5 cafès, tes, begudes de cola al dia).

3. Antecedents d'al·lèrgia, idiosincràsia o hipersensibilitat a fàrmacs.
4. Presa de qualsevol altra medicació en les 4 setmanes anteriors a l'assaig, inclosos els medicaments sense recepta i les plantes medicinals.
5. Serologia positiva per a Hepatitis B, C o per el virus de la sida.
6. Història o evidència clínica de patologia cardiovascular, respiratòria, renal, hepàtica, endocrina, gastrointestinal, hematològica, neurològica o altres malalties cròniques.
7. Haver estat intervingut quirúrgicament durant els 6 mesos anteriors.
8. Fumadors.

3.2.1.2 Obtenció de plasma post-heparínic

Les mostres de PHP es van obtenir gràcies a un contracte de col·laboració signat amb el Centre d'Investigació de Medicaments (CIM) del Servei de Farmacologia Clínica de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) de Barcelona. Abans, però, el protocol d'obtenció va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'HSCSP i per l'*Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios* (AEMPS).

Els voluntaris van ingressar al CIM la tarda prèvia del dia experimental (sobre les 19 h). Els voluntaris van restar en dejuni 10 hores abans de la recollida de mostres.

El dia del experiment es va procedir a recollir mostres sanguínies per a la determinació de l'LPL, per a tal fet es va col·locar una via a l'avantbraç del voluntari, concretament a la vena antecubital amb mandrils d'un sol ús per a permetre extraccions repetides. Es va efectuar una extracció basal de 10 mL de sang utilitzant EDTA com a anticoagulant (mostra pre-heparínica). Immediatament es va administrar per via endovenosa una única dosi de 60 UI d'heparina sòdica 5% per Kg de pes (Heparina Rovi 5%). Passats 15 minuts de l'administració d'heparina es van extreure 240 mL de sang utilitzant EDTA com a anticoagulant (mostra post-heparínica). Les mostres de sang es van col·locar immediatament en gel. Es va procedir a l'obtenció del plasma mitjançant centrifugació durant 10 minuts a 800 *g* i a 4°C. Les mostres de plasma es van congelar a -80°C.

Els voluntaris van restar ingressats sota supervisió de personal mèdic qualificat durant les 4 h posteriors. Es coneix que l'efecte d'una dosi de 100 UI d'Heparina Rovi per Kg de pes corporal aplicada intravenosament dura aproximadament de dues a tres hores [197]. Degut a que pel nostre estudi només necessitàvem l'efecte de l'heparina durant un màxim d'una hora es va decidir administrar 60 UI d'heparina sòdica, per disminuir els possibles riscos associats. Abans d'abandonar el CIM-Sant Pau als voluntaris se'ls va realitzar un ECG i una analítica de seguretat de final d'estudi. Les mostres per a l'examen de seguretat van ser, doncs, de 40 mL (20 mL *screening* previ i 20 mL finalització de l'estudi).

3.2.2 Llet

3.2.2.1 Objectiu de l'estudi i selecció de donants

L'objectiu de l'estudi era l'obtenció de mostres de llet humana per a realitzar un estudi proteòmic de l'LPL.

L'estudi es va dur a terme amb 8 donants que complien una sèrie de criteris d'inclusió. A continuació es detallen els criteris d'inclusió i els d'exclusió:

Criteris d'inclusió

1. Dones amb edats compreses entre els 30 i els 40 anys.
2. Temps de post-part d'entre 1 i 12 mesos.
3. Pes corporal dins el rang de la normalitat (BMI entre 20 i 25 expressat com pes (kg)/talla (m²)).
4. Sense evidència de malaltia significativa, orgànica o psiquiàtrica (diabetis, SIDA, hepatitis, etc.).
5. Acceptació lliure de participar en l'assaig, amb consentiment informat per escrit de la voluntària.

Criteris d'exclusió

Les donants que presentaven un o més dels següents criteris no eren seleccionades per a participar en l'estudi.

1. Història prèvia d'alcoholisme o consum de drogues o substàncies d'abús.
2. Tractament amb heparina fins a una setmana anterior a la presa de mostra.
3. Serologia positiva per a Hepatitis B, C, Sífilis o per el virus de la sida.
4. Història o evidència clínica de patologia cardiovascular, respiratòria, renal, hepàtica, endocrina, gastrointestinal, hematològica, neurològica o altres malalties cròniques.
5. Fumadores.

3.2.2.2 Obtenció de llet

Les donants de llet eren gestionades pel Banc de Sang i Teixits (Banc de llet materna) de Barcelona amb el qual es va signar un conveni de col·laboració per a reclutar llet de fins a 5 donants. Les altres 3 donants han estat gestionades pel grup de recerca LPL signant sempre amb elles un document de consentiment informat.

Les donants s'extreien la llet amb un tirallets i l'emmagatzemaven en bosses estèrils de plàstic. Immediatament després de l'extracció, la llet era congelada a -20°C. El transport des del congelador de les donants fins al nostre congelador de -80°C es feia sempre amb neu carbònica per no trencar la cadena de fred.

3.2.3 Teixit adipós blanc subcutani

3.2.3.1 Objectiu de l'estudi i selecció de voluntaris

L'objectiu de l'estudi era l'obtenció de mostres de teixit adipós blanc subcutani (scWAT) d'individus humans adults sans i obesos per a realitzar un estudi proteòmic de l'LPL.

L'estudi es va dur a terme amb voluntaris que complien una sèrie de criteris d'inclusió. A continuació es detallen els criteris d'inclusió i els d'exclusió:

Criteris d'inclusió

1. Homes o dones amb edats compreses entre els 30 i els 65 anys.
2. Pes corporal dins el rang de la normalitat (BMI entre 20 i 25 expressat com pes (kg)/talla (m²)) en el cas dels voluntaris control i pes corporal dins el rang de la obesitat mòrbida (BMI > 35 expressat com pes (kg)/talla (m²)) en el cas dels obesos.
3. Acceptació lliure de participar a l'assaig, amb consentiment informat per escrit del voluntari.
4. En el cas dels individus control:
 - 4.1 Història clínica, exploració física per aparells dins de la normalitat.
 - 4.2 Sense evidència de malaltia significativa, orgànica o psiquiàtrica, basada en la anamnesi, exploració física i proves complementàries.
 - 4.3 Proves de laboratori (hemograma i bioquímica) dins del rang de la normalitat.
 - 4.4 Signes vitals (tensió arterial sistòlica i diastòlica, freqüència cardíaca i temperatura) i registre electrocardiograma (ECG) dins de la normalitat.
5. En el cas dels individus obesos NO se'ls exclou si:
 - 5.1 Història clínica, exploració física per aparells fora de la normalitat.
 - 5.2 Evidència de malaltia significativa, orgànica o psiquiàtrica, basada en la anamnesi, exploració física i proves complementàries.
 - 5.3 Comorbiditats associades a la obesitat com: diabetis, hipertensió, dislipèmia, síndrome obstructiva aguda del son, problemes cardiovasculars, esteatosi hepàtica, esteatohepatitis.
 - 5.4 Proves de laboratori (hemograma i bioquímica) fora del rang de la normalitat.
 - 5.5 Signes vitals (tensió arterial sistòlica i diastòlica, freqüència cardíaca i temperatura) i registre electrocardiograma (ECG) fora de la normalitat.

5.6 Fumadors

Criteris d'exclusió

Els individus que presentaven un o més dels següents criteris no eren seleccionats per a participar en l'estudi.

1. En el cas dels voluntaris control:
 - 1.1 Història prèvia d'alcoholisme o consum de drogues o substàncies d'abús.
 - 1.2 Serologia positiva per a Hepatitis B, C o per el virus de la sida.
 - 1.3 Història o evidència clínica de patologia cardiovascular, respiratòria, renal, hepàtica, endocrina, gastrointestinal, hematològica, neurològica o altres malalties cròniques.
 - 1.4 Fumadors.
2. En el cas dels voluntaris obesos:
 - 2.1 Història prèvia d'alcoholisme o consum de drogues o substàncies d'abús.
 - 2.2 Serologia positiva per a Hepatitis B, C o per el virus de la sida.

3.2.3.2 Obtenció de teixit adipós subcutani d'individus control

L'obtenció d'scWAT d'individus control va ser possible gràcies al conveni de col·laboració signat amb l'Hospital CIMA-Sanitas de Barcelona, i amb la Clínica Sagrada Família de Barcelona. Vàrem obtenir l'scWAT abdominal dels voluntaris control quan aquests varen ser sotmesos a una liposucció abdominal o a una abdominoplàstia. El teixit va ser congelat en ser extret, amb neu carbònica o amb nitrogen líquid, en el mateix quiròfan. Posteriorment, va ser emmagatzemat a -80°C . Tots els voluntaris van signar un document de consentiment informat.

3.2.3.3 Obtenció de teixit adipós subcutani d'individus obesos

L'obtenció d'scWAT d'individus obesos va ser possible gràcies al conveni de col·laboració signat amb l'Hospital CIMA-Sanitas de Barcelona i amb el Dr. Juan Antonio Baena de l'Hospital Arnau de Vilanova de Lleida. Vàrem obtenir l'scWAT abdominal dels voluntaris obesos quan aquests varen ser sotmesos a cirurgia bariàtrica (*bypass* gàstric o *sleeve* gàstric). El teixit va ser congelat en ser extret, amb neu carbònica o amb nitrogen líquid, en el mateix quiròfan. Posteriorment, va ser emmagatzemat a -80°C . Tots els voluntaris van signar un document de consentiment informat.

3.3 DETERMINACIÓ DE METABÒLITS

3.3.1 Quantificació de proteïna total (PNT 0350600 EXP/016)

Fonament del mètode

S'ha utilitzat per a la quantificació de la proteïna total un mètode colorimètric comercial basat en el descrit per Bradford [198]. Aquest mètode es basa en la interacció entre les càrregues positives de les proteïnes i el colorant Coomassie G-250 en un medi àcid. Aquesta interacció provoca un canvi de color en la barreja (de marró a blau) amb un màxim d'absorbància a 595 nm.

Reactius

- ◆ Reactiu Coomassie (Pierce, Rockford, IL, EUA).
- ◆ Solució mare d'albumina sèrica bovina (BSA) 2 mg/mL (Pierce, Rockford, IL, EUA).
- ◆ Controls interns: Gernorm i Gerpath (Gernon, RAL, Sant Joan Despí, Espanya).
- ◆ Aigua Milli-Q (Millipore).

Procediment

Operacions prèvies

En funció de la concentració estimada de proteïna de la mostra es prepara una patró (mètode A) o una altra (mètode B) amb concentracions finals diferents. Ambdues patrons es preparen a partir de la solució mare de BSA 2 mg/mL fent un banc de dilucions en aigua Milli-Q. La patró del mètode A té les següents concentracions finals: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 i 1,2 mg/mL. La patró del mètode B té les següents concentracions finals: 0; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 15; 20 i 25 µg/mL. El mètode A s'utilitza per homogenats de teixit o plasmes i el B per eluïts de columnes de cromatografia. Les dilucions de les patrons són molt estables i es poden congelar i descongelar repetidament, essent necessari però, mantenir-les en gel durant l'assaig. Les patrons es conserven a -20°C durant 3 mesos.

Anàlisi de les mostres

L'assaig es va realitzar en una placa de 96 pouets.

- Pel mètode A es va carregar a la placa 5 µL de cada punt de la patró per triplicat, 5 µL dels controls interns diluïts 1/100 per duplicat i 5 µL de cada mostra diluïda o no per duplicat. Tot seguit, es van afegir 300 µL del reactiu Coomassie a cada pouet i es va incubar la placa durant 15 minuts a temperatura ambient, en agitació suau i protegida de la llum. Finalment, es va llegir l'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm mitjançant un lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan, Salzburg, Àustria).

- Pel mètode B es va carregar a la placa 150 µL de cada punt de la patró per triplicat, 150 µL dels controls interns diluïts 1/5000 per duplicat i 150 µL de cada mostra sense diluir per duplicat. Tot seguit, es van afegir 150 µL del reactiu Coomassie a cada pouet i es va incubar la placa durant 15 minuts a temperatura ambient, en agitació suau i protegida de la llum. Finalment, es va llegir l'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm mitjançant un lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan, Salzburg, Àustria).

Càlculs

Per l'obtenció de la concentració de proteïna total es va interpolar el valor de densitat òptica de cada mostra a la recta patró corresponent. En mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.3.2 Quantificació de triacilglicèrids (PNT 0350600 EXP/007)

Fonament del mètode

Per a la quantificació de TAG en plasma es va utilitzar un mètode enzimàtic colorimètric basat en el descrit per Fossati *et al.* [199]. Per acció de l'LPL es produeix la hidròlisi dels TAG produint glicerol i àcids grassos lliures. Aleshores, el glicerol és fosforilat per l'enzim glicerol quinasa i es converteix en glicerol-3-fosfat que, tot seguit, és oxidat per la glicerol-3-fosfat oxidasa donant lloc a la dihidroxiacetona fosfat i peròxid d'hidrogen. En aquest punt de la cadena de reaccions, el peròxid d'hidrogen és utilitzat per la peroxidasa per donar lloc a un compost ataronjat anomenat quinonaimina a partir de la 4-clorofenol i de la 4-aminoantipirina (que es troben al kit). Aquest compost té un pic d'absorbància a 500 nm. L'absorbància mesurada a 500 nm és proporcional al contingut de TAG de la mostra.

Reactius

- ◆ Kit Triglicéridos SP (Gernon). Es guarda a 4°C. Consta d'un sol reactiu que conté els enzims: lipoproteïna lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfat oxidasa i peroxidasa.
- ◆ Solució mare de glicerol 4 mM.
- ◆ Controls interns: Gernorm i Gerpath (Gernon, RAL, Sant Joan Despí, Espanya).
- ◆ Aigua Milli-Q (Millipore).

Procediment

Operacions prèvies

Es prepara la patró a partir de la solució mare de glicerol de 4 mM fent un banc de dilucions en aigua Milli-Q. La patró té les següents concentracions finals: 0; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2; 3 i 4 mM. Les dilucions de les patrons són molt estables i es poden congelar i descongelar repetidament, essent necessari però, mantenir-les en gel durant l'assaig. Les patrons es conserven a -20°C durant 3 mesos.

Anàlisi de les mostres

L'assaig es va realitzar en una placa de 96 pouets.

- Es va carregar per duplicat a la placa 5 μ L: de cada punt de la patró, dels controls interns diluïts 1/3 i de cada mostra diluïda o no. Tot seguit, es van afegir 200 μ L del reactiu del kit a cada pouet i es va incubar la placa durant 15 minuts a 37°C, en agitació normal i protegida de la llum. Finalment, es va llegir l'absorbància a una longitud d'ona de 500 nm mitjançant un lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan, Salzburg, Àustria).

Càlculs

Per a l'obtenció del valor de la concentració de TAG es va interpolar el valor de densitat òptica de cada mostra a la recta patró. Els valors de glicerol obtinguts a les mostres mitjançant la patró són directament proporcionals (1:1) als de TAG. En mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.3.3 Quantificació de glucosa

Per a la quantificació de glucosa en sang es va utilitzar el mètode Accu-Chek®.

Aquest mètode es basa en tires reactives (sensors tipus microchips) que permeten realitzar la determinació de glucèmia amb una gota de sang. És un mètode fonamental per a controlar la salut dels diabètics.

Les tires reactives són petits suports plàstics rectangulars que, en un dels seus extrems, contenen un reactiu (enzim glucosa oxidasa) que al contacte amb la glucosa de la mostra de sang, que és aspirada per capil·laritat, reacciona produint un canvi de color o generant un petit corrent electroquímic. Aquesta reacció, permet conèixer el nivell de glucèmia (mg/dL) mitjançant l'ús d'un glucòmetre. Aquest glucòmetre és un mesurador que pot ser de tecnologia fotomètrica (mesura el canvi de color del reactiu) o electroquímica (mesura el corrent electroquímic generat pel reactiu). Les tires reactives estan dissenyades per a ser utilitzades una sola vegada.

Nosaltres vàrem utilitzat el glucòmetre Accu-Chek® Aviva (Roche). Aquest glucòmetre és de tipus electroquímic. Les tires reactives de l'Aviva tenen a l'extrem oposat en el que s'efectua la mesura una sèrie de contactes que realitzen uns controls interns abans i durant l'operació de mesura de glucosa amb la finalitat de millorar la conductivitat elèctrica. Per aquest motiu aquests contactes estan revestits d'or que és un bon material conductor.

3.4 DETERMINACIÓ D'ACTIVITAT LIPOPROTEÏNA LIPASA (PNT 0350600 EXP/013)

Fonament del mètode

Per a la determinació de l'activitat LPL es va utilitzar una modificació de Julve *et al.* [200] del mètode radioquímic descrit per Ramírez *et al.* [201]. Aquest mètode quantifica l'activitat enzimàtica (triacilglicerol hidrolasa) de l'LPL de les mostres gràcies a la radioactivitat emesa pel producte de la reacció. Com a substrat d'aquesta reacció s'utilitza trioleïna (TO) marcada amb ^3H (TO*) en els àcids grassos (glicerol tri[9,10-(n)- ^3H] oleat). Aleshores, s'incuba la mostra amb el substrat radioactiu i, un cop s'ha donat el procés catalític, els àcids grassos que s'hagin alliberat es separen dels TAG no hidrolitzats per un sistema de repartició líquid - líquid que, a la vegada, serveix per aturar la reacció. Per aturar la reacció s'utilitza: (i) una barreja de dissolvents orgànics i (ii) un tampó bàsic que afavoreix l'extracció dels àcids grassos no esterificats (àcid oleic). Aquesta barreja és centrifugada afavorint l'aparició de dues fases. La fase inferior (més blanquinosa) és on es troben els dissolvents orgànics amb la TO* no hidrolitzada i la fase superior (més transparent) és on es troben els àcids grassos no esterificats alliberats durant el procés catalític. Finalment, es recull una part de la fase superior per tal de quantificar-ne la radioactivitat mitjançant un sistema de cintil·lació líquida.

Reactius

- ◆ Tampó EDH amb heparina pH=7,5

Dithiothreitol (DTT) (Sigma)	1 mM
EDTA (Panreac)	1 mM
HEPES (Panreac)	10 mM
Heparina (USB)	5 U/mL

Es conserva alíquotat i congelat a -20°C .

- ◆ Tampó LPL pH=7,5

PIPES disodiu salt (Sigma)	28,8 mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Panreac)	57,8 mM
BSA lliure d'àcids grassos (Sigma)	0,6 mg/mL

Es conserva alíquotat i congelat a -20°C .

- ◆ Estoc de substrat (TO*)

Trioleïna freda (Sigma)	36,7 mM
Trioleïna radioactiva (Amersham)	5 mCi/mL
	0,6 mL

Diluides en 8 mL de toluè (Fluka). L'activitat específica real de l'estoc s'ha de determinar cada cop que se'n prepara de nou (dpm/nmol oleat).

Es conserva a -20°C .

- ◆ Sèrum de rata pre-escalfat durant 30 minuts a 55°C com a font d'APO C-II.
- ◆ Homogenat control de fetge de rata. Es guarda en alíquotes a -80°C.
- ◆ Homogenat control de cor de rata. Es guarda en alíquotes a -80°C.
- ◆ Antisèrum de conill anti-lipasa hepàtica de rata (R21) cedit per la Dra. Monique Robert, Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Facultat de Biologia, UB). Guardat a -20°C.
- ◆ Solució d'aturada de la reacció
Metanol:Cloroform:Heptà (1,41:1,25:1 ; v:v:v) (Panreac)
Es guarda a 4°C.
- ◆ Tampó borat-carbonat pH=10,5
H₃BO₃ (Merck) 0,1 M
K₂CO₃ (Sigma) 0,1 M
Es guarda a 4°C.
- ◆ Líquid de cintil·lació (EcoLite, ICN)

Procediment

Operacions prèvies

Si valorem mostres de plasma, glàndula adrenal o fetge, com contenen LPL i HL, s'ha de fer una incubació prèvia a la valoració amb l'anticòs anti-HL (R21) de 2 hores a 4°C per tal de neutralitzar la HL. Com a controls d'aquesta neutralització s'utilitzen també els controls d'homogenat de cor (només hi ha activitat LPL) i de fetge (majoritàriament hi ha HL).

En el moment de l'obtenció de mostres de teixits o plasma per valorar l'activitat LPL la congelació ha de ser molt ràpida (a -80°C) per tal d'evitar la inactivació de l'enzim.

Homogeneïtzació dels teixits

Per tal de poder valorar l'activitat LPL en teixits cal homogeneïtzar-los just abans d'iniciar-ne la valoració per minimitzar la pèrdua d'activitat. Hem de tenir cura de que els teixits estiguin sempre congelats, en el moment de treure'ls del congelador de -80°C es mantenen en nitrogen líquid fins al mateix moment de l'homogeneïtzació. De la mateixa manera, durant l'homogeneïtzació i després, l'homogenat resultant es mantenia en gel.

Es van fragmentar els teixits en un morter amb nitrogen líquid i es van pesar en una balança analítica. Aleshores es va utilitzar una relació d'1:5 entre el pes del teixit (g) i el volum del tampó EDH (mL) i es va afegir el tampó fred calculat. El teixit, doncs, queda diluït 1/6. Per realitzar l'homogeneïtzació es va fer servir un disruptor de tipus politró (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanya) a màxima potència mantenint el tub en gel. L'homogenat es va centrifugar a 16000 g, 10 minuts a 4°C en tubs *Eppendorf*. Es va recollir el sobrenedant i es va traspasar a un *Eppendorf* nou mantenint-lo en gel per la seva immediata

valoració d'activitat LPL. En el cas d'haver centrifugat algun teixit greixós (WAT, glàndula mamària alletant, llet, etc.) es va retirar la massa de greix superficial.

Preparació del substrat radioactiu

Es va calcular el volum de substrat radioactiu que calia per a la valoració segons el nombre de tubs a valorar. Per a cada tub es necessitaven 1,2 µL d'estoc de TO*, 58 µL de tampó LPL i 2 µL de sèrum pre-escalfat. Aleshores, primer es va pipetejar el volum calculat d'estoc de TO* (es va temperar el tub d'estoc amb l'escalfor de les mans) sota campana i es va traspasar a un tub de vidre Pyrex on es va evaporar el toluè del substrat amb un corrent de nitrogen gas. Seguidament, es va afegir el tampó LPL i es va vortejar el tub. Mantenint el tub en gel es va sonicar durant 30 segons quatre vegades tenint intervals de 15 segons de repòs (amplitud 40%, sonicador VC50T, Sonics and Materials, Danbury, CT, EUA). Es va verificar de manera visual que l'emulsió resultant fos homogènia. Finalment, es va afegir el volum corresponent de sèrum pre-escalfat de rata.

Per comprovar si el substrat estava ben preparat es van determinar els comptes totals (CT) en 4 tubs en els que es van afegir 25 µL de TO* i 3 mL de líquid de cintil·lació.

Resum del càlcul de volum del substrat:

En general	En mostres amb HL (com per ex. plasma)
4 CT	4 CT
4 blancs	4 blancs
2 controls fetge	4 blancs antisèrum
2 controls cor	2 controls fetge
n mostres (x 2)	2 controls fetge antisèrum
Nº total de tubs = 12 + 2n	2 controls cor
	2 controls cor antisèrum
	n mostres (x 2)
	Nº total de tubs = 20 + 2n

Assaig d'activitat LPL

Es van diluir les mostres en tampó EDH (1:3 v/v) obtenint una dilució ¼ en totes les mostres. En el cas de valorar mostres amb HL es van diluir en antisèrum anti-HL i EDH (1:1:4 v/v/v ; mostra:antisèrum:EDH) dues hores abans de l'inici de la valoració i a 4°C. Seguidament es va pipetejar 7 µL de les mostres diluïdes, per duplicat, en tubs de vidre. A cada valoració es van incloure 4 tubs amb 7 µL d'EDH (blancs de la valoració) i dos controls interassaig (7 µL d'una dilució ¼ en EDH d'homogenat de cor i de fetge respectivament, per duplicat). En el cas de valorar mostres amb HL es van incloure en la valoració: 4 tubs amb 7 µL d'EDH (blancs de la valoració), 4 tubs amb 7 µL d'una dilució ¼ de l'antisèrum anti-HL amb EDH i dos

controls interassaig (homogenats de cor i de fetge) amb i sense antisèrum anti-HL.

En aquest punt es va preparar el substrat radioactiu (vegeu més a munt) i es va iniciar la valoració. Cal tenir en compte que prèviament s'ha de tenir preparat un bany a 25°C. Agafant els duplicats de les mostres de manera consecutiva i deixant 30 segons entre la primera parella i la següent, es van afegir 60 µL del substrat a cada tub, es van vortejar i es van incubar durant 30 minuts en un bany a 25°C en agitació constant. Passat aquest temps es va parar la reacció afegint a cada tub 1,2 mL de la solució d'aturada de la reacció i 0,33 mL del tampó borat-carbonat. Tot seguit, es van agitar els tubs en un agitador del tipus orbital (Orbital Vibrax, Ovan, Lovango, Badalona) durant 6 minuts a 1200 rpm. Amb aquesta agitació es van aconseguir les dues fases (inferior i superior) que per diferenciar-les millor es van centrifugar els tubs a 800 g durant 10 minuts a 4°C (Centrifuga CR 3-12, Jouan). Es van pipetejar 0,3 mL de la fase superior i es van afegir en un tub de plàstic amb tap de rosca que contenia 3 mL de líquid de cintil·lació.

Finalment, el comptatge de les mostres va tenir lloc en un comptador de radiació β (Tri-Carb 1500, Packard Instrument Company, Downers Grove, IL, EUA del Servei de Radioisòtops de la Facultat de Biologia de la UB). Es va utilitzar un protocol pre-definit per la quantificació de ³H en el qual es compta cada tub durant 3 minuts.

Càlculs

Per a totes les mostres es van restar a les dpm obtingudes la mitjana de les dpm dels blancs, així es van obtenir les dpm netes per a fer els càlculs d'activitat LPL que s'expressa habitualment en miliunitats (mU). Es defineix com a unitat enzimàtica (U) la quantitat d'enzim que allibera 1 µmol de producte per minut a 25°C.

Per al càlcul de l'activitat lipasa es té en compte: i) els 7 µL de mostra diluïda, ii) la dilució que es va fer d'aquesta mostra (1/4), iii) els 0,3 mL que es van recollir de la fase superior (FS) per comptar la radioactivitat, iv) el volum total de la FS (0,859 mL sumant la solució d'aturada, el tampó borat-carbonat, el substrat radioactiu i la mostra diluïda), v) els 30 minuts d'incubació de la mostra amb el substrat radioactiu i vi) l'activitat específica (AE) de l'estoc de TO*.

En el cas de mostres líquides (plasma o llet), l'activitat s'expressa en mU/mL i es calcula segons el següent càlcul:

$$\frac{\text{dpm netes}}{0,3 \text{ mL FS}} \times \frac{0,859 \text{ mL FS}}{0,007 \text{ mL mostra dil}} \times \frac{4 \text{ mL mostra dil}}{1 \text{ mL mostra}} \times \frac{1}{30 \text{ minuts}} \times \frac{1}{\text{AE}} \text{ dpm/nmol}$$

En el cas d'homogenat de teixits l'activitat també es pot expressar per gram de teixit (mU/g teixit). Cal tenir en compte la dilució feta en l'homogenat de teixit, és a dir, la relació entre el pes del teixit (g) i el volum de tampó EDH afegit (mL).

$$\frac{\text{dpm netes}}{0,3 \text{ mL FS}} \times \frac{0,859 \text{ mL FS}}{0,007 \text{ mL mostra dil}} \times \frac{4 \text{ mL mostra dil}}{1 \text{ mL mostra}} \times \frac{(6 \times \text{pes teixit}) \text{ mL homog}}{\text{pes teixit (g)}} \times \frac{1}{30 \text{ minuts}} \times \frac{1}{\text{AE dpm/nmol}}$$

Per expressar l'activitat LPL total (mU), s'ha de multiplicar l'activitat obtinguda per gram de teixit pel pes total del teixit.

3.5 PURIFICACIÓ PARCIAL DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA D'AFINITAT A HEPARINA-SEPHAROSE

Fonament del mètode

La tècnica de cromatografia d'afinitat separa proteïnes d'una mostra mitjançant un lligant específic unit a una matriu cromatogràfica. Són interaccions reversibles. La tècnica ofereix una gran selectivitat i resolució i, normalment, una alta capacitat per a una elevada quantitat de proteïna. La proteïna diana és unida de manera específica i reversible mitjançant el seu lligant. La mostra s'aplica sota condicions d'una solució d'unió que afavoreixin la unió específica de la proteïna diana al seu lligant de la matriu. La mostra que no resulta unida és eliminada mitjançant una solució de rentat. Per alliberar la proteïna diana unida al lligant es canvien les condicions a una solució d'elució de manera que s'afavoreix el seu alliberament. Aquesta solució d'elució pot ser específica (ex. lligant competitiu) o no específica (ex. canvi de pH, de força iònica, de polaritat). La proteïna diana quan s'elueix està concentrada i purificada o semipurificada.

La cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose* (HS) s'utilitza de manera habitual per semipurificar l'LPL [180, 201, 202]. La matriu d'aquesta columna són boletes de *Sepharose* amb heparina immobilitzada. L'LPL s'uneix mitjançant unions electrostàtiques a l'heparina per un domini ric en lisines i arginines (domini d'unió a heparina). Per trencar la unió de l'LPL (i d'altres proteïnes) a l'heparina s'utilitza un augment de la força iònica. Concretament, s'utilitzen concentracions creixents de clorur de sodi en gradient lineal o discontinu. Cal tenir en compte que per preservar l'activitat LPL cal dur a terme tot el procés a 4°C ja que l'LPL és molt termolàbil.

Reactius

- ◆ HS CL-6B (GE Healthcare)
- ◆ Tampó d'homogeneització pH=7,5

HEPES (Panreac)	10 mM
EDTA (Panreac)	1 mM
DTT (Amersham)	1 mM
Deoxicolat sòdic (Sigma)	0,3 % (p/v)
- ◆ Tampó d'equilibrat pH=7,4

Tris-HCl (Tris base, Roche)	10 mM
Glicerol (Panreac)	30 % (v/v)
NaCl (Panreac)	0,15 M
- ◆ Tampó de rentat I pH=7,4

Tris-HCl (Tris base, Roche)	10 mM
-----------------------------	-------

Glicerol (Panreac)	30 % (v/v)
NaCl (Panreac)	0,75 M
◆ Tampó d'elució pH=7,4	
Tris-HCl (Tris base, Roche)	10 mM
Glicerol (Panreac)	30 % (v/v)
NaCl (Panreac)	1,50 M
◆ Tampó de rentat II pH=7,4	
Tris-HCl (Tris base, Roche)	10 mM
Glicerol (Panreac)	30 % (v/v)
NaCl (Panreac)	2,50 M
◆ Tampó de regeneració bàsic pH=8,5	
Tris-HCl (Tris base, Roche)	0,10 M
NaCl (Panreac)	0,50 M
◆ Tampó de regeneració àcid pH=5,0	
Acetat sòdic (Merck)	0,10 M
NaCl (Panreac)	0,50 M
◆ Tampó de conservació pH=7,4	
Tris-HCl (Tris base, Roche)	10 mM
Etanol (Merck)	20 % (v/v)
◆ Solució de BSA lliure d'àcids grassos (Sigma) 50 mg/mL	

Procediment

Empaquetament de la columna d'HS

Segons el volum de mostra que vulguem passar per la columna d'HS necessitem una capacitat o una altra de suport físic o columnes de vidre per empaquetar l'HS (Econo-Column®, Bio-Rad). Així doncs en aquesta tesi classifiquem les columnes en: i) grans (30 cm de llargària x 0,7 cm d'ample, volum d'HS 10 mL); ii) mitjanes (30 cm de llargària x 0,7 cm d'ample, volum d'HS 5 mL) i iii) petites (5 cm de llargària x 1 cm d'ample, volum d'HS 3 mL). Per empaquetar les columnes d'HS es va seguir el següent protocol descrit pel fabricant (GE Healthcare):

1. Rehidratació HS: Es va pesar l'HS necessària segons la mida de la columna a empaquetar (tenint en compte que 1g d'HS seca dona uns 4 mL d'HS rehidratada) en un Falcon de 50 mL. S'omplí el tub amb aigua Milli-Q i es va posar a orbitar durant 15 minuts a 4°C. Tot seguit es centrifugà (500 g, 1 min i a 4°C) (Centrifugadora Jouan CR312) i amb molt de compte es va descartar el sobrenedant. Aquests rentats amb aigua es van repetir 3 cops més. Aleshores, es va procedir a fer 2 rentats amb Tris-HCl 10 mM pH=7,4.

2. Empaquetament HS: L'HS rehidratada es va abocar a la columna de vidre amb molt de compte i es va passar 3 volums de columna de Tris-HCl 10 mM pH=7,4 a un flux de 30 mL/h emprant una bomba peristàltica (Minipuls 2, Gilson). A l'acabar sempre es deixava un volum residual de tampó per sobre l'HS empaquetada per evitar que aquesta s'assequés. Tot aquest procés es duia a terme a la cambra de 4°C i la columna empaquetada restava emmagatzemada allà.

Preparació de la mostra

Per tal de passar les mostres per la columna d'HS i realitzar la cromatografia d'afinitat calia fer un homogenat previ de les mateixes. Es va utilitzar tampó d'homogeneïtzació utilitzant una relació 1:5 (pes del teixit en grams:volum de tampó en mL). Es va utilitzar un disruptor de tipus politró (Ultra-Turrax T25) a màxima potència i mantenint sempre la mostra en gel (a 4°C) per fer l'homogeneïtzació. Un cop acabada, es deixaven les mostres en gel durant 1 h i es centrifugaven a 100.000 *g*, durant 1 h i a 4°C (Beckman Coulter model Optima L-90K). El sobrenedant resultant es guardava a -80°C fins al moment de l'inici de la cromatografia.

Cal puntualitzar que els fluids (PHP i llet), per la seva naturalesa líquida, es poden analitzar de manera crua (sense homogeneïtzar) o homogeneïtzades. En el cas dels homogenats, s'homogeneïtzava amb el mateix tampó d'homogeneïtzació i a la mateixa relació 1:5 (volum del fluid en mL:volum del tampó en mL). No calia, però, utilitzar el politró per trencar cap teixit. Es deixaven les mostres en gel també durant 1 h. Aleshores es feien dues centrifugacions en el cas dels PHP i una centrifugació en el cas de la llet.

- PHP: Es feia una primera centrifugació de 10.200 *g*, durant 30 min i a 4°C (Sorvall RC-5B) per deslipidar les mostres i extreure la massa de greix que es forma sobre el sobrenedant (veure Figura 13.), i una segona a 50.000 *g*, durant 90 min i a 4°C (Beckman Coulter model Avanti J-25) per acabar d'eliminar les restes cel·lulars. El sobrenedant s'emmagatzemava també a -80°C.
- Llet: Es feia una centrifugació de 16.100 *g*, durant 70 min i a 4°C (*Eppendorf* model 5415-R) i es deslipidaven les mostres extraient la massa de greix que es forma sobre el sobrenedant. El sobrenedant s'emmagatzemava també a -80°C.

En el cas de teixits adiposos degut al seu alt contingut en greix es procedia a realitzar el protocol descrit pels PHP amb dues centrifugacions (veure Figura 13.).

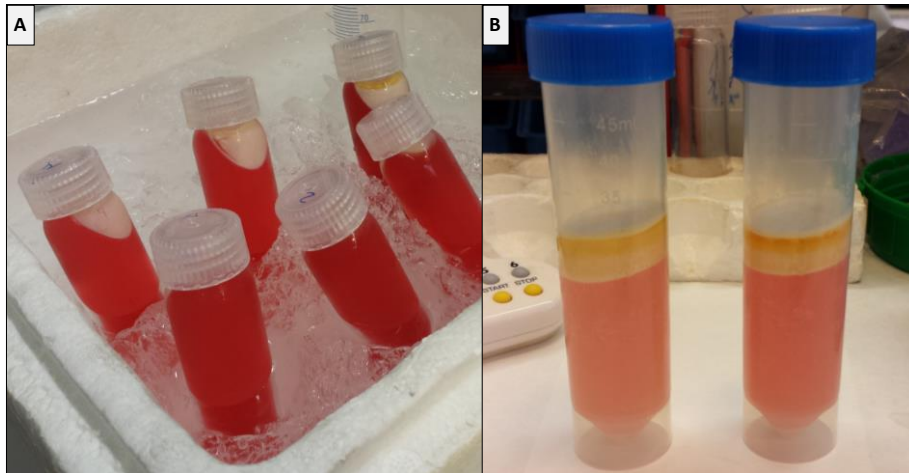


Figura 13. Homogenats de teixit. A) Homogenat de PHP. S'observa una petita massa de greix a sobre de l'infranadant de plasma. B) Homogenat de WAT. S'observa una gran massa de greix a sobre de l'infranadant d'homogenat del teixit.

Cromatografia columna gran

Tot el procés es va fer a la cambra freda, a 4°C, mitjançant una bomba peristàltica (Minipuls 2) a un flux de 15 mL/h. Primer de tot, es va equilibrar la columna amb, com a mínim, 7 volums de columna de tampó d'equilibrat. En el moment previ a aplicar la mostra a la columna se li afegia NaCl a una concentració final de 0,15 M. Un cop aplicada la mostra, mitjançant un col·lector de fraccions (LKB Redi-Frac, Pharmacia), es van recollir fraccions d'un volum aproximat de 1,75 mL en *Eppendorf* de 2 mL cada 7 minuts.

Després d'aplicar la mostra es passaven, com a mínim, 9 volums de columna de tampó d'equilibrat (0,15 M NaCl) per tal de descartar les proteïnes que no s'havien unit a la columna d'HS. Després, es passaven 9 volums de columna de tampó de rentat I (0,75 M NaCl) per tal d'eluir les proteïnes amb baixa afinitat a l'HS. Tot seguit, es passaven 9 volums de columna del tampó d'elució (1,50 M NaCl) i s'elueïa l'LPL de l'HS.

Per tal de reutilitzar la columna, un cop acabada la cromatografia d'afinitat i amb l'LPL eluïda, es passaven, com a mínim, 9 volums del tampó de rentat II (2,50 M NaCl) per eluir la resta de proteïnes amb una elevada afinitat a l'HS. Aleshores, es regenerava la columna passant de manera alterna (3 vegades) 3 volums de columna dels tampons de regeneració bàsic i àcid. Si la columna es feia servir en menys d'una setmana es passava tampó d'equilibrat. Si el temps de reutilització era superior es passava tampó de conservació. A la Figura 14. es pot veure el muntatge de la cromatografia per a la semipurificació de l'LPL i en la Figura 15. es pot observar el pas de mostra a través de la columna.

De totes les fraccions que es van recollir, es van fer dues alíquotes: una de 25 µL per valorar-ne la concentració de proteïna total (veure apartat 3.3.1), i l'altre de 50 µL per valorar-ne l'activitat LPL (veure apartat 3.4) (a aquesta alíquota se li afegia BSA a una concentració final d'1 mg/mL per

tal de preservar l'activitat de l'enzim [201]). Totes les fraccions i alíquotes es conservaven a -80°C fins al moment de la seva utilització.

Cromatografia columna mitjana i petita

El procés és idèntic al descrit per les columnes grans. L'única variació era que, com el volum de columna era inferior, el temps total de duració de la cromatografia era menor.

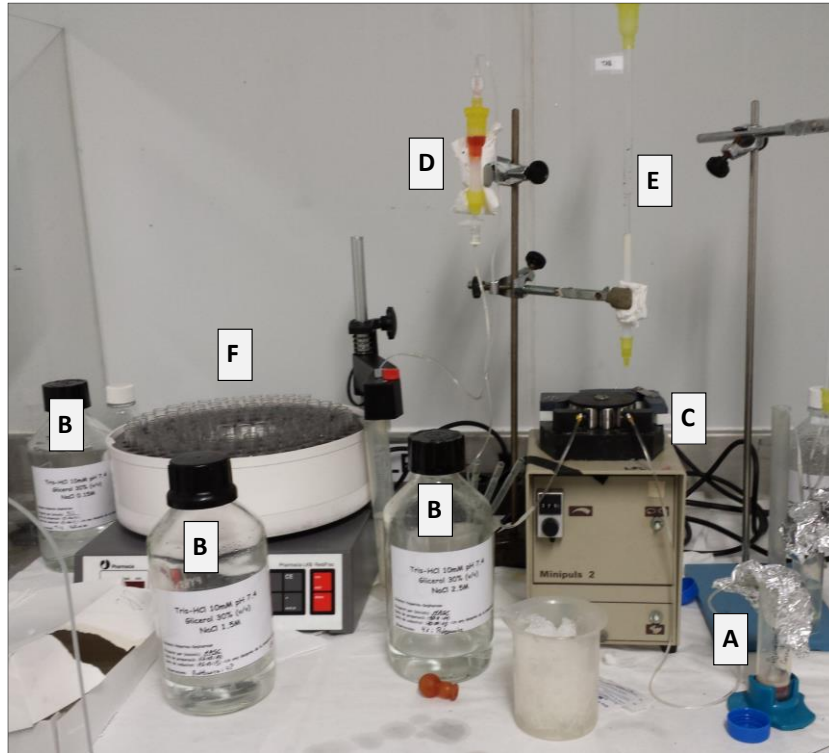


Figura 14. Muntatge i components de la cromatografia d'heparina-Sepharose. A) Mostra a passar per la columna. B) Tampons per la semipurificació de l'LPL. C) Bomba peristàltica. D) Columna petita amb HS. E) Columna mitjana amb HS. F) Col·lector de fraccions.

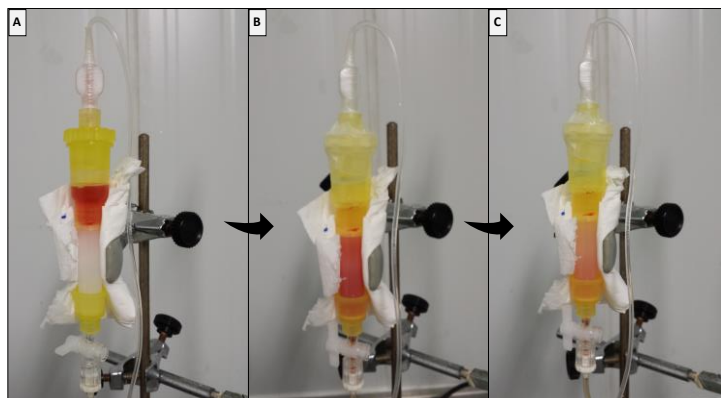


Figura 15. Pas de la mostra per la columna de cromatografia d'heparina-Sepharose. Observem el pas de mostra per la columna des del seu inici A), seguint pel seu pas a través de l'HS B) i finalitzant per la seva sortida de la columna camí del col·lector de fraccions C). En aquest últim punt la nostra proteïna d'interès, l'LPL, es troba ancorada a l'HS de la columna.

3.6 DEPLECIÓ D'IMMUNOGLOBULINA-G

Fonament del mètode

S'ha utilitzat la tècnica de cromatografia d'afinitat per a deplecionar una mostra de immunoglobulina G (IgG). El fonament del mètode és el mateix al descrit al apartat 3.5.

De manera general, la proteïna G té una millor afinitat per les IgG i una unió mínima a l'albumina, la qual cosa afavoreix una purificació més neta i un major rendiment. En aquesta tesi s'ha utilitzat les columnes HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare) per a deplecionar de IgG les mostres d'LPL semipurificades, mitjançant cromatografia d'afinitat a HS, procedents d'homogenats de PHP humans.

Reactius

- ◆ Columna HiTrap™ Protein G HP 1 mL (GE Healthcare)
- ◆ Solució d'unió

Fosfat de sodi pH=7,0	20 mM
-----------------------	-------
- ◆ Solució d'elució

Glicina-HCl pH=2,7	0,1 M
--------------------	-------

Procediment

Anomenarem **pool** a les barrejades de les diferents fraccions, resultants de la cromatografia d'afinitat a HS, amb més quantitat d'LPL activa. Com a criteri general, les fraccions que formaven part del *pool* complien les següents característiques: (i) la proteïna total no era detectable (concentració inferior a 60 µg/mL), (ii) l'activitat enzimàtica era superior a 10 mU/mL i (iii) la primera fracció del pool coincidia amb la de major activitat enzimàtica (sempre que la proteïna total fos no detectable). Aquests *pools* seran els que emprarem com a font d'LPL per als experiments d'aquesta tesi.

Es feia un *pool* amb les alíquotes que es volien de l'LPL semipurificada, mitjançant cromatografia d'afinitat a HS (veure apartat 3.5), procedent de PHP d'humans. La depleció es duia a terme a 4°C utilitzant una bomba peristàltica Minipuls 2 a un flux de 0,7 mL/min. Primer de tot es rentava la columna amb 10 mL del tampó d'unió. Tot seguit, s'aplicava tot el volum de la mostra i es recollia el líquid que sortia de la columna en un Falcon (Falcon 1). Seguidament es rentava la columna amb 500 µL de tampó d'unió i es recollia el líquid sortint en el mateix Falcon 1. Aquest Falcon 1 contenia l'LPL, entre altres proteïnes, però no contenia les IgG ja que aquestes havien quedat retingudes a la columna. Aleshores, es rentava la columna amb 10 mL de tampó d'unió i es recollia en el Falcon 2. Tot seguit, s'eluen les IgG aplicant a la columna 8 mL de tampó d'elució i recollint el líquid en el Falcon 3. Després, es rentava la columna amb 10 mL de tampó d'unió i, finalment, es rentava amb 10 mL de tampó d'unió amb etanol al 20% (v/v). Els 3 Falcons que es recollien s'emmagatzemaven a -80°C fins al moment de la seva anàlisi.

3.7 ELECTROFORESI I DETECCIÓ DE PROTEÏNES

3.7.1 Electroforesi SDS-PAGE (1DE) (PNT 0350600 EXP/017)

Fonament del mètode

L'electroforesi en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) (1DE) permet separar les proteïnes segons el seu MW. En aquesta tècnica les proteïnes es tracten amb un tampó que conté SDS, un detergent aniònic que desnatura i alhora confereix càrrega negativa a les proteïnes per la qual cosa es manté la relació càrrega/massa constant. A part de l'SDS, cal un agent reductor (com el β -mercaptoetanol o el DTT) per garantir que les proteïnes només conserven la seva estructura primària desnaturitzada. Aquest agent reductor trenca els enllaços disulfur de la proteïna i evita que la seva conformació interfereixi en la seva mobilitat electroforètica. Durant l'electroforesi, per acció d'un camp elèctric, les proteïnes migren pel gel de poliacrilamida que fa la funció de malla de manera que l'avanç de les proteïnes depèn, inversament, del seu MW.

Reactius

◆ Gel separador

Acrilamida-bisacrilamida (37,5:1 p/p) 30% (Bio-Rad)	9% (p/v)
Tris Base (Roche) (tampó Tris-HCl pH=8,8)	375 mM
SDS (Merck)	0,1% (p/v)
TEMED (Bio-Rad)	0,1% (v/v)
Persulfat amònic (APS) (Bio-Rad)	0,1% (p/v)

Els catalitzadors de la polimerització, TEMED i APS, s'afegeixen en darrer lloc.

◆ Gel concentrador

Acrilamida-bisacrilamida (37,5:1 p/p) 30% (Bio-Rad)	4% (p/v)
Tris Base (Roche) (tampó Tris-HCl pH=6,8)	125 mM
SDS (Merck)	0,1% (p/v)
TEMED (Bio-Rad)	0,2% (v/v)
Persulfat amònic (APS) (Bio-Rad)	0,2% (p/v)

Els catalitzadors de la polimerització, TEMED i APS, s'afegeixen en darrer lloc.

◆ Tampó de mostres x4 (*Sample Buffer*, SBx4)

Tris Base (Roche) (tampó Tris-HCl pH=6,8)	250 mM
Glicerol (Panreac)	40% (v/v)
SDS (Merck)	8% (p/v)

Blau de bromofenol (Sigma) un polsim (5-10 granets)

DTT (Amersham) 600 mM

Es conserva aliquotat i congelat a -20°C. El DTT es posa en el moment d'utilitzar el tampó.

◆ Tampó d'electroforesi

Glicina (Panreac) 192 mM

Tris Base (Roche) 25 mM

SDS (Merck) 0,1% (p/v)

Procediment

Operacions prèvies

Hi ha dues maneres de calcular la quantitat de mostra que s'ha de carregar al gel: per volum o per proteïna total. Si es carrega per volum s'obté una dada qualitativa de la concentració de la nostra proteïna d'interès en la mostra. Si es carrega per proteïna total s'obté una dada qualitativa de la proporció de la nostra proteïna d'interès respecte a la proteïna total de la mostra, ja que el volum de mostra carregat varia segons la seva concentració de proteïna total.

Per a l'SDS-PAGE es van utilitzar el sistema *Mini-Protean II* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Preparació dels gels de poliacrilamida

Primerament, es van muntar dos vidres (un de petit i un de gran amb dos separadors (1,5 mm *Western blot* (WB) i 1 mm tinció amb plata) a cada banda entremig) en el suport per a la polimerització i se'n va comprovar l'estanquitat del sistema amb aigua Milli-Q. Seguidament es va preparar el gel separador i es va abocar entre els dos vidres fins a cobrir unes $\frac{3}{4}$ parts del vidre petit. Tot seguit, i amb molt de compte, es va afegir 1 mL d'isopropanol al 83% (v/v). Al cap d'una hora, es va descartar l'isopropanol i es van fer 10 rentats amb aigua Milli-Q. Es va eixugar l'excés d'aigua de sobre el gel separador polimeritzat amb paper de filtre. Aleshores, es va abocar el gel concentrador i, ràpidament, es va col·locar la pinta (escollir el gruix segons gruix del gel i escollir nombre de pous segons mostres a carregar) evitant que quedessin bombolles. Es va deixar polimeritzar una hora a temperatura ambient. El gel es podia fer servir al mateix moment o es podia emmagatzemar tapat amb parafilm a 4°C durant 24 h.

Preparació de les mostres

El volum de cada mostra que es va aplicar va variar segons la seva concentració de proteïna. Cada mostra es va barrejar amb el tampó SBx4 suplementat amb DTT en una proporció 3:1 (v:v). Totes les mostres a analitzar es van bullir durant 10 minuts abans de ser carregades al gel. A l'inici de l'electroforesi es va aplicar un voltatge de 50 V durant 30 minuts. Seguidament, es va augmentar el voltatge fins a 150 V i fins que el front de blau de bromofenol va sortir del gel, moment en el qual es va aturar l'electroforesi. En aquest punt, i segons l'objecte d'estudi, es va tenyir el gel

per a visualitzar les proteïnes (veure apartat 3.7.3) o bé, es van transferir les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa per a una immunodetecció de la nostra proteïna d'interès (veure apartat 3.7.4).

3.7.2 Electroforesi bidimensional (2DE) (PNT 0350600 EXP/020)

L'anàlisi de proteïnes mitjançant 2DE que es descriu en aquest treball s'ha dut a terme en col·laboració amb el Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB (Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC, Barcelona).

Fonament del mètode

L'electroforesi bidimensional (2DE) és una tècnica que es basa en separar les proteïnes segons el seu punt isoelèctric (pI) en la primera dimensió mitjançant isoelectroenfocament (IEF) i segons el seu MW en la segona dimensió mitjançant SDS-PAGE. Aquesta tècnica permet fer una anàlisi global del proteoma i separar centenars de proteïnes ("spots") en un únic gel mostrant un patró característic. Quan finalitza la 2DE podem revelar el gel de poliacrilamida mitjançant WB (veure 3.7.4) o bé mitjançant tinció amb plata (veure 3.7.3).

En la primera fase del mètode o primera dimensió -l'IEF- les proteïnes es desplacen en un gradient de pH fins que el pH coincideix amb el seu pI, és a dir, on la seva càrrega neta és zero. La regió de l'ànode (positiva) és àcida i la del càtode (negativa) és bàsica. Les substàncies que es troben en regions de pH inferior al seu pI estaran carregades positivament i migraran cap al càtode, mentre que les que es troben en medis amb pH superiors al seu pI tindran càrrega negativa i migraran cap a l'ànode. Les molècules, doncs, es situen en estretes bandes on el seu pI coincideix amb el pH del gradient.

En la segona fase del mètode o segona dimensió -l'SDS-PAGE- les proteïnes es tracten amb un tampó que conté SDS, un detergent iònic que desnatura i alhora confereix càrrega negativa a les proteïnes per la qual cosa es manté la relació càrrega/massa constant. Durant l'electroforesi, per acció d'un camp elèctric, les proteïnes migren per un gel de poliacrilamida que fa la funció de malla de manera que l'avanç de les proteïnes depèn, inversament, del seu MW.

Tant en la primera com en la segona dimensió per garantir que les proteïnes només conserven la seva estructura primària cal desnaturar-les emprant algun agent reductor, com el DTT, per trencar els enllaços disulfur de la proteïna i evitar que la conformació interfereixi en la seva mobilitat electroforètica.

Reactius

- ◆ Tampó de rehidratació amb IPG buffer (*Rehydration buffer*)

Urea (GE Healthcare)	7 M
Tiourea (GE Healthcare)	2 M
CHAPS (Sigma)	2% (p/v)
Blau de bromofenol (Sigma) un polsim (5-10 granets)	

IPG buffer (del mateix rang de pH que la tira) (GE Healthcare)	0,5% (v/v)
DTT (Plus One DTT, GE Healthcare)	18 mM
DeStreak (GE Healthcare)	1,2% v/v

El DTT (per les mostres) o el DeStreak (per les tires) s'afegeixen en el moment d'utilitzar-lo.

◆ Gel separador

Acrilamida-bisacrilamida (37,5:1 p/p) 30% (Bio-Rad)	9 % (p/v)
Tris Base (Roche) (tampó Tris-HCl pH=8,8)	375 mM
SDS (Merck)	0,1% (p/v)
TEMED (Bio-Rad)	0,1% (v/v)
Persulfat amònic (APS) (Bio-Rad)	0,1% (p/v)

Els catalitzadors de la polimerització, TEMED i APS, s'afegeixen en darrer lloc.

◆ Tampó de mostres x4 (*Sample Buffer, SBx4*)

Tris Base (Roche) (tampó Tris-HCl pH=6,8)	250 mM
Glicerol (Panrea)	40% (v/v)
SDS (Merck)	8% (p/v)
Blau de bromofenol (Sigma) un polsim (5-10 granets)	
DTT (Amersham)	600 mM

Es conserva aliquotat i congelat a -20°C. El DTT es posa en el moment d'utilitzar el tampó.

◆ Tampó d'equilibrat SDS (*SDS equilibration buffer*)

Tris Base (Roche) (tampó Tris-HCl pH=8,8)	50 mM
Urea (GE Healthcare)	6 M
Glicerol (Panreac)	30% v/v
SDS (Merck)	8% p/v
DTT (Amersham)	600 mM

El DTT (per les mostres) s'afegeix en el moment d'utilitzar-lo.

◆ Solució de segellat d'agarosa

Agarosa (Lonza)	0,5% p/v
Tris Base (Roche Diagnostics)	25 mM
SDS (Merck)	0,1% p/v
Glicina (Panreac)	192 mM
Blau de bromofenol (Sigma) un polsim (5-10 granets)	

- ◆ Tampó d'electroforesi

Glicina (Panreac)	192 mM
Tris Base (Roche Diagnostics)	25 mM
SDS (Merck)	0,1% (v/v)
- ◆ Lipoproteïna lipasa bovina (LPLb) (Sigma)
- ◆ Iodoacetamida (IAA) (Sigma)
- ◆ Tires de gradient immobilitzat de pH (IPG *strips*) (rang de pH 3-10 o 6-11 i llargada 7 cm o 11 cm) (GE Healthcare)
- ◆ Oli mineral per cobrir les tires (*Immobiline Drystrip Cover Fluid*) (GE Healthcare)
- ◆ Àcid tricloroacètic (TCA) (Panreac)
- ◆ Acetona (Panreac)

Procediment

Operacions prèvies

Hem de tenir en compte que, com a màxim, es poden carregar 300 µg de proteïna per tira IPG. Sempre es va carregar per sota d'aquest llinar. També s'ha d'evitar carregar un volum superior a 100 µL, ja que aquest és el màxim que admet el carregador de mostra o *cup-loading*.

Per realitzar les 2DE de les purificacions parcials d'LPL mitjançant cromatografia d'afinitat a HS (veure 3.5) cal fer una precipitació prèvia amb TCA. Tot el procés es va realitzar sempre en fred. Primerament es va afegir gota a gota TCA (5% p/v, concentració final) fred (4°C) sobre la mostra en agitació suau i constant. Aleshores el tub amb la mostra i el TCA es va incubar durant 1 h a 4°C en un orbital vertical. Tot seguit, es va centrifugar durant 10 minuts a 16.100 *g* i a 4°C i es va descartar el sobrenedant. Aleshores, es van realitzar dos rentats amb TCA fred (5% p/v, concentració final) centrifugant la mostra durant 5 minuts a 16.100 *g* i a 4°C, per eliminar restes de sals. Seguidament, es va realitzar un últim rentat amb acetona freda (-20°C) i es va centrifugar durant 1 minut a 16.100 *g* i a 4°C. Aquest últim pas servia per eliminar les restes de TCA. Després de retirar l'acetona es va deixar assecar el tub obert amb el precipitat dins una campana de gasos durant 5-10 minuts. Finalment, la mostra es va resolubilitzar en tampó de rehidratació amb DTT (35-40 µL) i es va sonicar (sempre mantenint el tub en fred) alternant, durant 1 minut, intervals de 5 segons de sonicació (amplitud 30%, sonicador UPH100, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemanya) i 5 segons de repòs. Les mostres es congelaven a -80°C.

Hidratació dels IPG *strips*

Les tires IPG es van rehidratar de manera individual dins un sarcòfag de ceràmica de la mida de la tira a rehidratar. Es va afegir el volum necessari (125 µL tires 7 cm o 200 µL tires 11 cm) de tampó de rehidratació amb *DeStreak* en el sarcòfag procurant no fer bombolles. Es va agafar la tira del congelador i, amb molt de compte, es va separar la tira de la coberta

protectora de plàstic per l'extrem positiu. Aleshores es va agafar la tira amb unes pinces per l'extrem negatiu i, amb el gel de la tira cap a baix, es va posar la tira dins el sarcòfag mullant-la amb el tampó i procurant que quedés molla homogèniament. Finalment, es va cobrir la tira amb oli mineral i es va col·locar el sarcòfag a la placa de ceràmica del aparell d'IEF (Ettan IPG*phor* II, GE Healthcare) amb la temperatura ajustada a 20°C. Es van rehidratar les tires un mínim de 12 hores. Un cop les tires ja estan hidratades: (i) es van agafar per un extrem amb l'ajut d'unes pinces, (ii) es va escórrer l'excés d'oli i (iii) es van guardar en una pipeta estèril de 25 mL partida per la meitat a -20°C en posició horitzontal (es va posar paper d'alumini fixat amb parafilm als extrems de la pipeta).

Aplicació de la mostra per *cup-loading*

Es va treure una tira IPG rehidratada del congelador i, amb l'ajut d'unes pinces es va agafar la tira per l'extrem negatiu i es va col·locar dins un sarcòfag de ceràmica amb el gel de la tira cap a munt. A la Figura 16. es pot veure un esquema del muntatge aquí descrit. Es va cobrir la tira amb oli mineral per evitar que la urea precipiti durant l'IEF. Es van submergir amb aigua Milli-Q dos papers absorbents (*Paper Wicks*, GE Healthcare) i es van col·locar a ambdós extrems de la tira (aproximadament havien de tapar 0,5 cm de tira) per tal de que absorbissin les sals del tampó de rehidratació. Es van col·locar dos elèctrodes (un per cada extrem de la tira) sobre les tires absorbents de manera que la base metàl·lica dels elèctrodes estigués en contacte amb el gel de la tira (amb el paper absorbent entremig) i que les potes dels elèctrodes toquessin la part metàl·lica del sarcòfag. S'havia de vigilar que les parts metàl·liques del sarcòfag estiguessin en contacte amb les parts metàl·liques de la placa de ceràmica del aparell d'IEF. Tot seguit, es va col·locar el carregador de mostra just a continuació de l'elèctrode que estava a l'extrem negatiu de la tira de manera que la càrrega de la mostra es va fer al extrem bàsic de la tira, al càtode. Si calia, es va acabar de cobrir la tira amb oli mineral.

Finalment, es va carregar tota la mostra precipitada prèviament amb TCA i congelada a -80°C dins del carregador de mostra. Es va tapar el sarcòfag amb la seva tapa de plàstic i es va tancar la tapa del IPG*phor*.

Isoelectroenfocament (primera dimensió)

Es va programar l'IPG*phor* segons l'IEF que es volgués dur a terme. Les condicions depenien de la mida de les tires IPG i del tipus de mostra a enfocar (veure Taula 5.).

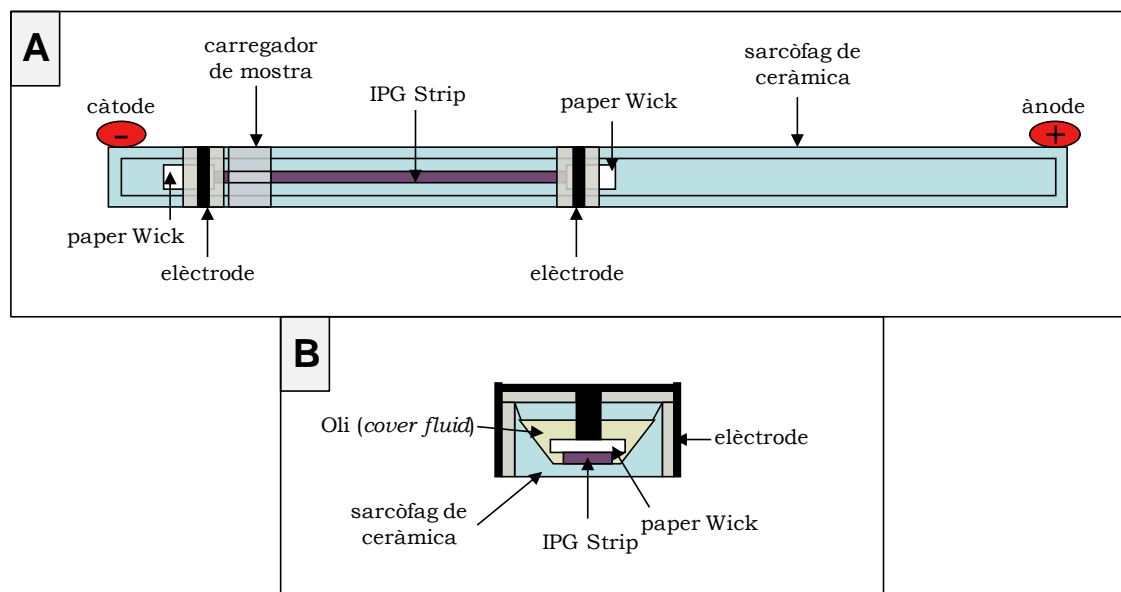


Figura 16. Esquema del muntatge per la primera dimensió. A) Visió des de dalt. B) Tall transversal sarcòfag de ceràmica.

Strip (cm)	Species	Step	Voltage (V)	Duration (h)	Volt-hours (Vh)	Gradient type
7	Rat	1	500	1	-	Gradient
		2	1000	1	-	Gradient
		3	5000	1	-	Gradient
		4	5000	-	25000	Step-n-hold
Strip (cm)	Species	Step	Voltage (V)	Duration (h)	Volt-hours (Vh)	Gradient type
11	Rat	1	500	1	-	Gradient
		2	1000	1	-	Gradient
		3	5000	1	-	Gradient
		4	5000	-	35000-42000	Step-n-hold
Strip (cm)	Species	Step	Voltage (V)	Duration (h)	Volt-hours (Vh)	Gradient type
18	Rat	1	500	1	-	Gradient
		2	1000	1	-	Gradient
		3	5000	1	-	Gradient
		4	5000	-	50000-60000	Step-n-hold
Strip (cm)	Species	Step	Voltage (V)	Duration (h)	Volt-hours (Vh)	Gradient type
11	Human	1	500	1	-	Gradient
		2	1000	1	-	Gradient
		3	5000	1	-	Gradient
		4	5000	-	20000-25000	Step-n-hold

Taula 5. Programes per a l'isoelectroenfocament. Sempre es va fer l'IEF a 20°C i amb una intensitat de corrent màxima limitada a 50 μ A/tira.

Un cop s'havia arribat als Vh programats l'aparell s'aturava (sol o manualment). Si es preveia que quan acabés l'IEF no es podia guardar la tira enfocada, s'afegia un cinquè pas o *step* (*step* de seguretat). Aquest últim pas era programat a 500 V, 24 h, *step-n-hold* i servia per evitar el desenfocament de les proteïnes. La tira amb l'IEF finalitzat s'emmagatzemava en una meitat d'una pipeta de 25 mL de plàstic estèril i es segellava amb paper d'alumini i parafilm als extrems. Finalment, es guardava la tira a -20°C fins al moment de realitzar la segona dimensió.

Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (segona dimensió)

Es va preparar un gel separador tal i com es descriu al apartat 3.7.1. Com a control positiu es va fer servir LPL bovina comercial barrejada amb marcador de MW. Aquesta barreja s'aplicava a un paper Whatmann de 0,5 cm x 0,5 cm i es deixava assecar abans de fer el muntatge amb la tira IPG enfocada. En el cas de voler realitzar un WB, abans de col·locar la tira enfocada en contacte amb el gel separador de poliacrilamida calia equilibrar-la durant 15 minuts en tampó d'equilibrat SDS amb DTT (10 mg/mL). Si, per contra, es volia realitzar una tinció amb plata, a part del primer equilibrat amb DTT, també calia equilibrar la tira durant 15 minuts en tampó d'equilibrat SDS amb IAA (25 mg/mL). Aquest segon equilibrat amb IAA no es realitzava mai si volíem analitzar la 2DE per WB per evitar possibles interaccions amb l'epítip i en el reconeixement antigen-anticòs com a conseqüència de l'alquilació amb IAA. El volum de tampó d'equilibrat era 2,5 mL per tires de 7 o 11 cm i de 5 mL per tires de 18 cm.

Les tires IPG d'11 cm són massa llargues per el sistema Mini-Protean II Cell, aleshores calia tallar-les per tal de poder fer la segona dimensió. Si la part d'interès era la regió més àcida de la tira, calia fer el següent: col·locar la tira enfocada i congelada sobre una safata de plàstic i amb l'ajut d'un regle i un bisturí tallar 7,5 cm de gel començant des de l'extrem positiu. Aleshores, amb unes pinces, agafar la tira per l'extrem positiu i equilibrar-la. L'extrem sobrant de la tira es podia posar a equilibrar també si interessava analitzar la totalitat de la tira en aquell moment o bé es podia tornar a guardar al congelador per si es volia fer més endavant. Si la part d'interès era la regió més bàsica de la tira, es tallaven 7,5 cm de gel començant per l'extrem negatiu del gel. Les tires IPG de 18 cm són massa grans pel Mini-Protean II Cell. Per analitzar-les cal fer servir el sistema Protean XL.

Després del pas d'equilibrat de la tira, aquesta es va col·locar en contacte amb el gel de poliacrilamida. També es va col·locar el paper Whatmann (control positiu i marcador de MW) tenint cura que aquest no toqués el gel de poliacrilamida. Aleshores, es va segellar amb solució de segellat d'agarosa i es va dur a terme l' SDS-PAGE segons està descrit al apartat 3.7.1. A la Figura 17. hi ha esquematitzat el muntatge per a la realització de l' SDS-PAGE. Un cop finalitzava l' SDS-PAGE o es realitzava una tinció amb plata (veure 3.7.3) o es transferien les proteïnes a una membrana per a una immunodetecció d'LPL per WB (veure 3.7.4).

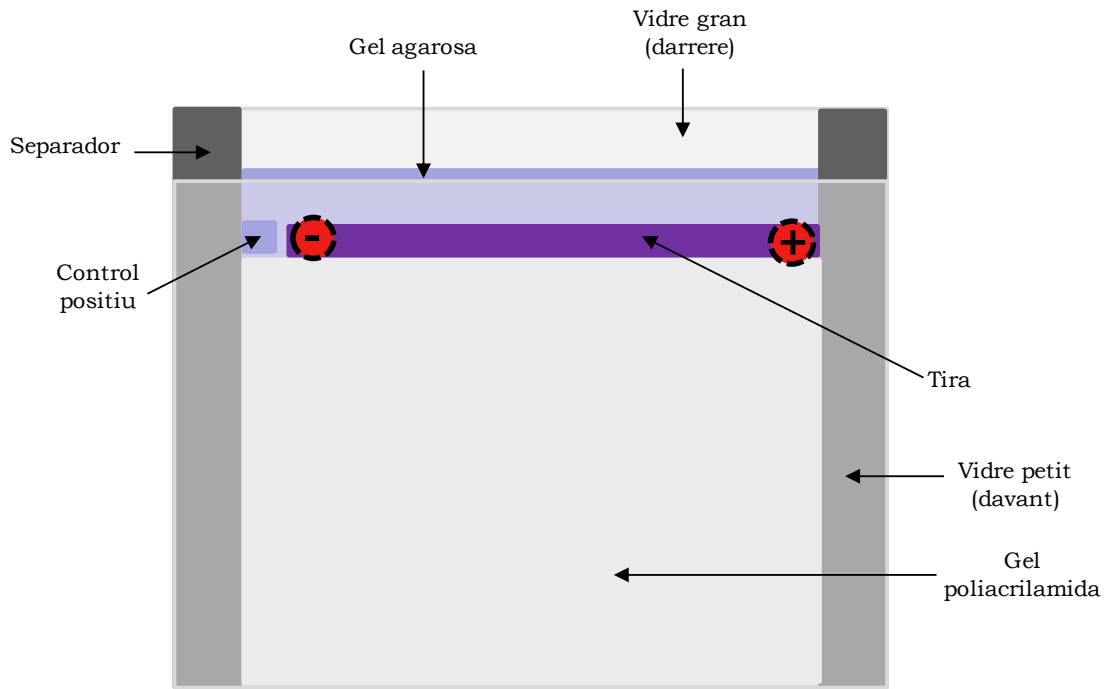


Figura 17. Esquema del muntatge per l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (segona dimensió).

3.7.3 Tinció amb plata de proteïnes en gels de poliacrilamida (PNT 0350600 EXP/021)

Fonament del mètode

Es va utilitzar una variació basada en Shevchenko [203] del mètode de tinció amb plata descrit per Heukeshoven [204] per visualitzar les proteïnes després de l' SDS-PAGE. Aquest mètode és totalment compatible amb l'anàlisi per espectrometria de masses de les proteïnes sempre que no s'utilitzi glutaraldehyd. L'assaig és un procediment basat en l'afinitat de les proteïnes pel catió plata (Ag^+), extremadament sensible per detectar petites quantitats de proteïnes en gels de poliacrilamida. Es revela per la reducció del nitrat de plata amb formaldehyd a pH bàsic i permet detectar aproximadament 1 ng de proteïna.

La tinció consta bàsicament dels següents passos: **fixació** (immobilitza les proteïnes en el gel i permet eliminar compostos com el Tris, la glicina i detergents com l' SDS amb una elevada afinitat per la plata); **sensibilització** (millora la unió de la plata a les proteïnes i augmenta la velocitat de la reducció de la plata); **tinció** (impregna el gel amb nitrat de plata); **revelat** (redueix a plata metàl·lica els ions de plata units a les proteïnes) i **aturada del revelat**.

Reactius

Vàrem emprar el kit *PlusOne Silver Staining kit, Protein* (GE Healthcare) pel procés de tinció. Totes les solucions es van preparar amb aigua Milli-Q (Millipore).

♦ **Fixació**

Etanol (Merck)	40% (v/v)
Àcid acètic (Panreac)	10% (v/v)

♦ **Sensibilització**

Etanol (Merck)	30% (v/v)
Tiosulfat de sodi (Na ₂ S ₂ O ₃) (kit)	0,2% (p/v)
Acetat sòdic (kit)	6,8% (p/v)

♦ **Tinció**

Nitrat de plata (AgNO ₃) (kit)	0,25% (p/v)
--	-------------

♦ **Revelat**

Carbonat sòdic (Na ₂ CO ₃) (kit)	2,5% (p/v)
Formaldehid (HCOH) (kit)	0,0148% (p/v)

♦ **Aturada**

EDTA-Na ₂ ·H ₂ O (kit)	1,46% (p/v)
--	-------------

Procediment

Un cop finalitzat l'SDS-PAGE (veure apartats 3.7.1 i 3.7.2), es va col·locar el gel de poliacrilamida dins una carmanyola de vidre hermètica amb la solució de fixació. Es va seguir el protocol que es detalla a continuació i pels canvis de solucions decantàvem el líquid a un vas de precipitats.

La carmanyola amb el gel i la solució corresponent s'agiten suaument i de manera horitzontal:

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. Fixació | 30 minuts. Es pot deixar o/n a 4°C sense agitació. |
| 2. Sensibilització | 30 minuts |
| 3. Rentats amb aigua Milli-Q | 3 rentats x 5 minuts |
| 4. Tinció | 20 minuts |
| 5. Rentats amb aigua Milli-Q | 2 rentats x 1 minut |
| 6. Revelat | 2-5 minuts (controlar visualment el revelat perquè és de durada variable) |
| 7. Aturada | 10 minuts |
| 8. Rentats amb aigua Milli-Q | 3 rentats x 5 minuts |

3.7.4 Immunodetecció de lipoproteïna lipasa per *Western blot* (PNT 0350600 EXP/017)

Fonament del mètode

L'assaig de tipus WB és un mètode qualitatiu per a la detecció específica de proteïnes basat en la immunodetecció d'antigens amb anticossos específics. Després de separar les proteïnes per SDS-PAGE (veure apartats 3.7.1 i 3.7.2) en un gel de poliacrilamida es transfereixen i es fixen a una membrana on es fa la detecció específica de la proteïna mitjançant un sistema de dos anticossos i una reacció enzimàtica associada. L'anticòs primari reconeix específicament la proteïna d'interès i, l'anticòs secundari, reconeix al primari i en fa possible la seva detecció. Hi ha diversos sistemes per a detectar l'anticòs secundari però el més utilitzat és l'ús d'una peroxidasa (s'utilitza un substrat que, per acció de la peroxidasa, genera un producte luminescent). La intensitat lumínica obtinguda és directament proporcional a l'abundància relativa de la proteïna de la mostra.

Reactius

- ◆ Tampó de transferència

Glicina (Panreac)	192 mM
Tris Base (Roche)	25 mM
Metanol (Merck)	10% (v/v)
- ◆ Tampó TBS pH=7,4

Tris Base (Roche) (Tris-HCl)	20 mM
NaCl (Panreac)	137 mM
- ◆ Tampó de bloqueig

Llet desnatada en pols (Sveltesse) en TBS	5% (p/v)
---	----------
- ◆ Tampó de rentat TBS-Tween

Tween 20 (Sigma) en TBS	0,1% (v/v)
-------------------------	------------
- ◆ Anticòs primari *mouse monoclonal to lipoprotein lipase antibody* (5D2) (cedit pel Dr. J. D. Brunzell, Universitat de Washington, Seattle, EUA)
- ◆ Anticòs secundari *goat antimouse IgG (GAM)* (Chemicon)
- ◆ Substrat de la peroxidasa *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* o *SuperSignal West Duro Chemiluminescent Substrate* (Pierce).
- ◆ Films de detecció de quimioluminescència Hyperfilm ECL (Amersham)

Procediment

Transferència

Un cop finalitzada l'electroforesi (veure apartats 3.7.1 i 3.7.2) es procedí a fer la transferència de les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa utilitzant el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Acabada l'electroforesi el gel de poliacrilamida es submergia en tampó de transferència 15 minuts per tal d'equilibrar-lo amb el tampó. També es submergien en una carmanyola a part: la membrana de nitrocel·lulosa, dues esponges i dos papers Whatmann (tot de la mida del gel). Passat el temps d'equilibrat es muntava el "sandvitx" sempre sobre la cara negra del suport en forma de llibre. L'ordre a seguir per muntar aquest "sandvitx" era el següent: esponja, paper Whatmann, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocel·lulosa, paper Whatmann i esponja. Es procurava que no quedessin bombolles entre el gel i la membrana aplanant-la amb l'ajut d'una vareta de vidre. Un cop encaixava el "sandvitx", s'afegia un bloc refrigerant i s'omplia la cubeta amb tampó de transferència i es duia a terme la transferència, a 100 V i durant 1 h.

Detecció

Un cop finalitzada la transferència es bloquejava la membrana dins una carmanyola amb tampó de bloqueig durant 1 h en un bany en agitació suau i a 37°C. S'incubava la membrana a 4°C o/n amb l'anticòs primari 5D2 a una concentració de 1:2000 (dilució en tampó d'incubació).

Al dia següent, es feien tres rentats vigorosos de la membrana dins una carmanyola amb tampó de rentat TBS-Tween (un rentat de 10 minuts i els altres dos de 5 minuts). Seguidament es feien tres rentats vigorosos de 5 minuts cadascun amb tampó TBS. Aleshores, es procedia a la incubació de la membrana amb l'anticòs secundari GAM a una concentració de 1:5000 (dilució en tampó d'incubació) durant 2 h a temperatura ambient. Passat el temps d'incubació, es repetien els rentats amb TBS-Tween i TBS. Aleshores, es preparava el substrat de la peroxidasa barrejant els dos components del substrat (un que conté el peròxid d'hidrogen i l'altre que conté luminol i un amplificador del senyal) en una relació 1:1 sobre una safata de plàstic. Es col·locava la membrana de manera que la cara on estaven transferides les proteïnes estigués en contacte amb el substrat de la peroxidasa i s'incubava a les fosques durant 5 minuts. Finalment, es detectava la luminescència mitjançant un film de detecció de quimioluminescència que es revelava en un autorevelador de films (Fujifilm FPM-100A).

3.8 ÀNALISI DE L'LPL PER ESPECTROMETRIA DE MASSES

Tot el treball descrit en aquesta tesi que fa referència a l'anàlisi i identificació de proteïnes s'ha dut a terme en col·laboració amb el Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB (Institut d'investigacions Biomèdiques de Barcelona) amb la Dra. Montserrat Carrascal i el Dr. Joaquín Abián.

L'espectrometria de masses (MS) és una eina comuna per a l'anàlisi i la identificació de proteïnes. De manera més habitual, les proteïnes a identificar provenen d'una separació prèvia mitjançant electroforesi uni o bidimensional que, un cop separades, es digereixen mitjançant una endoproteasa específica per, seguidament, analitzar per espectrometria de masses els pèptids generats. L'espectròmetre de masses està compost per tres unitats funcionals [205]: 1) font d'ionització (ionitza molècules i les transfereix a una fase gasosa), 2) analitzador de massa (separa els ions en funció de la seva relació massa/càrrega (m/z)) i 3) detector (registra el corrent produït pels ions).

Les fonts d'ionització suaus més habituals són: la ionització per electroesprai (ESI) [206-208] o la ionització/desorció per làser assistida per matriu (MALDI) [207, 209-211]. L'ESI es sol acoblar a la cromatografia líquida capil·lar acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS). L'analitzador de massa més comú que s'acobla a la font MALDI és l'analitzador de temps de vol (TOF, *time of flight*).

En aquesta tesi, segons l'objectiu que es volia aconseguir de la mostra a analitzar, es van utilitzar tècniques diferents: per identificació de proteïnes per mapatge peptídic (PMF) el MALDI-TOF i per seqüenciació de pèptids l'ESI-LC-MS/MS.

3.8.1 Digestió de proteïnes en gel

Fonament del mètode

La digestió de proteïnes s'utilitza per obtenir pèptids procedents d'una proteïna que és hidrolitzada en un o més enllaços peptídics. El fet de treballar amb pèptids i no amb la proteïna íntegra millora la sensibilitat de les diferents tècniques d'espectrometria de masses. En aquesta tesi hem utilitzat la tripsina modificada (lisines metilades) com a endoproteasa perquè presenta: (i) una elevada especificitat, (ii) una baixa autòlisi (pocs contaminants derivats de la pròpia tripsina) i (iii) una acció de tall al extrem C-terminal de lisines i arginines (aquests aminoàcids presenten sempre càrrega positiva i produeixen pèptids adequats per l'anàlisi espectromètrica).

En el present treball, totes les mostres a analitzar per MS provenien d'un gel de poliacrilamida tenyit amb plata resultat d'una 2DE. S'analitzaven, doncs, només les taques d'interès de cada gel disminuint així la complexitat de la mostra. Dues desavantatges de que les mostres estiguin incloses dins un gel són: (i) la digestió de les proteïnes (el ventall d'endoproteases a utilitzar es veu molt reduït) i (ii) l'elució dels pèptids obtinguts en la digestió (el nombre total de pèptids generats podria ser menor).

Reactius

- ◆ Acetonitril (ACN) (Merck)
- ◆ Àcid trifluoroacètic (TFA) (Sigma)
- ◆ Tampó bicarbonat pH 7,8 (NH₄HCO₃) 20 mM
- ◆ Tampó de reducció pH 7,8
 - DTT (Amersham) 10 mM
 - NH₄HCO₃ 20 mM
- ◆ Tampó de carbamidometilació pH 7,8
 - IAA (Sigma) 55 mM
 - NH₄HCO₃ 20 mM
- ◆ Tampó de digestió pH 7,8
 - Tripsina (ref. V5280, Promega)
 - NH₄HCO₃ 20 mM

Procediment

Per evitar possibles contaminacions de les mostres aquestes s'han de mantenir sempre lo més aïllades possibles. Per a manipular els gels de poliacrilamida es treballa en una campana de flux laminar i amb tot el material rentat amb etanol.

Les mostres a analitzar, en forma de taques en els gels de poliacrilamida provinents d'una 2DE, es van retallar amb un bisturí sobre una placa de vidre netejada prèviament amb ACN i es van incloure en una placa de digestió d'un digestor automàtic (DigestPro, Intavis, Germany).

Els passos següents van ser: 1) rentar les mostres amb tampó bicarbonat, 2) deshidratar les mostres amb ACN, 3) rentar les mostres amb tampó de reducció (30 minuts a 56°C), 4) rentar les mostres amb tampó de carbamidometilació (30 minuts 25°C), 5) rentar les mostres amb tampó bicarbonat, 6) deshidratar les mostres amb ACN i 7) incubar les mostres amb el tampó de digestió amb tripsina (8 h a 37°C).

L'elució dels pèptids generats es va fer en una placa de col·lecció amb l'addició d'una solució d'ACN/aigua 1:1 (v:v) i TFA 0,25% (v/v). Seguidament, els pèptids extrets es van transferir a microtubs on van ser assecats per, posteriorment, dissoldre'ls en 5 µL d'una solució d'ACN/aigua 1:1 (v:v) i TFA 0,1% (v/v). Totes les extraccions s'emmagatzemaven a -80°C.

3.8.2 Identificació per mapatge peptídic**Fonament del mètode**

La identificació de proteïnes mitjançant PMF es realitza determinant la relació massa/càrrega dels pèptids generats per la hidròlisi de les proteïnes mitjançant un espectròmetre de masses (veure Figura 18.). Les masses dels pèptids obtinguts experimentalment són comparades amb altres

masses de pèptids, mitjançant una digestió *in silico*, en una base de dades de proteïnes de les quals es coneix la seva seqüència aminoacídica. La comparació entre l'empremta peptídica obtinguda experimentalment i l'obtinguda *in silico* ens permet associar la proteïna a identificar amb la més semblant de la base de dades.

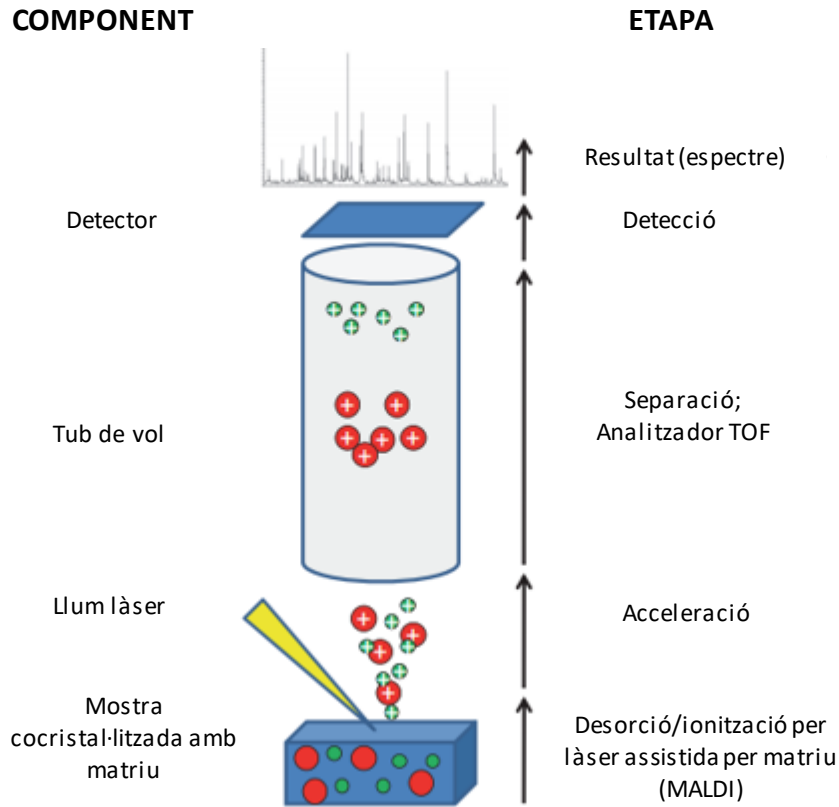


Figura 18. Representació del procés d'ionització amb una font d'ionització/desorció per làser assistida per matriu. La mostra es cristal·litza amb la matriu en una placa metàl·lica conductora. Després, la placa s'introdueix en el espectròmetre de masses i és bombardejada amb pulsacions de llum làser. Les molècules ionitzades són accelerades a través d'un camp electroestàtic i són expulsades a través d'un tub de vol de metall sotmès al buit fins que arriben al detector. Els ions més petits viatgen més ràpid que els grans. Així, els anàlits separats segons el seu TOF creen un espectre de masses que està compost per pics de relació massa/càrrega (m/z) amb intensitats variables. Figura adaptada de Croxatto *et al.* [205].

En aquesta tesi es va utilitzar per a determinar la massa dels pèptids un espectròmetre de masses MALDI-TOF/TOF (4800TOF/TOF, Applied Biosystems).

Reactius

- ◆ Matriu (3 mg/mL àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic (Bruker Daltonics) en ACN/aigua 2:1 (v:v); TFA 0,1% (v/v)
- ◆ TFA (Sigma)
- ◆ Barreges estàndard de pèptids per calibració externa (Calibration Mixture 1 i Calibration Mixture 2) (Applied Biosystems)

Procediment

A una placa de MALDI de 384 pouets (Applied Biosystems) s'aplicaven 0,5 μ L de l'extracció de pèptids i el mateix volum de matriu. Un cop secs els pouets, s'analitzava la placa de manera automàtica i calibrant els espectres externament obtinguts amb la barreja de pèptids estàndard. Per a la calibració interna dels espectres s'utilitzaven els ions resultants de l'autòlisi de la tripsina. D'aquest espectre, s'obtenia un llistat de pics i s'identificaven, per comparació, les proteïnes de la mostra inicial mitjançant cerca en bases de dades utilitzant el programa MASCOT.

3.8.3 Seqüenciació de pèptids per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem en trampa iònica**Fonament del mètode**

En aquesta tesi per a la seqüenciació de pèptids es va utilitzar l'LC-MS/MS en trampa iònica. Com a font d'ionització suau (provoca una baixa fragmentació molecular i proporciona una gran sensibilitat) es va utilitzar la ionització per ESI.

Com a analitzador es va utilitzar una trampa d'ions lineal (Velos LTQ, Thermo Fisher Scientific) que es basa en el confinament d'ions amb òrbites estables (aïllament d'ió precursor) dins un anell per acció de camps elèctrics. Els ions inestables xoquen amb les parets de l'anell. Per a obtenir l'espectre de masses es desestabilitza l'ió precursor (augmentant la radiofreqüència del potencial aplicat) i es fragmenta per poder ser analitzat.

En resum, el pèptids eren carregats en una columna capil·lar de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) acoblada a l'espectròmetre de masses. Seguidament, eren ionitzats mitjançant una font ESI a mesura que eren eluïts de la columna. Els ions produïts entraven dins la trampa iònica per a l'anàlisi MS/MS on, primer, s'aïllava l'ió precursor i, després, es fragmentava per ser analitzat.

Reactius

- ◆ Solució de dilució

Àcid fòrmic (Sigma)	1% (v/v)
Metanol (Sigma)	5% (v/v)
- ◆ Solució A HPLC (àc. fòrmic en aigua) 0,1% (v/v)
- ◆ Solució B HPLC (àc. fòrmic en ACN) 0,1% (v/v)

Procediment

L'extracte de pèptids es diluïa fins a 40 µL de la solució de dilució i s'aplicava amb un flux de 20 µL/min a un cartutx de preconcentració C18 (Agilent Technologies) acoblat a una columna analítica C18 (Nikkoyo Technos Co.) de 15 cm de longitud i 150 µm de diàmetre. L'elució dels pèptids es feia a un flux de 1 µL/min durant 60 minuts en un gradient del 3 al 40% de Solució B (en Solució A). El sistema HPLC emprat (Agilent 1200, Agilent Technologies), presentava una bomba capil·lar, una bomba binària, un microinjector amb termòstat i una microvàlvula. Després de l'elució, els pèptids eren ionitzats en el mode d'ió positiu i amb un voltatge d'electrosprai de 2 kV. L'analitzador de la trampa iònica LTQ-Velos s'utilitzava en mode positiu.

Per a l'anàlisi espectrofotomètrica es van escollir els 10 pèptids més abundants en cada cicle (amb un rastreig complet d'un rang d'entre 450 i 2000 m/z) i es van estudiar 10 dels seus espectres de fragmentació. Per minimitzar l'obtenció d'espectres redundants es va utilitzar un temps d'exclusió de 25 segons. La seqüenciació dels pèptids requeria una cerca en bases de dades.

3.8.4 Cerca en bases de dades

3.8.4.1 Identificació de proteïnes per mapatge peptídic

Per a la identificació de proteïnes per PMF es va utilitzar el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) amb la base de dades UniProtKB/Swiss-Prot. Per cada mostra es van obtenir 1 espectre MS i 5 espectres MS/MS dels ions més abundants. Es van emprar els humans o les rates com a grup taxonòmic depenent de l'origen de la mostra a analitzar. Els paràmetres establerts a les cerques eren: tripsina com a enzim de digestió, fins a 2 talls omesos per la tripsina, carbamidometilació de cisteïna (+57 Da), oxidació de metionina (+16 Da), un nombre mínim de 4 pèptids assignats a cada proteïna identificada i una tolerància màxima d'error de 50 ppm.

3.8.4.2 Seqüenciació i identificació de proteïnes

Per a la seqüenciació i identificació de proteïnes a partir dels espectres de fragmentació obtinguts en l'anàlisi per ESI-LC-MS/MS es va utilitzar el programa SEQUEST (Proteome Discoverer v1.3, ThermoFisher) utilitzant la base de dades UniProtKB/Swiss-Prot. Es van emprar els humans o les rates com a grup taxonòmic depenent de l'origen de la mostra a analitzar. Per a les cerques es van definir els següents paràmetres: tripsina com a enzim de digestió, fins a 2 talls omesos per la tripsina, 1,5 Da de tolerància màxima de massa per als ions precursors, 0,6 Da de tolerància màxima de massa per als ions fragment, com a modificació estàtica es va establir la carbamidometilació de cisteïna (+57 Da), com a modificació dinàmica l'oxidació de metionina (+16 Da).

3.9 GENERACIÓ DEL PATRÓ D'ISOFORMES DE L'LPL

Per tal de poder determinar el pI de cada isoforma de l'LPL i, també, quantificar la seva quantitat relativa, era necessari establir una metodologia de treball. Amb aquesta metodologia, ideada pel nostre grup [181], es podia generar un patró de les isoformes de pI de l'LPL de cada mostra estudiada (entenenent patró com a nombre, pI i quantitat relativa de cada isoforma). A més, la generació d'aquests patrons permetria comparar les diferents isoformes entre mostres diferents.

Per determinar el **pI** es va mantenir sempre el control de la localització d'un extrem de la tira IPG, concretament, l'extrem àcid (pH 6). Durant l'SDS-PAGE, es va alinear l'extrem àcid de la tira IPG amb l'extrem del gel de poliacrilamida i durant la transferència, es va alinear el mateix extrem del gel amb la membrana de nitrocel·lulosa (veure Figura 19.).

Es va determinar el pI de cada isoforma, gràcies al gradient de pH immobilitzat i lineal de les tires, calculant la distància, en la imatge del film revelat, entre l'inici de la membrana de nitrocel·lulosa (pH 6) i el centre de cada taca o isoforma d'LPL (Δx) (veure Figura 19.). La fórmula utilitzada va ser la següent:

$$pI = (6 + (\Delta pH / \text{long} * \Delta x))$$

pI = punt isoelèctric de la isoforma

6 = pH inicial de la tira IPG

ΔpH = increment d'unitats del rang de pH de la tira IPG

long = longitud de la tira IPG en cm

Δx = distància entre el punt de pH 6 i el centre de la isoforma

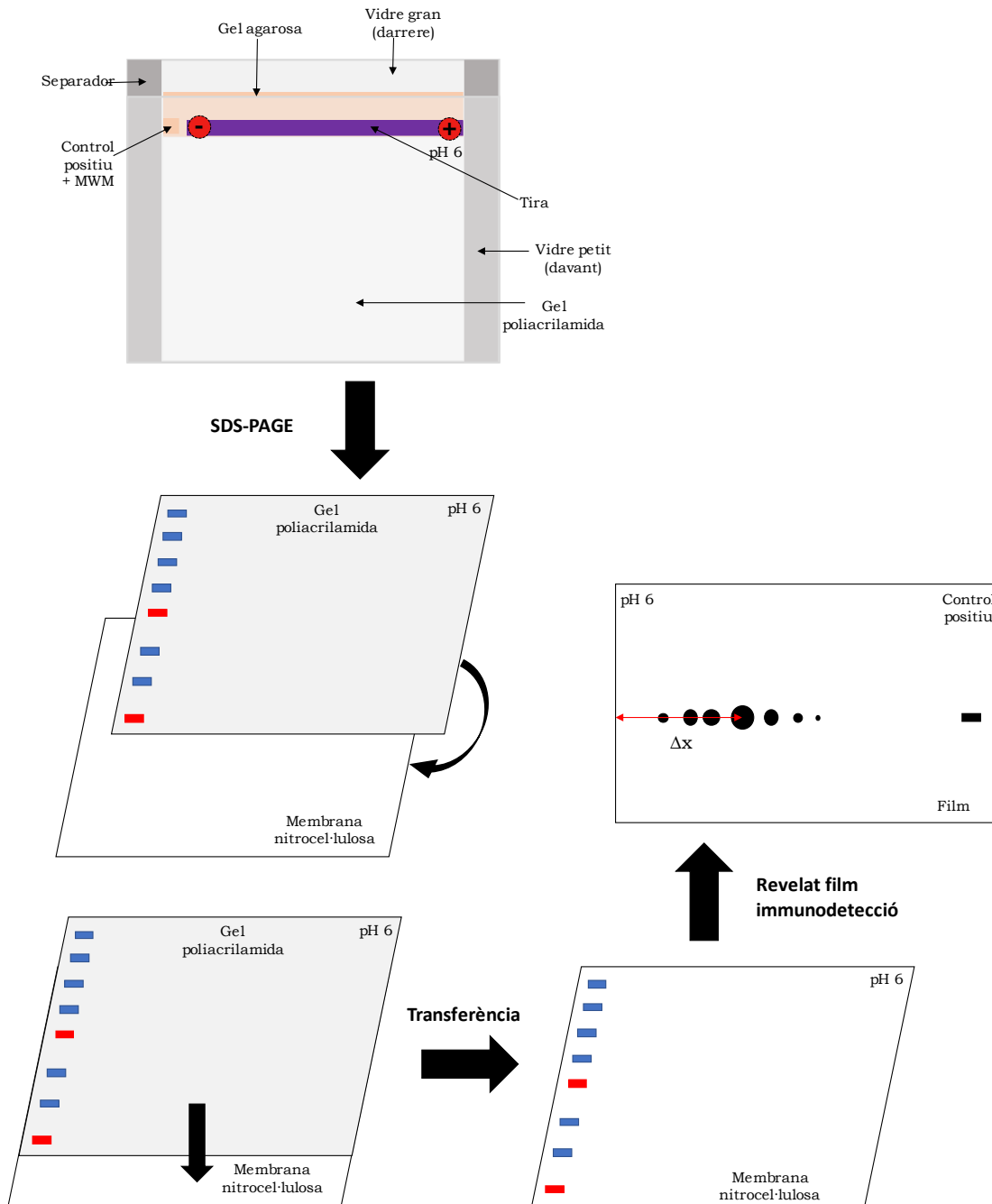


Figura 19. Metodologia de treball per mantenir la referència de pH en les 2DE-WB. Es mostra com el nostre punt de referència, l'extrem àcid de la tira IPG (pH 6), es troba sota control en l'SDS-PAGE (la segona dimensió després de l'IEF), la transferència de les proteïnes des del gel de poliacrilamida fins la membrana de nitrocel·lulosa i el revelat del film després de la immunodetecció en la membrana. Δx = distància entre el punt de pH 6 i el centre de la isoforma

Al realitzar IEF no era possible utilitzar una mostra control per tal de semiquantificar els resultats obtinguts a partir d'aquesta, com es faria en una SDS-PAGE. Aleshores, es va decidir que per quantificar la **quantitat relativa** de cada isoforma de pI de l'LPL es faria una estima, en percentatge, de la intensitat de cada taca respecte la intensitat de totes les taques del mateix film revelat (suma 100%). Aquesta estima es va fer per densitometria mitjançant el programa de tractament d'imatges Multigauge (Fujifilm) (veure Figura 20.).

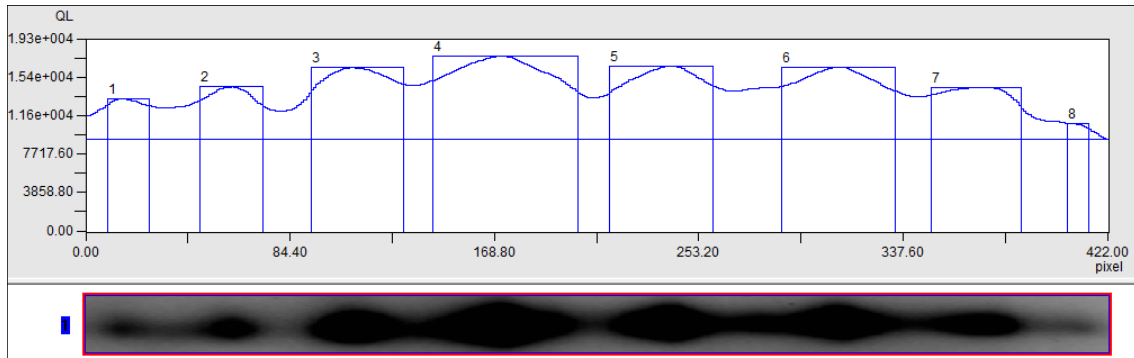


Figura 20. Quantificació de la quantitat relativa de cada isoforma. De cadascuna de les imatges obtingudes dels films revelats després del WB se'n va quantificar la quantitat relativa de cada isoforma mitjançant el programa Multigauge.

Es van fer diverses 2DE-WB de cada mostra i, de cada 2DE-WB, es van fer varies exposicions en el revelat dels films del WB. Finalment, amb la determinació del pI de cada isoforma i la quantificació de la seva quantitat relativa, es generava una imatge representativa d'aquella mostra. Amb aquesta imatge, doncs, es generava el **patró d'isoformes** de cada mostra. La Figura 21. mostra un exemple de patró d'isoformes de pI de l'LPL generat a partir de la determinació del pI i de la quantitat relativa de cada isoforma d'una mostra x.

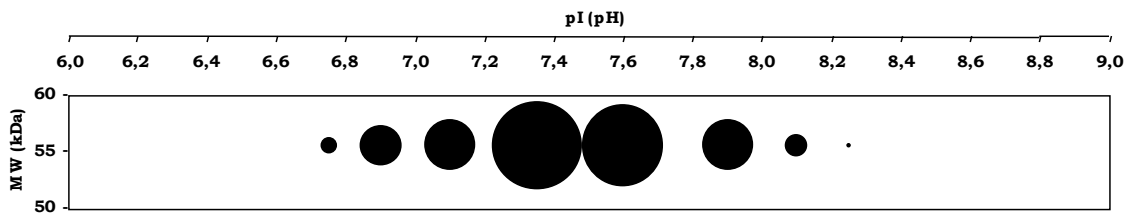


Figura 21. Exemple de patró d'isoformes de pI de l'LPL. Els patrons de distribució de les isoformes d'LPL generats en aquesta tesi han seguit la mateixa metodologia de treball aquí explicada.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 ELS HUMANS PRESENTEN ISOFORMES DE PUNT ISOELÈCTRIC DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA?

El nostre grup d'investigació, va descriure que l'LPL no es tracta d'una sola proteïna sinó que és un conjunt d'isoformes de diferent pI però mateix MW aparent [180]. Aquest descobriment es va fer en cors i PHP de rates. La tesi d'en Pere Carulla, va descriure l'existència d'isoformes de pI de l'LPL en altres teixits de rata (WAT, BAT i múscul) i en el WAT d'una altra espècie de mamífer, el macaco de Java [181].

Donada la importància de l'LPL en la fisiologia i en les patologies humanes, en aquesta tesi vàrem investigar la possible existència d'isoformes de pI de l'LPL en humans. Gran part de la informació actual disponible sobre la seqüència de l'LPL en humans deriva del gen de l'LPL o del seu transcrit. Els estudis en humans mitjançant l'anàlisi directa de la proteïna són molt escassos i es basen en LPL que prové de llet [212, 213]. Per aquest estudi exploratori en humans vàrem escollir com a font d'LPL el PHP per dos motius principals: (i) el PHP presenta tota l'LPL madura de l'organisme alliberada al torrent sanguini i (ii) era possible obtenir una gran quantitat de mostra d'una manera poc invasiva. Vàrem analitzar l'LPL en PHP de voluntaris homes sans. Degut a la complexitat de la composició proteica del plasma [214], vàrem combinar estratègies de semipurificació basades en afinitat, 2DE i MS per avaluar la presència d'isoformes de pI d'LPL en humans.

Aquests resultats han estat publicats a la revista *Biochemical and Biophysical Research Communications* (BBRC) [202] (veure article a l'apèndix).

4.1.1 Objectius

Amb l'estudi de l'LPL en PHP humà preteníem:

- Conèixer si l'espècie humana presenta també isoformes de pI de l'LPL, com l'espècie murina.
- En cas afirmatiu, realitzar una comparativa entre els diferents individus estudiats.
- En cas de similitud entre individus, establir el patró d'isoformes de pI de l'LPL en el PHP humà.

4.1.2 Plasma post-heparínic d'humans

Tal i com hem comentat a l'apartat 3.2.1, els quatre voluntaris van restar en dejuni 10 hores abans de la recollida de mostres. Se'ls va extreure sang pre-heparínica i, immediatament després se'ls va injectar, per via endovenosa, 60 UI d'heparina sòdica 5% per Kg de pes corporal. Passats 15 minuts de l'administració es va extreure la sang post-heparínica. D'ambdues mostres es va obtenir el plasma mitjançant centrifugació i es va congelar a -80°C fins la seva anàlisi.

Vam mesurar l'activitat LPL del plasma de cada tub de sang extret de cada voluntari. Com s'observa a la Figura 22., l'activitat LPL es manté estable i elevada durant tota l'extracció en tots els individus estudiats. Abans de la injecció d'heparina, l'activitat LPL és molt baixa, pràcticament indetectable ($0,7 \pm 0,5$ mU/mL) (veure Figura 23.). Després de l'administració d'heparina, però, l'activitat LPL augmenta extraordinàriament (unes 160 vegades), arribant a uns valors de $111 \pm 11,2$ mU/mL (veure Figura 23.).

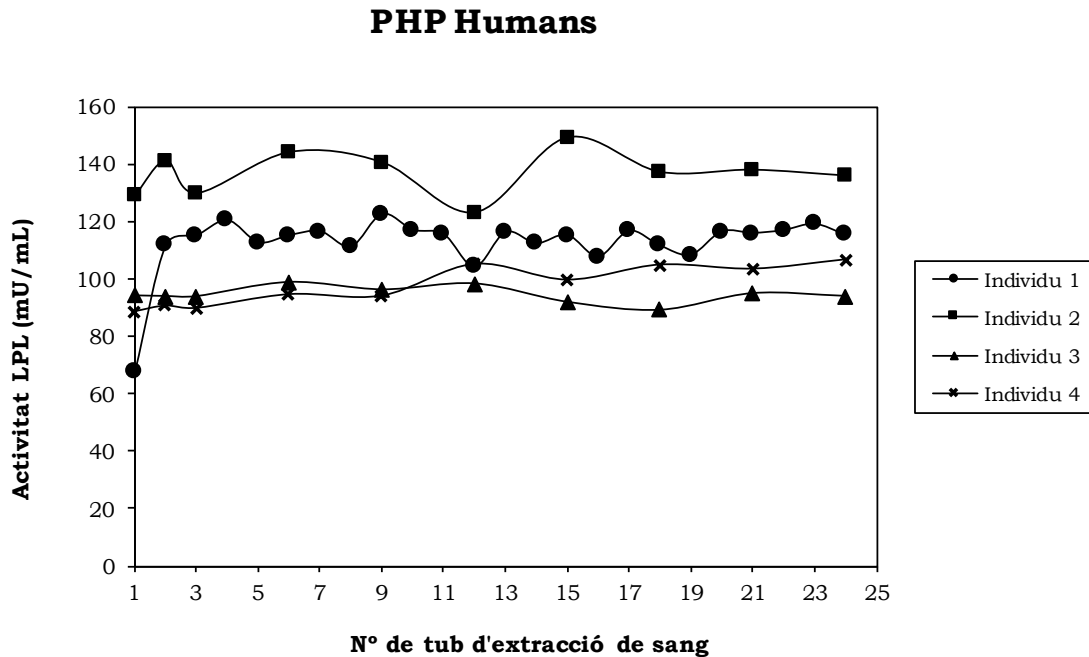


Figura 22. Activitat LPL als plasmes post-heparínics humans. Es presenta l'activitat LPL mesurada en plasma de 4 individus després de l'administració de 60 UI d'heparina/kg de pes corporal. Després de la injecció d'heparina s'esperà un temps de 15 minuts per començar l'extracció de 240 mL de sang (24 tubs de 10 mL amb l'anticoagulant EDTA) que durà entre 5 i 10 minuts. Tot seguit s'obtingué el plasma per centrifugació a 800 g durant 10 minuts i a 4°C .

Plasmes humans

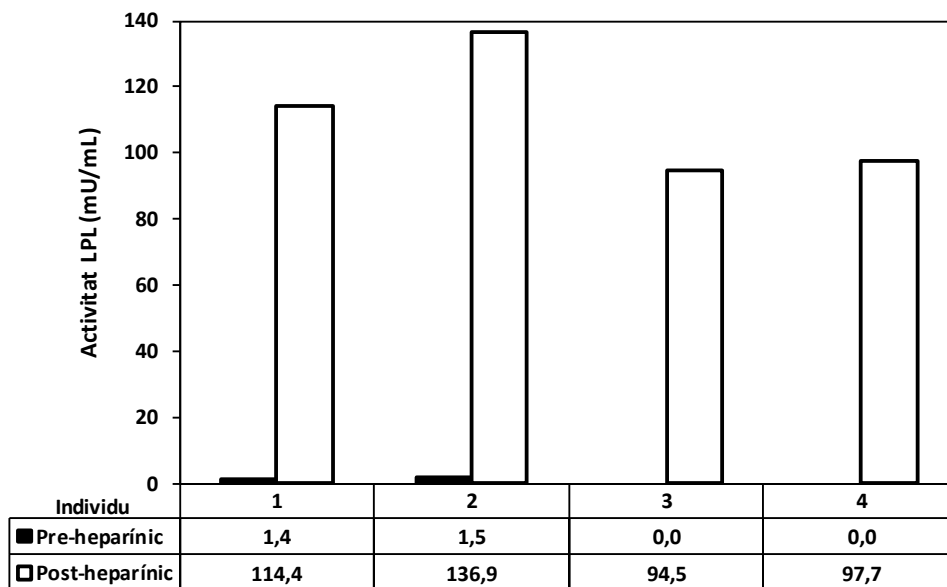


Figura 23. Activitat LPL als plasmes pre- i post-heparínics humans. A cada individu (1-4), se li extragué 10 mL de sang (pre-heparínica). Després se'ls injectà heparina (60 UI d'heparina sòdica 5% per kg de pes corporal) i s'esperà un temps de 15 minuts per començar l'extracció de 240 mL de sang post-heparínica (24 tubs de 10 mL amb l'anticoagulant EDTA) que durà entre 5 i 10 minuts. Tot seguit s'obtingué, per centrifugació a 4°C, les mostres de plasma (pre i post-heparínic). El valor de l'activitat LPL de les mostres post-heparíniques s'obté de la mitjana dels 24 tubs extrets. Barres negres mostres pre-heparíniques i barres blanques mostres post-heparíniques.

Encara que els nivells d'activitat LPL són molt alts en PHP, l'enzim no es detecta per WB en l'homogenat del plasma com es veu a la Figura 24. (C). Per això, vàrem purificar parcialment l'LPL del plasma mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. En la Figura 24. (A) es mostra una representació d'aquesta purificació parcial de l'LPL d'un dels individus. Observem que en el pas de la mostra, amb 0,15 M de NaCl, es recullen la major part de les proteïnes presents al PHP, són les proteïnes que no han quedat retengudes a la columna d'HS. Els nivells d'activitat lipasa d'aquestes proteïnes són indetectables. Al principi de l'elució amb 0,75 M de NaCl s'elueix una quantitat important de proteïnes, les que tenen una afinitat menor a l'HS. En aquest cas, veiem un pic molt elevat d'activitat lipasa però no es tracta d'LPL, sinó que correspon a l'activitat de l'HL, la qual també és alliberada a la sang per l'heparina. L'HL, però, té una afinitat per l'heparina inferior a la de l'LPL [178, 215]. Finalment, augmentant la força iònica fins a 1,50 M, veiem un pic d'activitat lipasa que correspon a l'LPL. Les fraccions que es recullen en aquest punt de la cromatografia contenen una quantitat molt baixa de proteïna total. Aquesta purificació parcial ens permet detectar l'LPL mitjançant WB tal i com s'observa en el carril de l'eluït de la Figura 24. (C). Vàrem fer un *pool* amb les fraccions recollides d'aquest pic d'activitat LPL i el vam utilitzar

com a font d'LPL per analitzar la possible presència d'isoformes de pI de l'LPL en PHP humà.

PHP Humà

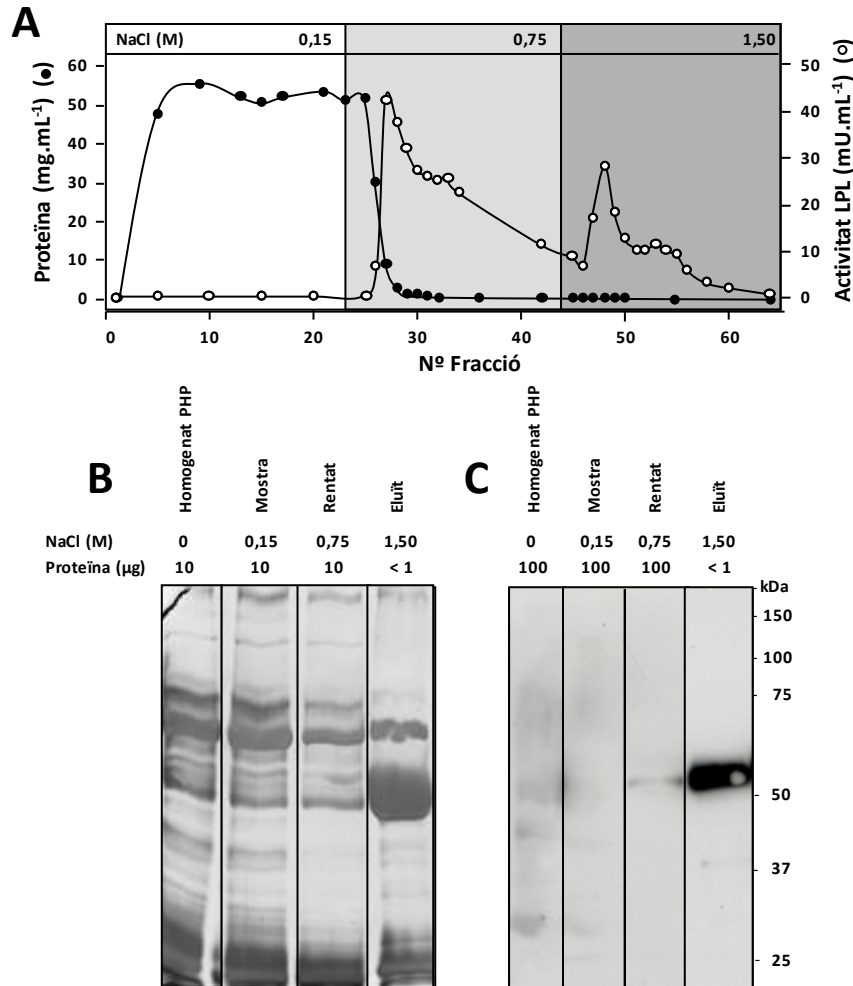


Figura 24. Purificació parcial de l'LPL de plasma post-heparínic humà mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharese. (A) Les fraccions van ser recollides després d'un increment esglaonat de la concentració de NaCl, com s'indica a la part superior. Es representa la proteïna total (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) de les fraccions. (B) SDS-PAGE i tinció amb plata i (C) SDS-PAGE i WB contra LPL (anticòs 5D2), de les fraccions en els diferents passos del procés de purificació. 40 mL de PHP procedent de l'individu 2. La quantitat total de proteïna carregada s'indica sobre cada carril. Imatge adaptada de Badiá-Villanueva *et al.* [202].

L'anàlisi, mitjançant 2DE-WB, de l'LPL parcialment purificada procedent de PHP humà (veure Figura 25.) revela l'existència de nou isoformes amb un pI d'entre 6,8 i 8,6. El patró de les isoformes de pI de l'LPL dels quatre individus estudiats és molt similar. Creiem que la taca que s'observa a l'esquerra de la Figura 25. (individu 1) podria ser proteïna LPL no enfocada degut a un excés de mostra (carregada per facilitar la detecció de les

taques minoritàries). Per tant, no la comptabilitzem com a isoforma de pI sinó com a artefacte de la tècnica.

PHP Humans

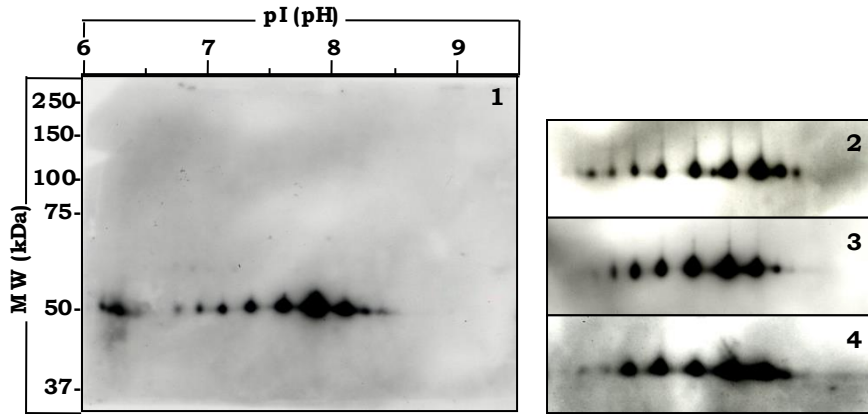


Figura 25. Isoformes de pI de l'LPL de plasma post-heparínic humà. 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2) de l'LPL purificada parcialment de PHP humà. Per a la primera dimensió es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. Cadascuna de les imatges (1-4) correspon a una 2DE-WB d'un dels quatre individus estudiats. La quantitat d'activitat LPL carregada a cada 2DE-WB és 23 mU (individu 1), 16 mU (individu 2), 32 mU (individu 3) i 35 mU (individu 4). MW = Pes molecular aparent. Imatge adaptada de Badia-Villanueva *et al.* [202].

Tot i l'especificitat descrita per l'anticòs anti-LPL utilitzat en el WB (5D2) [216], la inespecificitat d'altres anticòssos contra l'LPL detectada en estudis previs [217] ens portà a identificar, mitjançant MS, les taques detectades en el WB com a LPL (veure apartat 3.8). Les isoformes de pI de l'LPL es van separar per 2DE-tinció amb plata i les taques d'interès es van retallar per analitzar i identificar les proteïnes mitjançant PMF (veure Figura 26. (A)). A totes les taques retallades es va identificar IgG, com es pot veure a la Taula 6.. Hem de remarcar que la IgG és una de les proteïnes més abundants en el plasma humà [218] i, com observem en els nostres resultats, malgrat la purificació parcial de l'LPL mitjançant la cromatografia d'afinitat a HS, segueix present en les fraccions eluïdes amb 1,50 M de NaCl. Aquest fet es deu possiblement a que la IgG també té una elevada afinitat per heparina i, per tant, co-elueix amb l'LPL.

PHP Humà

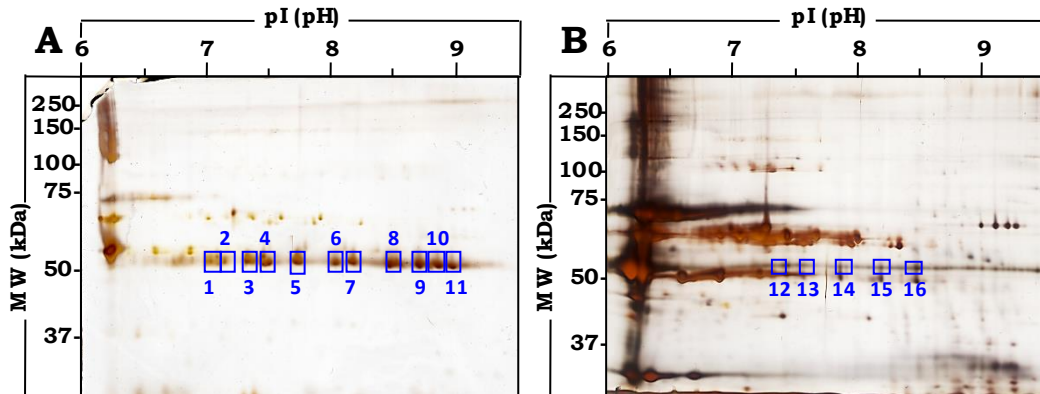


Figura 26. Identificació d'isoformes de pI de l'LPL de plasma post-heparínic humà deplecionat d'IgG. 2DE i tinció amb plata de l'LPL purificada parcialment de PHP humà (individu 1) abans (A) i després (B) de la depleció d'IgG. Per a la primera dimensió, es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. Les taques retallades i identificades com a IgG per PMF són les numerades en el gel (A) (taques **1-11**) (veure Taula 5.). Les taques retallades i identificades com a LPL per PMF (taca **16**) o LC-MS/MS (taques **12-15**) són les numerades en el gel (B) (veure Taula 7.). MW = Pes molecular aparent. Imatge adaptada de Badia-Villanueva *et al.* [202].

Nº de taca	Proteïna identificada	Descripció de la proteïna	MOWSE Protein Score	Massa Proteïna (Da)
11	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens	179	66170
	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	88	36505
10	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens	90	66170
	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	58	36505
9	HV305_HUMAN	Ig heavy chain V-III region BRO OS=Homo sapiens	103	13332
	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	93	36505
8	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	113	36505
	HV302_HUMAN	Ig heavy chain V-III region WEA OS=Homo sapiens	66	12363
	HV310_HUMAN	Ig heavy chain V-III region HIL OS=Homo sapiens	61	13671
7	HV305_HUMAN	Ig heavy chain V-III region BRO OS=Homo sapiens	109	13332
	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	89	36505
6	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	81	36505
5	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	61	36505
4	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	79	36505
	HV320_HUMAN	Ig heavy chain V-III region GAL OS=Homo sapiens	46	12836
	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens	35	36596
3	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens	251	66170
	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens	49	36596
2	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens	131	36596
	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens	47	36505
1	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens	112	36596

Taula 6. Proteïnes identificades per PMF com a IgG en plasma post-heparínic humà, a taques del gel A de la Figura 26. Imatge adaptada de Badia-Villanueva *et al.* [202].

L'IgG és una glicoproteïna de 148 kDa formada per dues cadenes lleugeres i dues cadenes pesants. Cada cadena pesant d'aquesta immunoglobulina té un MW i un pI similars als de l'LPL [218, 219]. Per aquesta raó, les dues proteïnes es solapen en el gel (veure Figura 26. (A)). Tenint en compte l'elevada abundància de la IgG en plasma i la seva co-elució amb l'LPL, vàrem tenir dificultats per identificar l'LPL. Per minimitzar aquesta interferència, abans de l'anàlisi mitjançant 2DE, vam deplecionar les IgG de les mostres utilitzant una columna *HiTrap Protein G HP*. La Figura 26. (B) mostra el gel de l'LPL del PHP humà purificada parcialment i deplecionada d'IgG. A la Figura 26. es presenta l'efecte de la depleció d'IgG de la mostra sobre la identificació de les isoformes de pI de l'LPL. Aquesta acció ens va permetre identificar per PMF i LC-MS/MS les isoformes de pI de l'LPL com es mostra a la Taula 7.

Nº de taca	Proteïna identificada	Descripció de la proteïna	MOWSE Protein Score	Massa Proteïna (Da)							
16	LIPL_HUMAN	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens	43	53699							
LC-MS/MS (Taca 12)											
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de proteïnes	Nº de pèptids únics	Nº de pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
P06858	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_HUMAN]	51,13	29,47	1	10	10	14	475	53,1	8,15	
LC-MS/MS (Taca 13)											
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de proteïnes	Nº de pèptids únics	Nº de pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
P06858	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_HUMAN]	53,54	30,95	1	11	11	16	475	53,1	8,15	
LC-MS/MS (Taca 14)											
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de proteïnes	Nº de pèptids únics	Nº de pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
P06858	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_HUMAN]	36,31	26,11	1	9	9	11	475	53,1	8,15	
LC-MS/MS (Taca 15)											
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de proteïnes	Nº de pèptids únics	Nº de pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
P06858	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_HUMAN]	55,76	23,79	1	9	9	19	475	53,1	8,15	

^a Nº d'accés a UniProtKB/Swiss-Prot.

^b El percentatge de cobertura està calculat considerant la proteïna madura.

Taula 7. Proteïnes identificades per PMF o LC-MS/MS com a LPL en plasma post-heparínic humà, a taques del gel B de la Figura 26. Els espectres del MALDI-TOF van ser buscats contra la base de dades Uniprot. Tots els espectres del MALDI-TOF mostren senyals que es corresponen amb les masses dels principals pèptids derivats de l'LPL. Per a una identificació no ambigua, les taques 12 a 15 van ser analitzades per LC-MS/MS en un espectròmetre de masses d'alta resolució. Imatge adaptada de Badia-Villanueva *et al.* [202].

Finalment, per generar el patró d'isoformes de pI de l'LPL (veure 3.9) del PHP dels quatre individus estudiats, vàrem quantificar la densitat de cada taca en totes les 2DE-WB realitzades per a cada individu (veure Figura 27.). Es van fer tres 2DE-WB de cada individu i, de cada 2DE-WB, es van fer vàries exposicions en el revelat del WB. La variabilitat trobada entre individus (SEM a la Figura 27.) és del mateix ordre de magnitud que la trobada en els replicats de la 2DE-WB de cada individu estudiat (dades no mostrades), de manera que la variabilitat observada entre individus pot ser atribuïda principalment a la metodologia emprada. A més, el patró de les isoformes de pI de l'LPL observat en els quatre individus estudiats és molt similar. La isoforma de pI més abundant (un 33% de la quantitat total d'LPL) té un pI alcalí (8,01) i les dues isoformes següents més abundants tenen un pI proper al de la isoforma majoritària (7,71 i 8,31, respectivament). El pI teòric calculat per l'LPL humana madura, basat en la seva seqüència d'aminoàcids, es troba dins d'aquest rang i és 8,23 (http://web.expasy.org/compute_pi/).

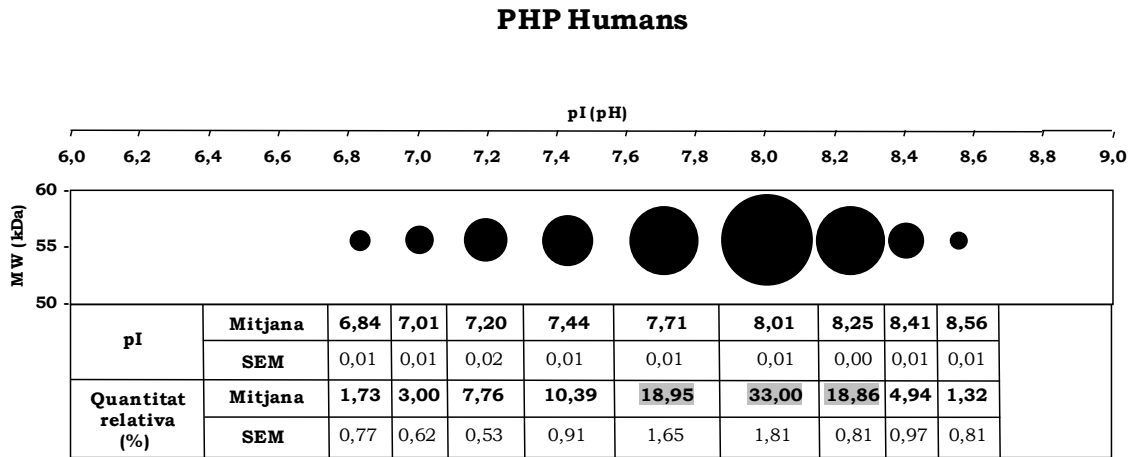


Figura 27. pI i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el plasma post-heparínic humà. La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (total 9 isoformes). A la taula s'indica aquesta quantitat respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització dels cercles es correspon amb el seu pI. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 4 rèpliques biològiques (n=4). MW = Pes molecular aparent. Imatge adaptada de Badia-Villanueva *et al.* [202].

4.1.3 Discussió

En aquest estudi hem descrit per primera vegada l'existència de, com a mínim, 9 isoformes de pI de l'LPL en PHP humà. Aquestes isoformes tenen un pI d'entre 6,8 i 8,6. El patró de les isoformes d'LPL és pràcticament igual entre els individus estudiats i similar a l'observat en altres mamífers com la rata, encara que el nombre d'isoformes en PHP d'humans és més elevat que el que trobem en PHP de rata [180]. Aquest fet suggereix que podria haver característiques conservades en l'origen molecular d'aquesta heterogeneïtat probablement relacionades amb una funció i/o regulació específica de les isoformes de manera individual.

Es desconeix l'origen de les isoformes de pI de l'LPL en humans i en altres mamífers. L'LPL humana està codificada per un únic gen [17]. En termes generals, la diversitat proteica que deriva d'un únic gen pot ser originada a nivell: i) del DNA, ii) de l'RNA o iii) proteic, degut a: i) variacions al·lèliques, ii) maduració alternativa d'mRNA o iii) diferents modificacions post-traduccionals (PTM) [170]. En el nostre grup, hem demostrat la presència d'isoformes de pI de l'LPL en el cor d'una sola rata [181], aquest fet demostra que, en rata, les isoformes no es deuen a variacions al·lèliques, ja que com a màxim cada individu podria presentar dues isoformes, una per cada al·lel. En el PHP d'humans no podem descartar del tot la possibilitat que l'origen de les isoformes sigui degut a variacions al·lèliques, no obstant, la presència de més de dues isoformes de l'LPL en un únic individu suggereix un origen alternatiu. A més, el fet que el patró de les isoformes de pI de l'LPL en PHP estigui conservat entre tots els individus estudiats, apunta també cap a un origen alternatiu d'aquestes diferències. S'han descrit en humans dos mRNA d'LPL de mida diferent deguts a l'ús alternatiu de dos possibles llocs de poliadenilació [17]. Aquests dos trànscrips difereixen en la seva eficiència traduccional però no en la seqüència proteica codificada final [18]. Tot això, suggereix que les PTM són l'origen més probable de les isoformes de pI de l'LPL.

La presència de totes les isoformes de pI de l'LPL en un únic teixit d'una sola rata [180], suggereix que l'origen multi-orgànic de les isoformes de l'LPL en el PHP humà no és la font de l'heterogeneïtat de pI observada.

Actualment, les possibles diferències en la funció i/o regulació entre les isoformes de pI de l'LPL és desconeguda. De totes maneres, com l'LPL del PHP deriva del seu alliberament massiu al torrent sanguini (LPL madura ancorada a l'endoteli del lumen [64, 190]), la presència d'isoformes de pI de l'LPL en el PHP indica que *in vivo* coexisteix una població de molècules d'LPL madura amb diferent càrrega neta. Es creu que l'alliberament de l'LPL des de l'endoteli és un mecanisme fisiològic de regulació específica de teixit [84, 85], la qual cosa ens assenyala la necessitat de seguir avançant en la comprensió d'aquest procés.

4.1.4 Conclusions

- ✓ Hem descrit l'existència de, com a mínim, 9 isoformes de pI en el PHP humà. Aquestes isoformes tenen un pI d'entre 6,8 i 8,6.
- ✓ Tots els individus estudiats tenen un patró (nombre, pI, MW aparent i abundància relativa de les isoformes) pràcticament igual i, a més, aquest patró és similar al de la rata. Per tant, deuen existir característiques conservades en l'origen molecular d'aquestes isoformes.
- ✓ La presència de més de dues isoformes en un sol individu descarta la possibilitat que l'heterogeneïtat observada en PHP d'humans sigui deguda només a variacions al·lèliques (en rata, ja s'havia descartat totalment aquesta possibilitat estudiant el cor d'un sol individu). Això, juntament amb un patró d'isoformes conservat entre els individus estudiats i havent descartat també que l'origen sigui degut a la maduració alternativa de l'mRNA, apunta a un origen molecular alternatiu de les isoformes. Per tant, tot sembla indicar que les modificacions post-traduccionals són l'origen més probable de les isoformes de pI de l'LPL.
- ✓ La presència d'isoformes de pI al PHP humà indica que *in vivo* coexisteix una població de molècules d'LPL madura amb diferent càrrega neta.

4.2 ESTUDI FISIOLÒGIC: ALLETAMENT I LIPOPROTEÏNA LIPASA

Havent observat que els humans presenten isoformes de pI de l'LPL en el PHP, vàrem continuar el nostre estudi explorant la possible presència d'isoformes en una altra mostra d'origen humà, la llet materna, ja que es coneix que l'LPL està present en activitats elevades en aquest fluid.

La llet humana ofereix a l'infant un aliment complet durant els primers mesos de vida i és la font òptima de lactis durant els primers dos anys essent complementada amb altres aliments. És un fluid que s'adapta als requeriments nutricionals i immunològics de l'infant a mesura que aquest creix i es desenvolupa. Conté enzims actius, hormones i nutrients essencials de manera proporcionada als infants [220]. Molts estudis han demostrat que l'alimentació amb llet materna s'associa amb una menor incidència d'obesitat, diabetis o malalties cardiovasculars al llarg de la vida adulta [221]. Es distingeixen 4 fases en l'alletament: la llet de preterme, el calostre (es produeix durant els primers 3 o 4 dies post-part), la llet de transició (es produeix entre el 4rt i el 15è dia post-part) i la llet madura. Durant l'alletament (fase de llet madura) una dona secreta uns 800 mL de llet per dia que conté un 4% de greixos (aproximadament 32 g), la majoria TAG [222], els quals són sintetitzats per la glàndula mamària alletant [223]. Segons la fase en la que ens trobem de l'alletament la concentració dels enzims a la llet humana varia significativament, en general la gran majoria dels enzims són presents en una major concentració en les primeres fases de l'alletament i després es veu disminuïda gradualment [220, 221].

L'LPL en la llet humana es troba en concentracions més elevades durant les fases primerenques d'alletament que no pas en les tardanes [221]. De fet, l'LPL s'ha trobat en el calostre (primeres 48 hores) humà [224]. Hernell i Olivecrona [90], van descriure dues lipases a la llet humana, una situada a la part grassa que van anomenar lipoproteïna lipasa estimulada per sèrum i l'altra, a la part descremada, que van anomenar lipasa estimulada per sals biliars (BSSL). La BSSL també es coneix com lipasa d'ester carboxílic [221]. La BSSL es sintetitza en el pàncrees i també en la glàndula mamària alletant en algunes espècies, incloent humans i ratolins, on és secretada a la llet [225]. Aquesta lipasa només és activa en presència de sals biliars, per la qual cosa s'activarà en la llet un cop arribi a l'intestí prim del lactant [226]. La lipoproteïna lipasa estimulada per sèrum és l'anàloga a la que participa en el metabolisme lipídic en diversos teixits de l'organisme, és a dir, l'LPL típica dels teixits. Segons els autors, aquest enzim sembla que no té cap funció fisiològica en la llet i probablement hi és present degut a filtracions en la glàndula mamària alletant, de forma que sembla ser un excedent procedent de la glàndula mamària alletant [90, 91]. L'activitat LPL a la llet podria indicar l'activitat a la glàndula mamària alletant de manera indirecta [92].

A més d'avaluar la possible existència d'isoformes d'LPL en la llet humana, vàrem plantejar-nos la necessitat d'estudiar les possibles implicacions funcionals d'aquestes isoformes. Concretament, vam avaluar possibles variacions del patró d'isoformes en l'alletament, una situació

fisiològica en la qual l'enzim té un paper central. D'aquesta manera, si la regulació fisiològica de l'enzim comporta canvis en el patró d'isoformes, tindriem una evidència indirecta de la diversitat funcional de les isoformes. Per a aquesta aproximació vàrem plantejar-nos comparar la distribució de les isoformes en fluids (llet, PHP) i en algun teixit implicat (com la glàndula mamària) de la mare alletant. Vam considerar aquests fluids i teixit perquè l'LPL té un rol important durant l'alletament redistribuint els TAG circulants cap a la glàndula mamària alletant per a la síntesi de llet [87]. Ara bé, donada la impossibilitat d'obtenir glàndula mamària alletant d'humanes vàrem traslladar el nostre estudi a un model animal com la rata, una espècie molt estudiada en l'entorn bioquímic del desenvolupament i l'alletament.

En rates, el període de deslletament comença sobre els 15-17 dies d'edat, moment en que les cries comencen a ingerir menjar sòlid i a beure aigua [227]. L'alletament, l'alimentació sòlida i la ingesta d'aigua coexisteixen sota condicions d'estabulació i fins aproximadament el primer mes d'edat de les cries. S'ha comprovat que les cries tenen preferència durant aquesta etapa per l'alletament possiblement degut al seu valor nutricional, afectiu o emocional [227]. L'alletament, en les mares, dona lloc a una sèrie de canvis fisiològics com per exemple els increments de: pes corporal, ingesta de menjar, batec cardíac, pes i flux sanguini en les glàndules mamàries alletants, fetge i intestí prim [87]. En rata, a diferència dels humans i ratolins, no es sintetitza en la glàndula mamària alletant la BSSL. Segons Li *et al.*, la BSSL s'expressa de manera constitutiva en el pàncrees de les rates des del naixement fins a l'edat adulta, en canvi, en ratolins va augmentant la seva síntesi en el pàncrees des del naixement (pic màxim entre el setè i el catorzè dia) fins al deslletament, moment en el qual es va reduint. Aquest fet podria indicar que als ratolins (i als humans entre d'altres espècies) els calgui suplementar la llet amb BSSL procedent de la glàndula mamària alletant per ajudar a les cries a digerir els greixos procedents de la llet [225].

Els dipòsits de greix al WAT de l'organisme de la mare gestant s'acumulen durant els primers estadis de la gestació i en els últims disminueixen [228]. En les últimes fases d'aquest període hi ha un augment d'activitat de la lipasa sensible a hormones (HSL) i una disminució d'activitat LPL en el teixit adipós [229, 230], aleshores hi ha un augment de lípids en el plasma matern [223]. De tots els lípids que es veuen augmentats les TRL (VLDL i QM) són les majoritàries tant en humans [231] com en rates [232]. La reducció de l'activitat LPL en el teixit adipós al final de la gestació, i també en el moment del part i mentre dura l'alletament, coincideix amb el seu augment en la glàndula mamària alletant [87]. La prolactina és una hormona sintetitzada a la glàndula pituïtària anterior i en altres òrgans i teixits de l'organisme. Va rebre aquest nom en la seva descoberta per la seva promoció de l'alletament però té d'altres funcions en l'organisme com per exemple la seva implicació en l'homeòstasi del sistema immunitari, del balanç osmòtic i de l'angiogènesi [233]. La prolactina manté el redireccionament dels TAG a través de l'increment o disminució de l'LPL en els dos teixits, WAT i glàndula mamària alletant, ja que una disminució de prolactina en el plasma

provoca de nou un increment d'activitat LPL en el WAT i una disminució en la glàndula mamària [234].

La glàndula mamària alletant és un dels òrgans del cos amb més contingut lipídic i un dels més actius metabòlicament durant l'embaràs i l'alletament [223]. En el teixit mamari, en època de no embaràs ni alletament, les cèl·lules predominants són els adipòcits amb estructures epitelials disperses entre ells [223]. Durant l'embaràs a les mames hi proliferen les estructures alveolars dins els adipòcits. A la vegada hi ha una diferenciació de les cèl·lules epitelials [235] les quals mostren gotes lipídiques citoplasmàtiques [236]. Durant la fase d'alletament les cèl·lules majoritàries són les epitelials i només es poden distingir uns petits canals d'adipòcits, plens o no de lípids [223]. La glàndula mamària alletant és considerada una glàndula exocrina. La secreció dels diferents components de la llet per les cèl·lules epitelials pot ésser mitjançant: (i) exocitosi de les proteïnes de la llet i la lactosa, (ii) transcitosi de les proteïnes del sèrum, (iii) transportadors de membrana per petites molècules, (iv) una via paracel·lular regulada i (v) una via de secreció apocrina pels lípids de la llet [237].

L'LPL és sintetitzada en els adipòcits i en les cèl·lules epitelials de la glàndula mamària alletant [45, 238]. L'enzim, en la glàndula mamària alletant, hidrolitza els TAG circulants provinents de les TRL i capta els NEFA en preparació per l'alletament [86, 239]. Durant l'alletament la glàndula mamària alletant sintetitza TAG, que seran incorporats a la llet, en les cèl·lules epitelials mamàries a partir de: (i) àcids grassos obtinguts de les TRL circulants per l'acció de l'LPL, (ii) síntesi *de novo* d'àcids grassos a partir de la glucosa, (iii) síntesi *de novo* d'àcids grassos mitjançant l'activitat d'enzims lipogènics i (iv) NEFA circulants, alliberats del WAT per l'acció de l'HSL i captats a través de transportadors d'àcids grassos [222, 239].

En resum, l'LPL és un enzim cabdal durant l'alletament ja que redistribueix els TAG circulants cap a la glàndula mamària alletant on seran utilitzats per a la síntesi de llet [87].

4.2.1 Objectius

Amb aquest treball preteníem explorar la possible presència d'isoformes d'LPL en una mostra procedent d'un únic teixit humà, ja que en l'estudi anterior no es podia descartar un origen multi-orgànic de les isoformes. La llet materna procedent de la glàndula mamària, era una mostra adequada per abordar aquesta qüestió. A més, aprofitant el rol de l'LPL en una situació fisiològica com és l'alletament, també preteníem avançar en la caracterització funcional de les isoformes de pI de l'LPL.

L'estudi d'aproximació per a la caracterització funcional no el vam poder dur a terme en l'espècie humana per la impossibilitat d'obtenir glàndula mamària alletant i el vam traslladar a l'espècie murina. En aquest model, vam comparar la distribució de les isoformes en els fluids i teixit implicats en l'alletament: la llet materna, el PHP de les mares alletants i la glàndula mamària alletant.

Aquests són els principals objectius que ens plantejàvem:

En humans

- Conèixer si la llet humana presenta isoformes de pI de l'LPL.
- En cas afirmatiu, preteníem estudiar el possible origen al·lèlic i/o multi-orgànic de les isoformes en humans analitzant cada mostra de llet humana per separat. Per tant, a diferència de l'estudi previ amb el PHP, totes les isoformes que es trobessin a la llet provindrien d'un únic teixit, la glàndula mamària alletant, i d'un sol individu.

En rata: Aproximació per la caracterització funcional (alletament)

- Conèixer si la llet, la glàndula mamària alletant i el PHP de rates alletants i de rates verges presenten isoformes de pI de l'LPL.
- En cas afirmatiu, preteníem avançar en l'estudi funcional indirecte de les isoformes en l'alletament comparant el patró (nombre, pI, MW aparent i quantitat relativa) d'isoformes de l'LPL de la llet amb el del teixit d'on provenen, la glàndula mamària alletant. També, preteníem avançar en aquest estudi comparant el patró obtingut del PHP de rates alletants amb el de la glàndula mamària dels mateixos animals.
- A més, en cas de confirmar-se els dos primers objectius, preteníem comparar els patrons d'isoformes de l'LPL d'un mateix tipus de mostra (el PHP) de les rates alletants i verges per avaluar les possibles diferències associades a la seva diferent condició fisiològica (alletant *vs.* no alletant).

Per tal de comparar fàcilment el pI de les isoformes de l'LPL entre diferents teixits (estudis de distribució d'isoformes) o bé, en el mateix teixit però diferents situacions fisiològiques o patològiques, vàrem abordar prèviament la posada al punt del mètode de l'isoelectroenfocament (IEF). Aquest mètode ens permetria una comparació directa del pI de les isoformes entre mostres diferents en un mateix gel.

4.2.2 Isoelectroenfocament

Fonament del mètode

Aquesta tècnica es basa en la separació de proteïnes pel seu pI. La tècnica es realitza en gels amb un gradient de pH, immobilitzat o no, que s'aconsegueix amb l'addició d'amfòlits en la polimerització del gel o bé, de manera posterior a la polimerització, amb un pre-enfocament del gel immediatament anterior a la càrrega de la mostra d'interès. Els gradients de pH creats són estables excepte a nivells de pH molt alcalins en els quals les molècules són molt difícils d'enfocar [240-244]. Durant l'IEF s'aplica un corrent elèctric continu a través del gel. Les molècules carregades negativament migren a través del gradient de pH cap a l'ànode (pol positiu) i, les carregades positivament migren cap al càtode (pol negatiu). Les molècules migren pel gel trobant zones de pH diferents, en aquesta migració les proteïnes van variant la seva càrrega fins que assoleixen el pH en el qual la seva càrrega neta és zero, aquest serà el seu pI [240].

Proves experimentals

Vàrem realitzar diversos intents de separació de les isoformes de pI de l'LPL mitjançant l'IEF però no ho vàrem aconseguir. És necessari un rang de pH alcalí perquè les isoformes de pI de l'LPL tenen un pI situat entre 6 i 9 [180]. Aquí, tenim un llistat d'algunes de les proves realitzades amb els diferents aparells emprats:

- IEF vertical amb l'aparell *Mini-Protean II Electrophoresis Cell* (Bio-Rad):
 - a temperatura ambient.
 - tampons d'electroforesi: hidròxid de sodi (càtode) i àcid fosfòric (ànode).
 - el gel de poliacrilamida no contenia amfòlits, només la mostra.
 - canvi de la temperatura a 4°C perquè el gel s'escalfava i el voltatge no pujava.
 - diferents proves de temps i voltatge acumulat durant l'enfocament.
- IEF horitzontal amb l'aparell *Mini-Sub Cell GT Cell* (Bio-Rad):
 - a 4°C.
 - tampons d'electroforesi: hidròxid de sodi (càtode) i àcid fosfòric (ànode).
 - incorporació d'amfòlits al gel de poliacrilamida en el moment de la polimerització i realització d'un pre-enfocament d'aquests amfòlits en el gel abans de carregar les mostres amb amfòlits i començar l'IEF.

- diferents proves de temps i voltatge acumulat durant el pre-enfocament i l'enfocament.
- canvis de proporcions dels components del gel de poliacrilamida, com per exemple disminució de la concentració final d'urea.
- IEF horitzontal amb l'aparell *Multiphor II Electrophoresis System* (GE Healthcare) (veure Figura 28.):
 - a 8°C.
 - tampons d'electroforesi: amfòlits (cànode) i àcid fosfòric (ànode).
 - el gel contenia els amfòlits i era pre-enfocat abans de l'aplicació de les mostres amb amfòlits.
 - canvis en les proporcions dels amfòlits i la seva concentració final en el gel de poliacrilamida.
 - canvis en el punt d'aplicació de la mostra (cànode, mig o ànode).
 - diferents proves de temps i voltatge acumulat durant l'enfocament.
 - polimerització del gel sense amfòlits, assecat, congelació i rehidratació amb els amfòlits.
 - utilització només d'amfòlits com a tampons d'electroforesi.
 - canvis en el rang del gradient de pH.
 - canvis en la mida del gel de poliacrilamida.

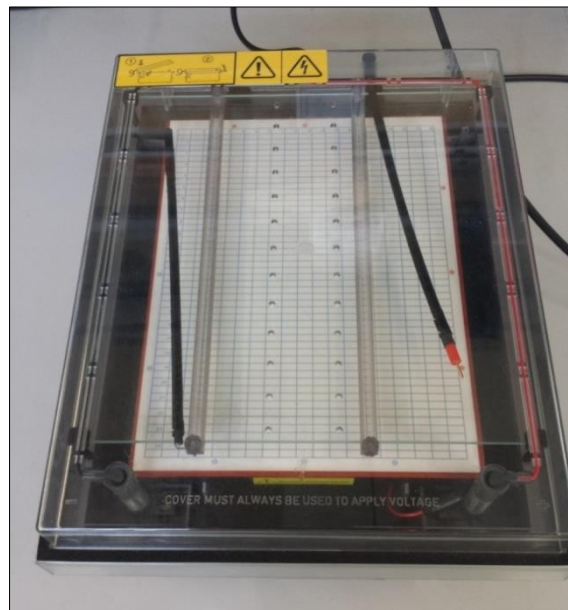


Figura 28. Aparell Multiphor II Electrophoresis System. Aparell per electroforesi horitzontal per a tècniques com l'IEF, SDS-PAGE, electroforesi nadiua, 2DE-PAGE i electroforesi de DNA.

Exemple d'assaig

A mode d'exemple s'explica un dels assajos que es van realitzar amb l'aparell *Multiphor II* (veure Figura 28.). Es va utilitzar, com a control de la tècnica, una altra proteïna cedida per la Dra. Esther Llop i el Dr. Ricardo Gutiérrez (IMIM, PRBB, Barcelona), l'eritropoetina (EPO). Les isoformes de pI de l'EPO es troben en un rang de pH situat entre 3 i 5 [245]. Vàrem polimeritzar dos gels de poliacrilamida (veure Figura 29.) amb gradients de pH diferents. En cada gel es van fer córrer les dues proteïnes i un marcador de pI (MpI) per veure com es comportaven en cadascun dels gradients de pH. En la Figura 29. (A), observem el gel que vam polimeritzar amb un rang de pH de 3 a 10, òptim per a enfocar l'LPL parcialment purificada de cor de rata mitjançant cromatografia d'afinitat a HS (veure apartat 3.5). En aquest gel, les isoformes no es van enfocar ni per l'LPL, ni per l'EPO ni tan sols pel MpI. En la Figura 29. (B), observem el gel que vam polimeritzar amb un rang de pH de 2 a 6, òptim per a enfocar l'EPO. En aquest gel de gradient de pH 2-6, les isoformes de l'EPO i del MpI es van enfocar. En canvi, les isoformes de pI de l'LPL no es van enfocar ja que es trobaven fora d'aquest rang de pH.

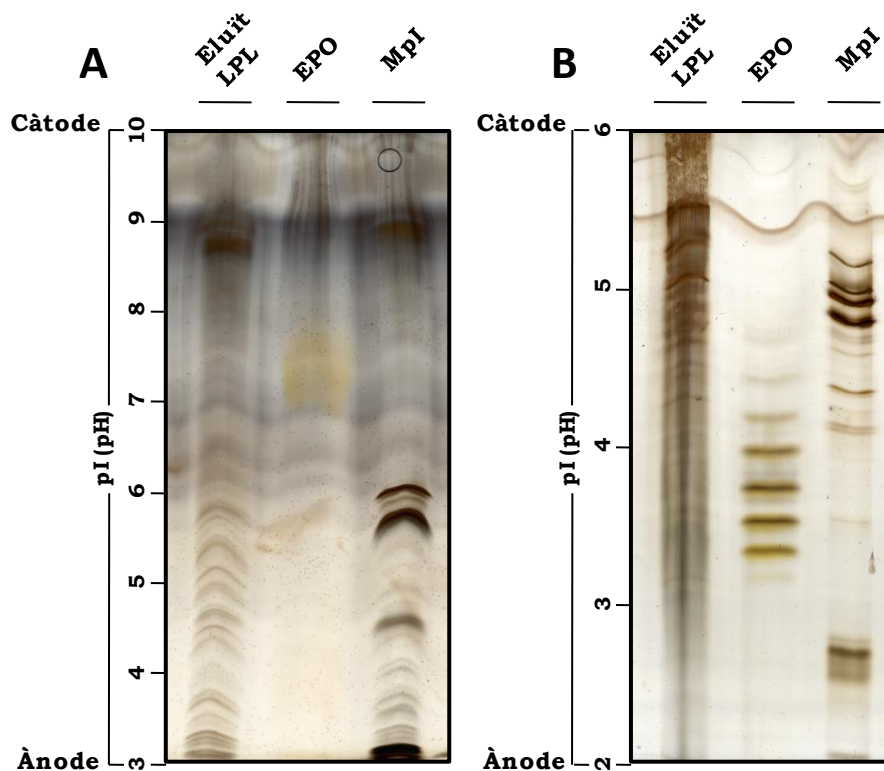


Figura 29. Isoelectroenfocament de les isoformes de pI de l'LPL i de l'EPO utilitzant dos gels de poliacrilamida amb gradients de pH diferents. IEF en gel de poliacrilamida de l'LPL i de l'EPO realitzat amb Multiphor II Electrophoresis System (GE Healthcare Life Sciences). (A) El gradient de pH del gel va de 3 a 10. (B) El gradient de pH del gel va de 2 a 6. Gels tenyits amb plata després de l'IEF. MpI (marcador de punt isoelectric de pH 3 a 10).

Dels diversos assajos realitzats (dades no mostrades) es podia concloure que l'IEF de l'LPL en gradients de pH alcalins (degut al rang de pH on es troben les seves isoformes de pI), en les condicions provades, no era factible (veure Figura 29. (A)).

Diversos autors han publicat alguns estudis que proposen algunes millores en l'IEF en aquests rangs de pH alcalins com per exemple utilitzar: l'addició continua de DTT en el càtode per compensar la seva pèrdua [246], un gradient no immobilitzat de pH en l'IEF (*non-IPG-IEF*) que millora la resolució en el rang alcalí del gradient [247] o noves tècniques basades en l'IEF com l'*OFFGEL electrophoresis* amb el qual es resolen força bé els pèptids o les proteïnes més bàsiques [248]. Aquest últim mètode es va intentar posar al punt al nostre laboratori com a part de la tesi de Pere Carulla [181], però també sense èxit. Caldrien més assajos per intentar una posada al punt d'aquest mètode per l'LPL tenint en compte les novetats metodològiques.

4.2.3 Llet humana

Com hem descrit en el punt 3.2.2 vàrem aconseguir 8 donants de llet materna. Les donants s'extreien la llet amb un tirallets, l'emmagatzemaven en bosses estèrils de plàstic i la congelaven a -20°C .

Vam mesurar l'activitat LPL de la llet de cada donant. Com s'observa a la Figura 30., l'activitat LPL és molt diferent depenent de cada donant.

Llets humanes

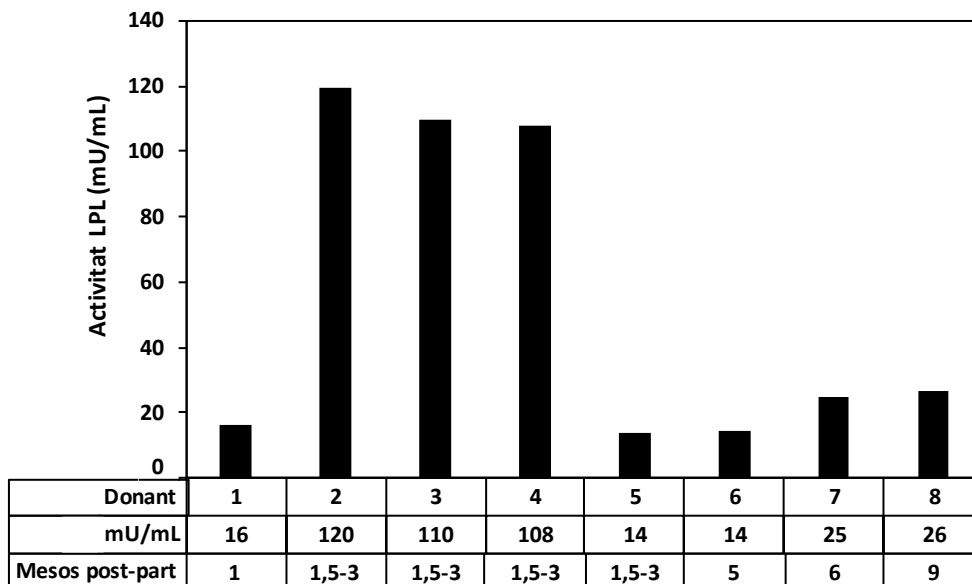


Figura 30. Activitat LPL de llet humana. Les mostres corresponen a diferents temps de maduració de la llet post-part de diferents donants.

Els diferents nivells d'activitat LPL podrien ser deguts a diversos factors: (i) el temps entre l'extracció de la llet i el seu emmagatzematge a 4°C , -20°C o -80°C (l'activitat LPL és molt termolàbil i a temperatura ambient disminueix molt ràpid i dràsticament [249]), (ii) el moment del dia

d'extracció de la llet (se sap que el cycle circadià afecta a l'activitat LPL [250]), (iii) si el nadó ha mamat instants previs a l'extracció de la llet la composició d'aquesta serà diferent [251] i, per tant, l'activitat LPL variarà, (iv) als diferents temps de maduració de la llet segons l'edat del nadó [221] i (v) variacions intrínseques de la llet de les donants. La mitjana de l'activitat LPL de la llet de les donants amb més activitat (donants 2, 3 i 4) és 113 mU/mL.

Vàrem purificar parcialment l'LPL de les llets de les donants 2, 3, 4 i 7 mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. La Figura 31. (A) mostra una d'aquestes purificacions parcials d'LPL a partir de la llet d'una de les donants (donant 4).

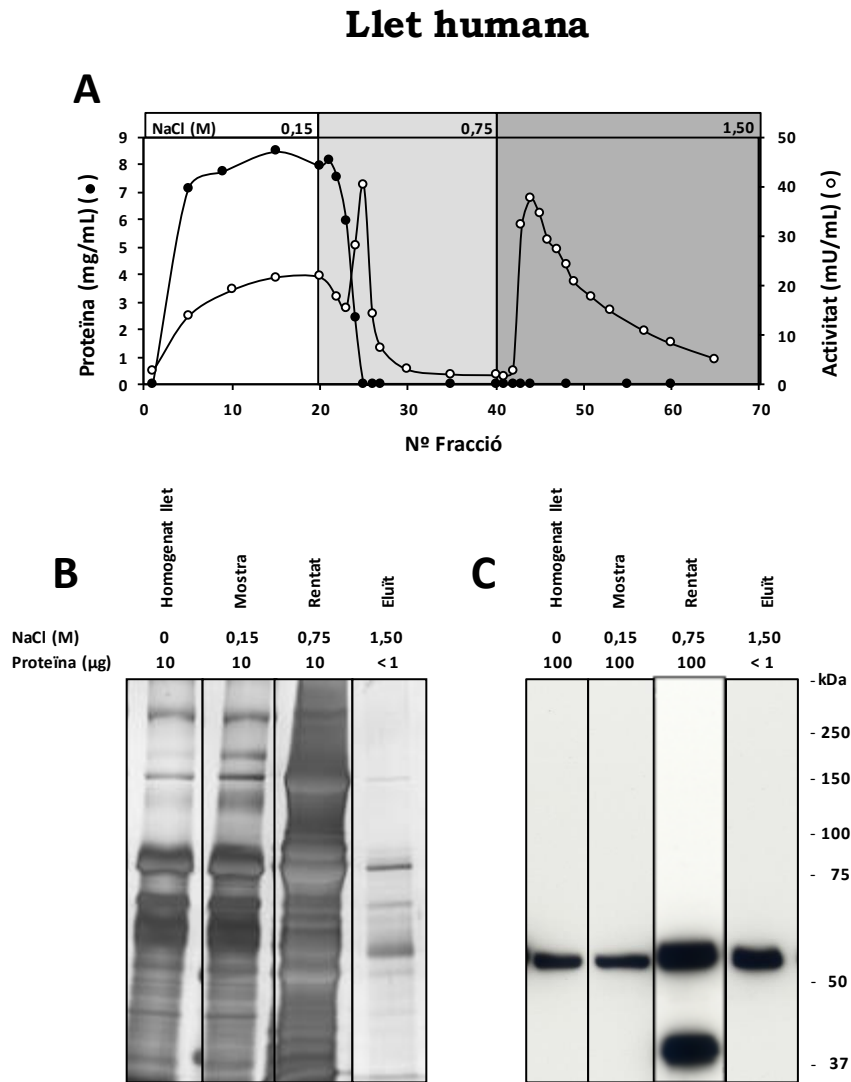


Figura 31. Purificació parcial de l'LPL de llet humana mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose*. (A) Les fraccions van ser recollides després d'un increment esglaonat de la concentració de NaCl, com s'indica a la part superior. Es representa la proteïna total (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) de les fraccions. (B) SDS-PAGE i tinció amb plata i (C) SDS-PAGE i WB contra LPL (anticòs 5D2), de les fraccions en els diferents passos del procés de purificació. 46 mL de llet procedent de la donant 4 (veure Figura 30.). La quantitat total de proteïna carregada s'indica sobre cada carril.

Els nivells d'activitat LPL són molt alts en la llet (mostra crua, veure apartat 3.5 (preparació de la mostra)) d'algunes donants (donants 2, 3 i 4, Figura 30.) i, és possible que aquest sigui un dels motius pels quals l'enzim es detecta per WB en l'homogenat del fluid i en els successius rentats amb NaCl com es veu a la Figura 31. (C). Per corroborar que la proteïna detectada en l'homogenat és LPL, vam fer un assaig d'activitat LPL incubant la mostra amb l'anticòs anti-LPL (veure Figura 32.). Els resultats van demostrar que la banda observada per WB al carril de l'homogenat de llet (veure Figura 31. (C)) correspon, efectivament, a la proteïna LPL ja que l'anticòs provoca una inhibició de l'activitat LPL d'un 96% en l'homogenat (veure Figura 32. (A)).

En general, a la Figura 31. (A) veiem una concentració de proteïna total baixa als diferents passos d'elució. A 0,15 M de NaCl, es recullen la major part de les proteïnes presents a l'homogenat de llet, són les proteïnes que no han quedat retengudes a la columna d'HS. En aquest cas, possiblement a causa de l'elevada activitat LPL en la llet (mostra crua) de la donant (veure Figura 30.), veiem uns nivells d'activitat lipasa sobre les 20 mU/mL. Podem confirmar que l'activitat lipasa que s'observa al no retingut (amb 0,15 M de NaCl) és LPL ja que com observem en la Figura 32. (B) l'activitat LPL és inhibida en un 97% per l'anticòs anti-LPL.

Al principi del rentat amb 0,75 M de NaCl s'elueix una quantitat important de proteïnes, les que tenen una afinitat menor per l'HS, i també observem un pic elevat d'activitat lipasa (veure Figura 31.(A)). Aquesta activitat lipasa podria tractar-se d'LPL no retinguda a aquesta concentració iònica o bé de BSSL, que com hem comentat en la introducció d'aquest bloc d'estudi, en humans es sintetitza també en la glàndula mamària alletant [225]. En el carril de rentat de la columna amb 0,75 M de NaCl del WB (veure Figura 31. (C)), veiem una banda de menys MW aparent que podria indicar alguna forma degradada de l'LPL.

Finalment, augmentant la força iònica fins a 1,50 M, veiem un pic molt elevat d'activitat lipasa que correspon a l'LPL alliberada o eluïda (veure Figura 31. (A)). Aquest últim resultat queda també confirmat amb la inhibició de l'activitat LPL, en un 91%, per l'anticòs anti-LPL en fraccions recollides de l'eluït (veure Figura 32. (B)). Les fraccions que es recullen en aquest punt de la cromatografia contenen una quantitat molt baixa de proteïna total com s'observa a la Figura 31. (B). Amb la purificació parcial vam disminuir la complexitat de la mostra per les posteriors anàlisis. Vam detectar l'LPL semipurificada mitjançant WB tal i com s'observa en el carril de l'eluït de la Figura 31. (C). Vàrem fer un *pool* amb les fraccions recollides d'aquest pic d'activitat LPL i el vam utilitzar com a font d'LPL per analitzar la possible presència d'isoformes de pI de l'LPL en llet humana.

Llet humana

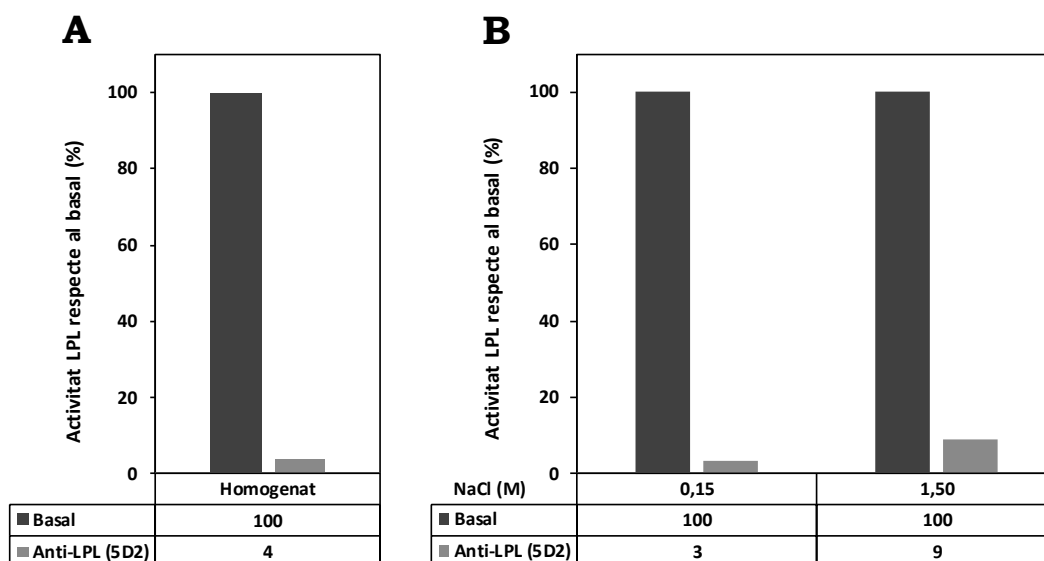


Figura 32. Efecte de la incubació amb anticòs anti-LPL sobre l'activitat lipasa en l'homogenat (A) i en fraccions recollides en el procés de purificació de l'LPL (B) de llet humana. Després de purificar parcialment l'LPL de la llet humana, vàrem determinar l'activitat LPL en l'homogenat i en algunes fraccions (mostra amb 0,15 M NaCl i eluït amb 1,50 M NaCl, indicat a la figura) en presència d'anticòs anti-LPL (5D2). L'activitat LPL es presenta respecte al valor basal, obtingut determinant l'activitat en les mateixes mostres però sense anticòs.

L'anàlisi de la purificació parcial de l'LPL procedent de llet humana mitjançant 2DE-WB (veure Figura 33.) ens mostra l'existència de vuit isoformes amb un pI d'entre 6,8 i 8,3. El patró de les isoformes de pI de l'LPL de les quatre donants estudiades és molt similar. La taca que s'observa a l'esquerra de la Figura 33. (donant 4) podria ser proteïna LPL no enfocada degut a un excés de mostra carregada per facilitar la detecció de les taques minoritàries. Per tant, no la comptabilitzem com a isoforma de pI sinó com a artefacte de la tècnica. En la 2DE-WB de la donant 7 s'observa una disminució de la intensitat de les isoformes de pI en comparació a les 2DE-WB de les altres donants. Aquest fet es deu, probablement, a la baixa activitat carregada (una mica més d'una tercera part) en comparació amb les altres 2DE-WB. Vàrem carregar menys activitat perquè, tal i com s'observa a la Figura 30., la donant 7 té una activitat LPL menor a les altres tres donants estudiades (donants 2, 3 i 4) i no disposàvem de més mostra per augmentar l'activitat a carregar i, així, igualar-la al nivell de les altres 2DE-WB.

Llet humana

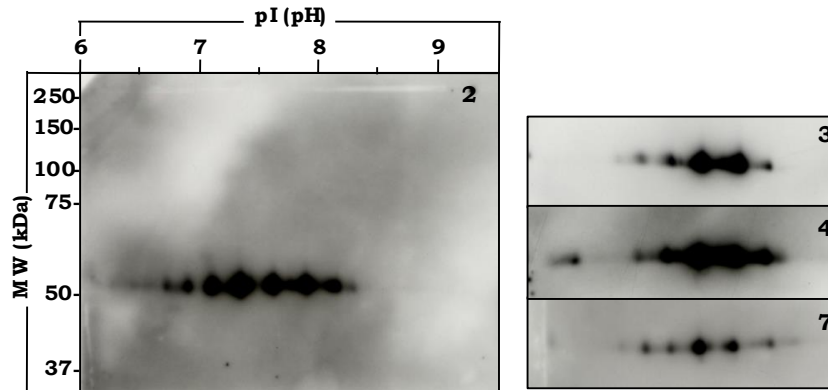
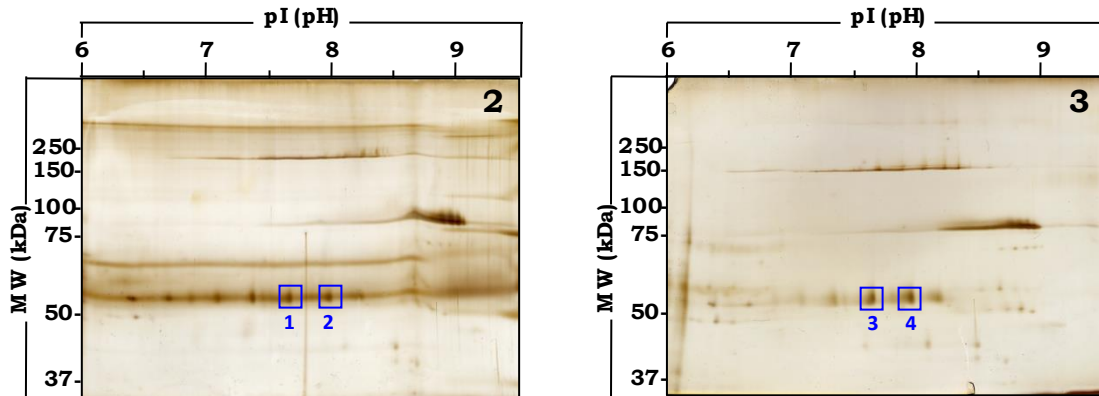


Figura 33. Isoformes de pI de l'LPL de llet humana. 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2) de l'LPL purificada parcialment de llet humana. Per a la primera dimensió, es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. Cada imatge correspon a una 2DE-WB d'una de les donants estudiades (donants 2, 3, 4 i 7 Figura 30.), com s'indica a la part superior dreta. Es van carregar 170 mU (2 i 3), 172 mU (4) i 64 mU (7) d'activitat LPL. MW = Pes molecular aparent.

Per corroborar la identificació de les proteïnes, les isoformes de pI de l'LPL de la llet humana es van separar per 2DE i es van tenyir amb plata. Aleshores, les taques d'interès es van retallar per analitzar i identificar mitjançant LC-MS/MS. Les quatre isoformes analitzades van ser identificades com a LPL (veure Figura 34.).

Per generar el patró d'isoformes de pI de l'LPL (veure 3.9) de la llet humana, vàrem quantificar la densitat de cada taca de diferents 2DE-WB de les quatre donants estudiades i, de cada 2DE-WB, vam realitzar varies exposicions en el revelat del WB (veure Figura 35.). El patró de les isoformes de pI de l'LPL observat en les quatre donants estudiades és molt similar. La isoforma de pI més abundant (un 35% de la quantitat total d'LPL) té un pI neutre (7,35) i la següent isoforma més abundant té un pI proper a la isoforma majoritària (7,60).

Llet humana



LC-MS/MS (Taca 1)								
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de pèptids	# PSM s	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P06858	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_HUMAN]	23,89	15,58	6,00	8,00	475	53,1	8,15
LC-MS/MS (Taca 2)								
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de pèptids	# PSM s	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P06858	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_HUMAN]	27,17	13,47	5,00	8,00	475	53,1	8,15
LC-MS/MS (Taca 3)								
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de pèptids	# PSM s	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P06858	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_HUMAN]	45,74	17,89	6,00	11,00	475	53,1	8,15
LC-MS/MS (Taca 4)								
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de pèptids	# PSM s	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P06858	Lipoprotein lipase OS=Homo sapiens GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_HUMAN]	33,59	17,47	6,00	9,00	475	53,1	8,15

^a Nº d'accés a UniProtKB/Swiss-Prot.

^b El percentatge de cobertura està calculat considerant la proteïna madura.

Figura 34. Identificació de les isoformes de pI de l'LPL de llet humana. 2DE i tinció amb plata (activitat carregada 189 mU (donant 2) i 33,6 mU (donant 3)) de l'LPL purificada parcialment de llet humana. Vam analitzar per LC-MS/MS quatre taques (1-4) (dues de cada gel). Per a la primera dimensió, vam utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. MW = Pes molecular aparent.

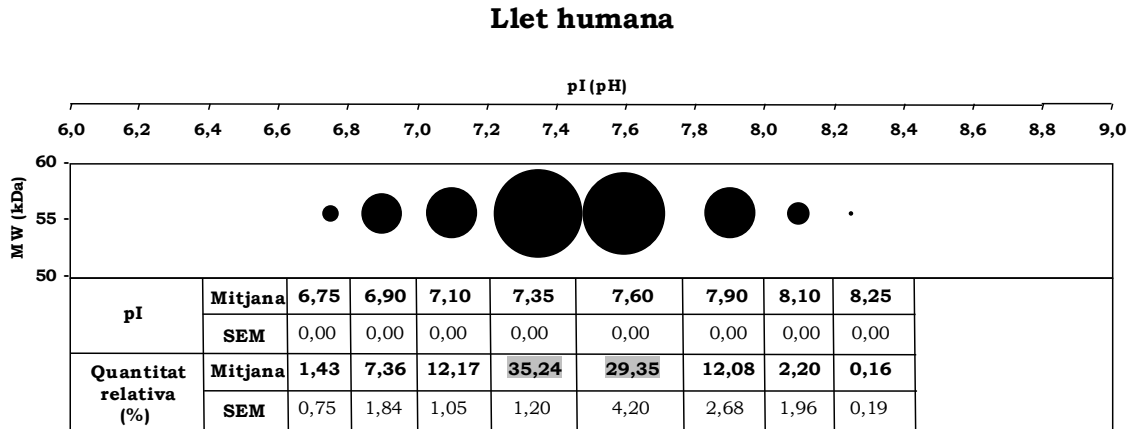


Figura 35. pI i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de llet humana. La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (total 8 isoformes). A la taula s'indica aquesta quantitat respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització dels cercles es correspon amb el seu pI. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 4 rèpliques biològiques (n=4). MW = Pes molecular aparent.

4.2.4 Aproximació per la caracterització funcional de les isoformes de l'LPL (alletament en rates)

Havent observat que la llet humana presenta isoformes de pI de l'LPL i que aquestes segueixen un patró característic, vam abordar l'objectiu d'avançar en la caracterització funcional de les isoformes. Com ja hem comentat abans, vam aprofitar una situació fisiològica en la qual l'LPL és clau, l'alletament, per a realitzar una aproximació per la caracterització funcional de les isoformes. Com també s'ha dit en l'apartat 4.2.1, vàrem haver de traslladar el nostre estudi a l'espècie murina per la impossibilitat d'obtenir glàndula mamària alletant humana. Així doncs, a continuació es descriu l'obtenció dels patrons d'isoformes de l'LPL dels fluids i teixit de rata implicats en l'alletament (llet, glàndula mamària alletant i PHP de rata alletant).

4.2.4.1 Llet de rata

Com hem comentat al apartat 3.1.4 les mares eren separades de les seves cries 4 hores abans de l'extracció de llet. Un cop adormides, i amb l'oxitocina administrada, es munyien les glàndules mamàries de les rates i la llet era recollida i mantinguda en gel fins al moment de la seva congelació a -80°C . S'obtenien posteriorment els diferents teixits, o bé, el PHP.

Vam mesurar l'activitat LPL de la llet de les 17 mares (veure apartat 3.4). Com s'observa a la Figura 36., tenen una activitat LPL elevada, de mitjana 104 mU/mL. L'activitat LPL és força similar en tots els animals excepte en 5 d'ells (1, 8, 11, 16 i 17). Aquests diferents nivells d'activitat LPL no poden ser deguts a: (i) diferents temps de congelació de la mostra ja que totes les mostres es van congelar en nitrogen líquid instants després de l'extracció de la llet, (ii) diferències de maduració de la llet (totes les cries tenen el mateix temps de maduració post-part), (iii) el moment del dia de l'extracció de la llet (totes les extraccions es van fer amb un marge de diferència de temps molt petit), (iv) diferències en el número de cries de cada mare ja que el número de cries es va estandarditzar a 10 per a totes i (v) que les cries haguessin mamat instants previs a la separació de les seves mares ja que totes van ser separades 4 h abans de l'extracció de llet. Per tant, és probable que aquestes diferències en l'activitat LPL siguin degudes a variacions intrínseques de la llet de les mares alletants.

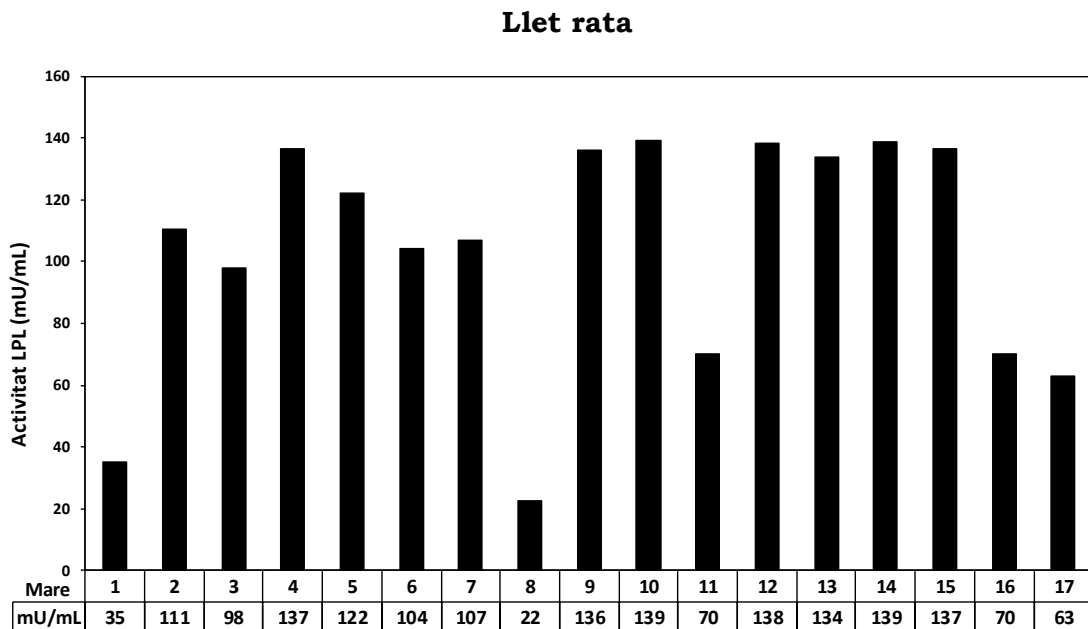


Figura 36. Activitat LPL de llet de rata. Les mostres tenen el mateix temps de maduració post-part, 15 dies.

Per tant, donada l'homogeneïtat de totes les mostres de llet, vàrem decidir combinar la llet de les 17 rates (26 mL en total) per obtenir un volum de mostra suficient per purificar parcialment la seva LPL mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. En la Figura 37. (A) es mostra una representació d'aquesta purificació parcial. Observem que en el pas de la mostra, amb 0,15 M de NaCl, es recullen la major part de les proteïnes presents a la llet de rata, són les proteïnes que no han quedat retengudes a la columna. En aquest cas, i degut a l'elevada activitat LPL en la llet (mostra crua) (104 mU/mL de mitjana entre les 17 mares, veure Figura 36.) i en l'homogenat de llet de tots els animals (125 mU/mL), veiem uns nivells d'activitat lipasa sobre les 20 mU/mL. Al principi del rentat amb 0,75 M de NaCl s'elueix una quantitat important de proteïnes, les que

tenen una afinitat menor a l'HS, i no veiem un pic d'activitat lipasa sinó una disminució de l'activitat a mesura que el rentat avança. El fet de no veure cap pic d'activitat lipasa en aquest punt de l'elució és coincident amb la bibliografia ja que, com hem comentat en la introducció de l'apartat 4.2, en les rates no es sintetitza BSSL en la glàndula mamària alletant [225].

Finalment, augmentant la força iònica fins a 1,50 M, veiem un pic d'activitat lipasa que correspon a l'LPL eluïda. Les fraccions que es recullen en aquest punt de la cromatografia contenen una quantitat molt baixa de proteïna total.

Llet rata

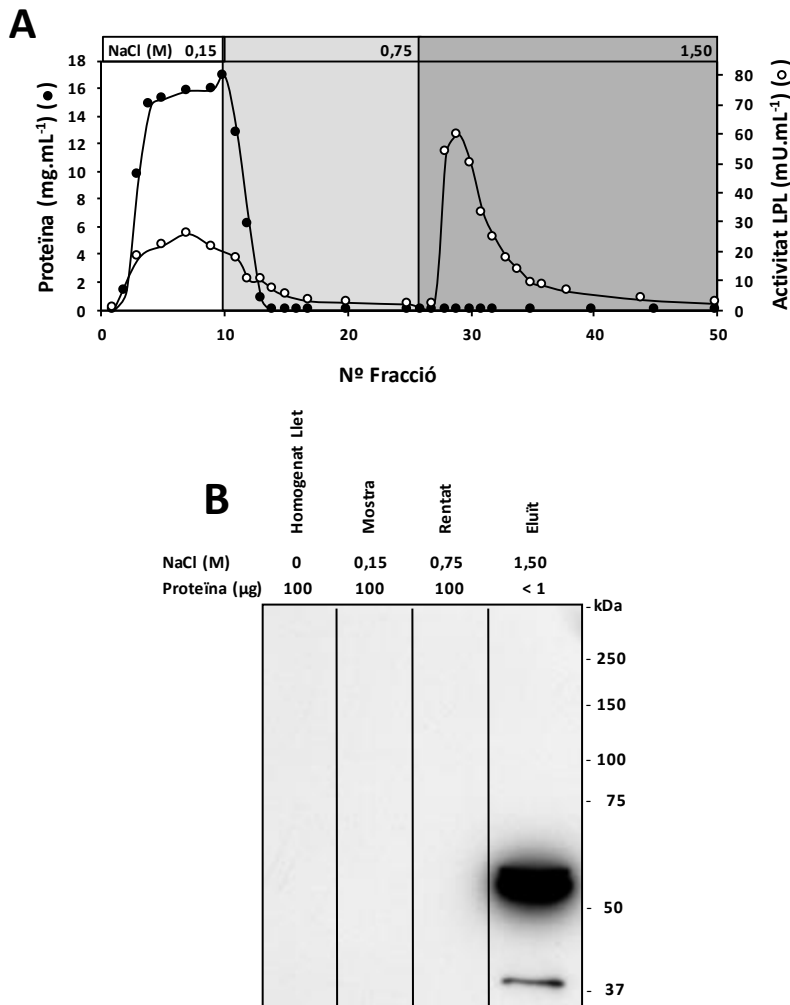


Figura 37. Purificació parcial de l'LPL de llet de rata mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose. (A) Les fraccions van ser recollides després d'un increment esglaonat de la concentració de NaCl, com s'indica a la part superior. Es representa la proteïna total (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) de les fraccions. (B) SDS-PAGE i WB contra LPL (anticòs 5D2), de les fraccions en els diferents passos del procés de purificació. 25 mL de llet de 15 dies post-part procedent de 17 mares. La quantitat total de proteïna carregada s'indica sobre cada carril.

Aquesta purificació parcial ens permet detectar l'LPL mitjançant WB tal i com s'observa en el carril de l'eluït de la Figura 37. (B). En aquest carril de l'eluït s'observa també una banda d'LPL menys intensa i de menor MW

aparent, d'aproximadament 37 kDa, possiblement deguda a productes de degradació de la pròpia LPL. Vàrem obtenir un *pool* barrejant volums iguals de les fraccions recollides d'aquest pic d'activitat LPL i el vam utilitzar com a font d'LPL per analitzar la possible presència d'isoformes de pI de l'LPL en la llet de rata. Com no podem obtenir grans volums de llet de rata (vàrem obtenir 26 mL de llet en total), el volum final d'homogenat de llet del que disposàvem per fer la purificació parcial de l'LPL no era gaire elevat (16 mL) i, conseqüentment, el volum del *pool* no va ser gaire elevat tampoc (12 mL). Per aquest motiu, vàrem decidir no realitzar cap SDS-PAGE i tinció amb plata per racionalitzar l'ús de la mostra.

L'anàlisi de la purificació parcial de l'LPL procedent de llet de rata mitjançant 2DE-WB (veure Figura 38. (A)) ens mostra l'existència de cinc isoformes amb un pI d'entre 7,20 i 8,25 i amb un MW aparent esperat de 56,2 kDa. Sorprenentment, també ens mostra l'existència de cinc isoformes amb un MW aparent més elevat a l'esperat, 62,5 kDa. Aquestes isoformes tenen un pI d'entre 7,00 i 8,05. En la Figura 37. (B), en la visualització de la banda d'LPL en l'elúit per SDS-PAGE i WB, no s'aprecia bé la doble banda (tot i que sí s'intueix) probablement perquè el senyal de les dues bandes era molt intens i van quedar solapades. Per primera vegada, es descriu en la llet de rata isoformes de pI de l'LPL i, també, isoformes de MW aparent. Les isoformes de pI i de MW de l'LPL de llet de rata es van separar per 2DE-tinció amb plata (veure Figura 38. (B)).

Llet rata

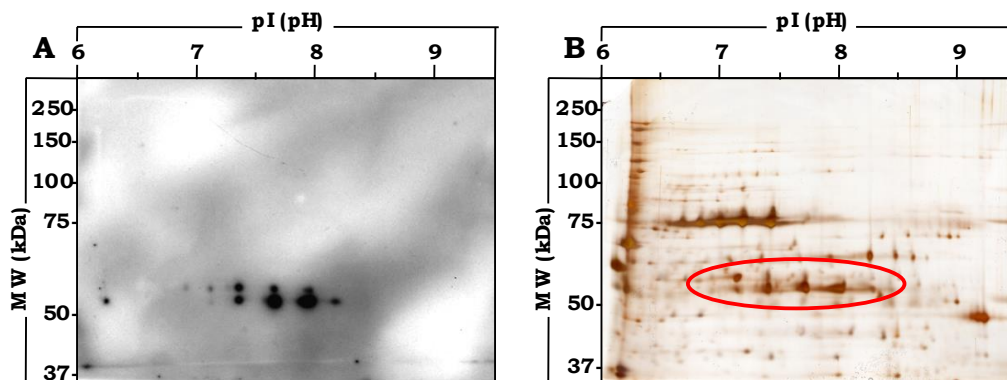


Figura 38. Isoformes de pI de l'LPL de llet de rata. (A) 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2) (activitat LPL carregada 18 mU) i (B) 2DE i tinció amb plata (activitat LPL carregada 18 mU) de l'LPL purificada parcialment de llet de rata. Encerclades en vermell les taques que coincideixen amb la localització de les isoformes de pI de l'LPL. Llet de 15 dies post-part procedent de 17 mares. Per a la primera dimensió, es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. MW = Pes molecular aparent.

Per a generar el patró d'isoformes de l'LPL (veure 3.9) de la llet de rata que es mostra a la Figura 39, vàrem fer dos 2DE-WB i, de cada 2DE-WB, vàries exposicions en el revelat dels WB. La isoforma de pI més abundant (un 25% de la quantitat total d'LPL) té un pI neutre-bàsic (7,75) i un MW de

56,2 kDa. La següent isoforma més abundant té un pI proper a la isoforma majoritària (8,05) i el mateix MW.

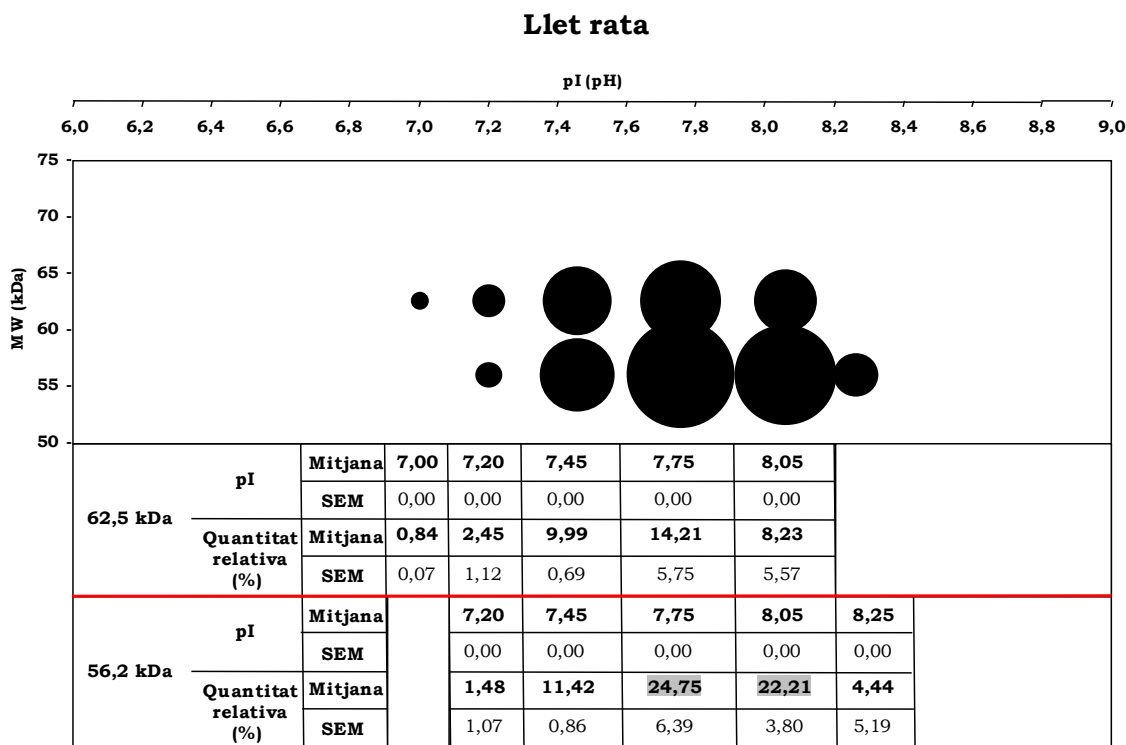


Figura 39. pI, pes molecular aparent i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de llet de rata (relacionat amb la Figura 38.). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (total 10 isoformes). A la taula s'indica aquesta quantitat respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització dels cercles es correspon amb el seu pI. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques. MW = Pes molecular aparent.

4.2.4.2 Glàndula mamària alletant de rata

Per estudiar l'LPL de la glàndula mamària alletant de rata, vàrem purificar parcialment la seva LPL mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. Per a aquesta purificació vàrem ajuntar les glàndules mamàries, de 9 rates alletants, agafant una porció de teixit d'igual pes de cadascuna d'elles per fer l'homogenat.

En la Figura 40. (A) es representa aquesta purificació parcial. Observem que en el pas de la mostra, amb 0,15 M de NaCl, es recullen la major part de les proteïnes presents a la glàndula mamària alletant de rata, són les proteïnes que no han quedat retingudes en la columna d'HS. Al principi del rentat amb 0,75 M de NaCl s'elueix una quantitat important de proteïnes, les que tenen una afinitat menor a l'HS, i veiem un pic força elevat d'activitat lipasa. Finalment, augmentant la força iònica fins a 1,50 M, veiem un pic d'activitat lipasa que correspon a l'LPL eluïda. Les fraccions que es recullen en aquest punt de la cromatografia contenen una quantitat molt baixa de proteïna total, tot i així observem un petit pic de proteïna eluïda que fa que a l'SDS-PAGE i tinció amb plata observem nombroses bandes (veure Figura 40. (B)). Aquesta purificació parcial ens

permet detectar l'LPL mitjançant WB tal i com observem a la Figura 40. (C). Vàrem barrejar volums iguals de les fraccions recollides d'aquest pic d'activitat LPL excloent les fraccions que, malgrat tenir una elevada activitat LPL, tenien una concentració més alta de proteïna total per evitar que un excés de proteïna interferís en l'anàlisi per 2DE. Aquest *pool* el vam utilitzar com a font d'LPL per analitzar la possible presència d'isoformes de pI de l'LPL en la glàndula mamària alletant de rata.

Glàndula mamària alletant rata

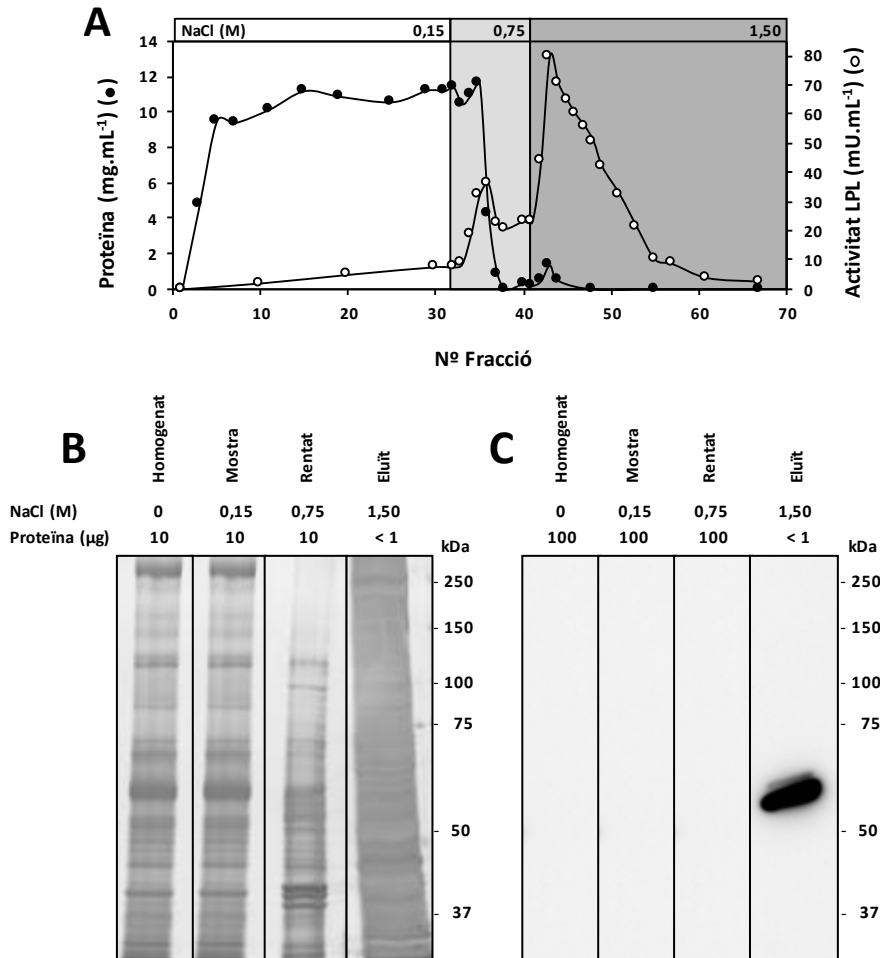
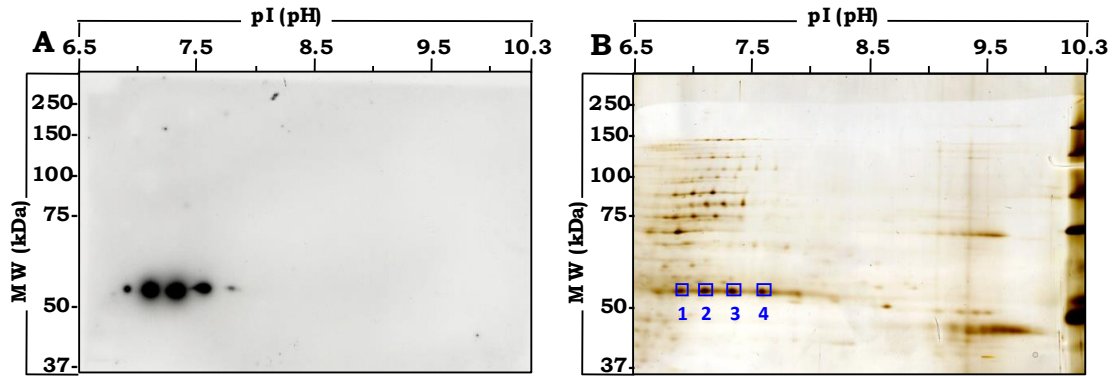


Figura 40. Purificació parcial de l'LPL de glàndula mamària de rata alletant mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose*. (A) Les fraccions van ser recollides després d'un increment esglaonat de la concentració de NaCl, com s'indica a la part superior. Es representa la proteïna total (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) de les fraccions. (B) SDS-PAGE i tinció amb plata i (C) SDS-PAGE i WB contra LPL (anticòs 5D2), de les fraccions en els diferents passos del procés de purificació. 25 g de glàndula mamària alletant de 15 dies post-part procedent de 9 mares. La quantitat total de proteïna carregada s'indica sobre cada carril.

L'anàlisi de la purificació parcial de l'LPL procedent de glàndula mamària alletant de rata mitjançant 2DE-WB (veure **Figura 41. (A)**) ens mostra l'existència de cinc isoformes amb un pI d'entre 6,9 i 7,9. Vàrem separar

les isoformes de pI de l'LPL de la glàndula mamària alletant de rata per 2DE-tinció amb plata i vàrem retallar les taques d'interès per analitzar-les i identificar-les mitjançant MALDI-TOF i LC-MS/MS (veure **Figura 41. (B)**). La isoforma més bàsica que s'observa en la 2DE-WB es veu amb una intensitat menor, també, en el gel tenyit amb plata, segurament a causa d'una menor concentració de proteïna, i per aquest motiu vàrem decidir no identificar-la. Com s'observa a la **Figura 41. (C)** la cerca en les quatre taques retallades no va donar identificació positiva per l'LPL, ara bé, en una inspecció manual dels resultats, sí que es van trobar senyals amb una molt baixa intensitat característics de l'LPL. Per a assegurar-nos que la identificació amb MALDI-TOF era correcta, vàrem analitzar mitjançant LC-MS/MS la taca número 2 (veure **Figura 41. (D)**). Aquesta identificació va resultar positiva per a l'LPL.

Glàndula mamària alletant rata



C

MALDI-TOF Identification		
Nº de taca	Presència de senyals relacionats amb l'LPL	Identificació proteïna
1	Yes (very low intensity)	NO HIT
2	Yes (very low intensity)	NO HIT
3	Yes (very low intensity)	NO HIT
4	Yes (very low intensity)	NO HIT

D

LC-MS/MS (Sample 2)										
Nº d'accés ^a	Descripció	Score	% de cobertura ^b	Nº de proteïnes	Nº de pèptids únics	Nº de pèptids	# PSMs	# AAs	MW calc. [kDa]	pI
Q06000	Lipoprotein lipase OS=Rattus norvegicus GN=Lpl PE=1 SV=1 - [LIPL_RAT]	30,25	19,83	1	6	6	7	474	53,0	8,13

^a Accession # a UniProtKB/Swiss-Prot.

^b El percentatge de cobertura (*coverage* %) està calculat considerant la proteïna madura.

Figura 41. Identificació de les isoformes de pI de l'LPL de glàndula mamària de rata alletant. (A) 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2) (activitat carregada 30 mU) i (B) 2DE i tinció amb plata (activitat carregada 30 mU) de l'LPL purificada parcialment de glàndula mamària alletant de rata. Mostra procedent de 9 mares. (C) Es van analitzar per MALDI-TOF quatre taques (1-4). (D) Es va analitzar per LC-MS/MS la taca número 2. Per a la primera dimensió, es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. MW = Pes molecular aparent.

Per a generar el patró d'isoformes de pI de l'LPL (veure 3.9) de la glàndula mamària alletant de rata que observem a la Figura 42. vàrem fer dues 2DE-WB i, de cada 2DE-WB, diferents exposicions en el revelat dels WB. La isoforma de pI més abundant (un 41% de la quantitat total d'LPL) té un pI neutre (7,33) i la següent isoforma més abundant té un pI proper a la isoforma majoritària (7,15).

Glàndula mamària alletant rata

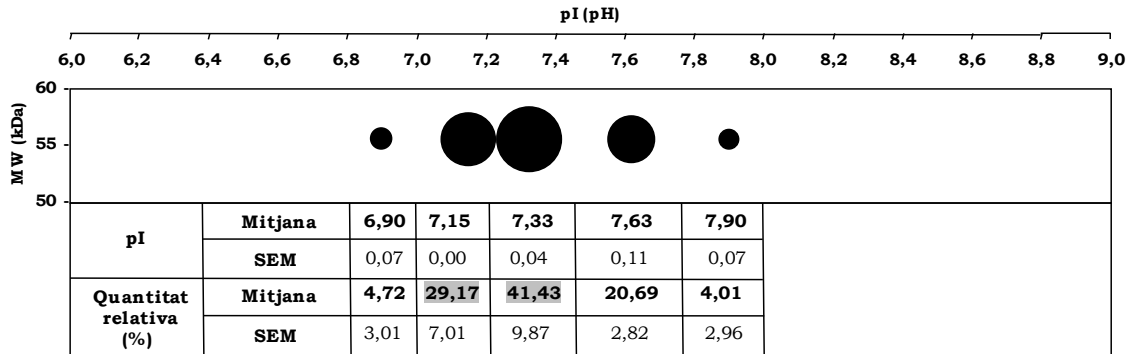


Figura 42. pI, pes molecular aparent i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de glàndula mamària alletant de rata (relacionat amb la Figura 41.). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (total 5 isoformes). A la taula s'indica aquesta quantitat respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització dels cercles es correspon amb el seu pI. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques. MW = Pes molecular aparent.

4.2.4.3 Plasma post-heparínic de rates alletants i verges

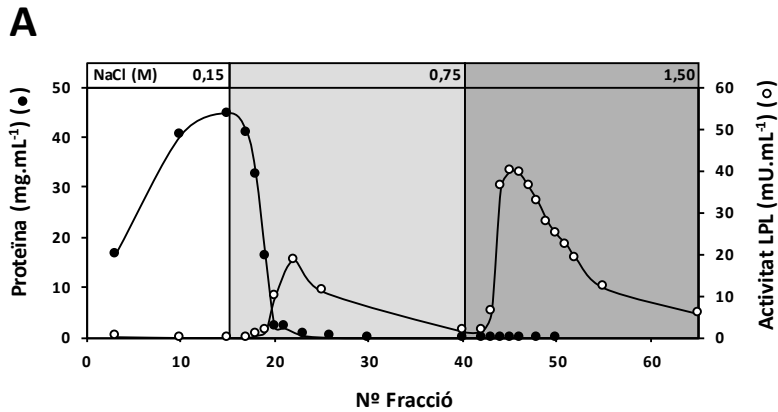
L'últim fluid implicat en l'alletament del qual volíem explorar la possible existència d'isoformes de pI de l'LPL era el PHP de les rates alletants. L'LPL sintetitzada a les cèl·lules epitelials de la glàndula mamària alletant pot ser secretada a la llet materna o bé, dirigida a la superfície luminal de les cèl·lules endotelials dels capil·lars sanguinis que es troben en la glàndula mamària alletant [45]. Tenint en compte que en el PHP trobem tota l'LPL madura de l'organisme, hauríem de trobar en aquest recull, com a mínim, les isoformes de pI trobades a la glàndula mamària alletant (entre altres isoformes d'LPL provinents d'altres teixits). Hem de tenir present, també, que la glàndula mamària alletant esdevé un òrgan amb un pes important respecte als altres òrgans de l'organisme durant l'alletament. La superfície de cèl·lules epitelials secretores és molt gran degut als replegaments dels alvèols de la glàndula, de manera que no és d'estranyar que la síntesi d'LPL sigui molt gran en aquest teixit i que, conseqüentment, la seva activitat catalítica també ho sigui. Per tant, esperariem que les isoformes de pI de l'LPL provinents de la glàndula mamària alletant fossin detectables en el conjunt d'isoformes d'LPL madures del PHP de les alletants.

A part, també vam decidir explorar la possible existència d'isoformes de pI de l'LPL en el PHP de rates femella verges. Amb aquesta aproximació preteníem trobar possibles diferències, en el patró d'isoformes d'ambdós PHP (alletants i verges), degudes a la presència d'isoformes de la glàndula

mamària alletant que no esperariem trobar en el PHP de les femelles verges.

Per estudiar l'LPL del PHP de rates verges i alletants, vàrem purificar parcialment la seva LPL mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. En la Figura 43. es presenten aquestes purificacions parcials. Observem que en el pas de la mostra amb 0,15 M de NaCl es recullen la major part de les proteïnes presents al PHP tant de les rates verges com de les alletants, són les proteïnes que no van quedar retengudes en les respectives columnes d'HS. En ambdues purificacions parcials, veiem al principi del rentat amb 0,75 M de NaCl l'elució d'una quantitat important de proteïnes, són les que tenien una menor afinitat a l'HS. També observem un pic, encara que no gaire elevat, d'activitat lipasa en aquesta concentració de sals que, com hem comentat en la purificació parcial de l'LPL de PHP d'humans (veure 4.1.2), es tractava d'HL. Finalment, augmentant la força iònica fins a 1,50 M, en ambdós grups de rates veiem un pic d'activitat lipasa molt elevat que correspon a l'LPL eluïda.

PHP rata verge



PHP rata alletant

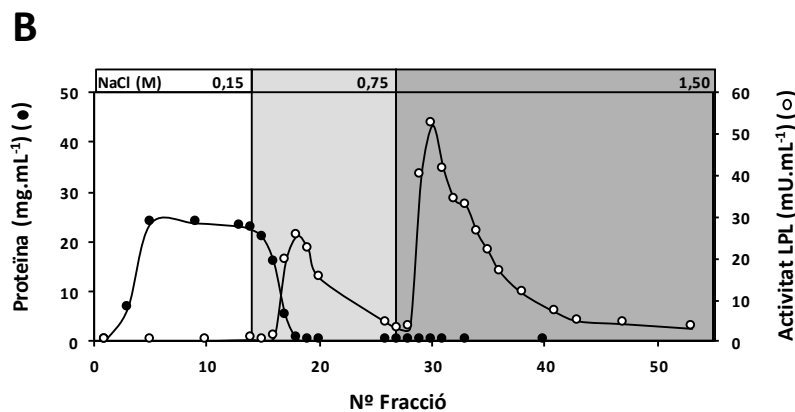
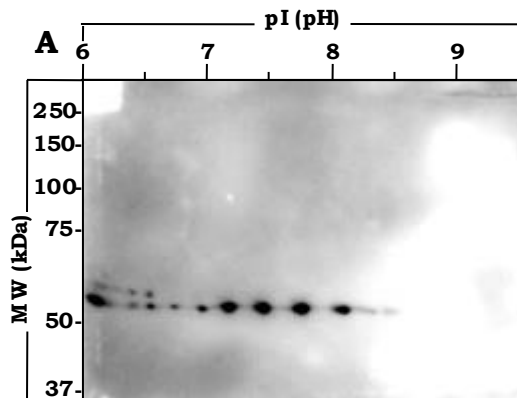


Figura 43. Purificació parcial de l'LPL de plasma post-heparínic de rata femella (verge i alletant) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose. (A) PHP rata verge i (B) PHP rata alletant de 15 dies post-part. Les fraccions van ser recollides després d'un increment esglaonat de la concentració de NaCl, com s'indica a la part superior. Es representa la proteïna total (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) de les fraccions. 27 mL de PHP procedent de 9 animals en cada purificació.

L'anàlisi de la purificació parcial de l'LPL procedent de PHP de rata **verge** mitjançant 2DE-WB (veure Figura 44. (A)) mostra l'existència de vuit isoformes amb un pI d'entre 6,40 i 8,10 i amb un MW aparent esperat de 56,2 kDa. També mostra l'existència de dues isoformes amb un MW aparent més elevat a l'esperat, 62,5 kDa. Aquestes isoformes tenen un pI d'entre 6,40 i 6,55. Observem doncs que en el PHP de rata verge, a part de les isoformes de pI de l'LPL, també existeixen isoformes de MW.

PHP rata verge



PHP rata alletant

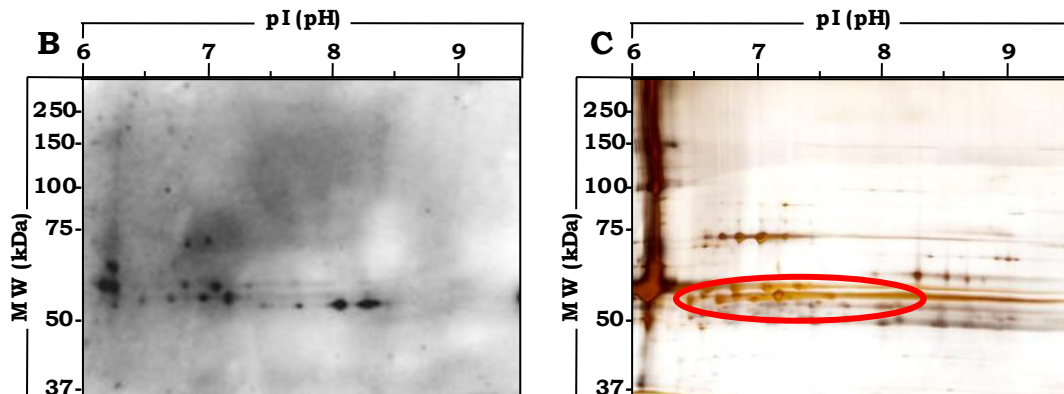


Figura 44. Isoformes de pI de l'LPL de plasma post-heparínic de rata femella (verge i alletant). (A) 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2) de l'LPL purificada parcialment de PHP de rata verge (activitat carregada 90 mU). (B) 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2) (activitat carregada 91 mU) i (C) 2DE i tinció amb plata (activitat carregada 49 mU) de l'LPL purificada parcialment de PHP de rata alletant de 15 dies post-part (encerclat en vermell la zona de les isoformes de pI de l'LPL). Mostra procedent de 9 animals en cada purificació. Per a la primera dimensió, es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. MW = Pes molecular aparent.

De manera encara més sorprenent, l'anàlisi de la purificació parcial de l'LPL procedent de PHP de rata **alletant** mitjançant 2DE-WB (veure Figura 44. (B)) mostra l'existència d'isoformes de MW de l'LPL de 3 pesos moleculars diferents que alhora també són isoformes de pI. Observem:

- i) quatre isoformes amb un pI d'entre 7,40 i 8,25 i amb un MW aparent esperat de 56,2 kDa
- ii) quatre isoformes amb un pI d'entre 6,50 i 7,15 i amb un MW aparent de 58,5 kDa (2,3 kDa més que el MW aparent esperat, aproximadament un 4% de més)
- iii) quatre isoformes amb un pI d'entre 6,60 i 7,35 i amb un MW aparent de 64,2 kDa (8,0 kDa més que el MW aparent esperat, aproximadament un 12% de més)

Les isoformes de pI i de MW aparent de l'LPL del PHP de rata alletant es van separar per 2DE-tinció amb plata (veure Figura 44. (C)). No es va realitzar la 2DE-tinció amb plata del PHP de rata verge perquè no disposàvem de més quantitat de mostra.

Per a la generació dels patrons de distribució d'isoformes de l'LPL (veure 3.9) del PHP de rata verge i alletant que observem a la Figura 45. vàrem fer varies 2DE-WB de cada *pool* d'ambdues mostres i, de cada 2DE-WB, diverses exposicions en el revelat dels WB. La isoforma de pI més abundant del PHP de rata **verge** (un 21% de la quantitat total d'LPL) té un pI neutre (7,45) i un MW aparent de 56,2 kDa. La següent isoforma més abundant té un pI proper a la isoforma majoritària (7,20) i el mateix MW aparent. En el patró d'isoformes del PHP de les rates **alletants** observem que la isoforma de pI més abundant (un 22% de la quantitat total d'LPL) té un pI bàsic (8,00) i un MW aparent de 56,2 kDa. La següent isoforma més abundant té un pI proper a la isoforma majoritària (8,25) i el mateix MW aparent.

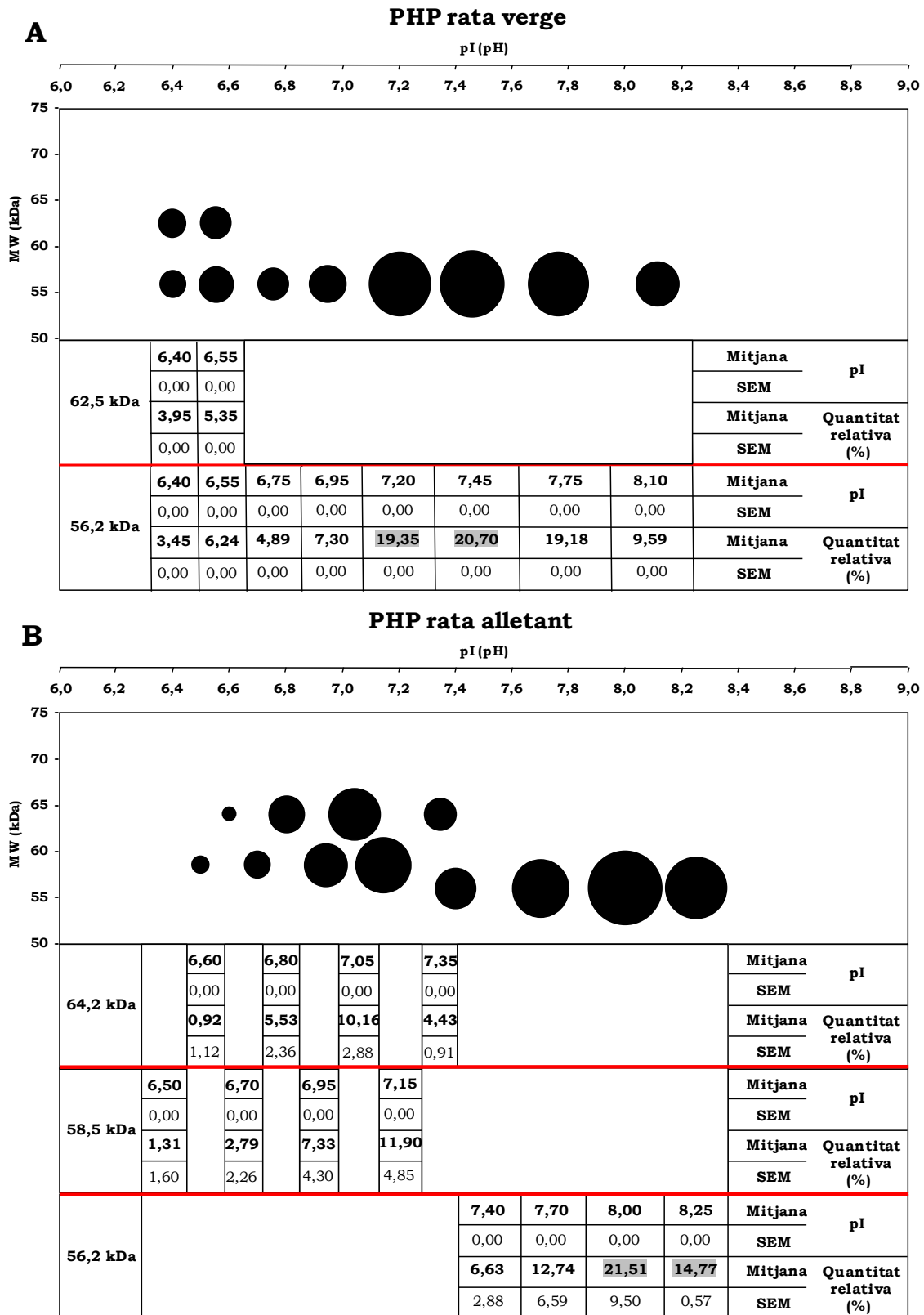


Figura 45. pI, pes molecular aparent i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de plasma post-heparinic de rata femella (verge i alletant) (relacionat amb la Figura 44.). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 10 isoformes; B, total 12 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització dels cercles es correspon amb el seu pI. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques de les verges i de 3 rèpliques tècniques de les alletants. MW = Pes molecular aparent.

En la Figura 46. podem observar la comparativa dels patrons generats de les isoformes d'LPL dels dos fluids i teixit de rates alletants (llet, glàndula mamària alletant i PHP) implicats en l'aproximació per a la caracterització funcional de les isoformes d'LPL en l'alletament. Com hem comentat abans, l'LPL que es sintetitza a les cèl·lules parenquimàtiques de la glàndula mamària alletant té dos destins possibles: la llet i l'endoteli dels vasos sanguinis de la mateixa glàndula [45]. De manera que el patró de les isoformes d'LPL de la llet i la glàndula mamària alletant hauria de ser molt similar ja que la llet hauria d'incloure part o totes les isoformes presents en la glàndula mamària alletant. I, de la mateixa manera, el patró d'isoformes del PHP de les rates alletants hauria d'incloure, com a mínim, una part o totes les isoformes trobades a la glàndula mamària alletant.

Primerament, si comparem les isoformes de la glàndula mamària alletant amb les de la llet veiem que els seus pI no coincideixen, malgrat coincideixen en nombre total d'isoformes. Podria ser que les isoformes de pI de l'LPL de la glàndula mamària alletant pateixin alguna o algunes PTM quan són vessades a la llet o en la mateixa llet ja que: (i) els seus pI no coincideixen amb les del teixit en el qual han estat sintetitzades (les isoformes són més bàsiques en la llet i més neutres en la glàndula mamària alletant) i (ii) en la glàndula mamària alletant no observem isoformes de MW aparent com sí existeixen en la llet.

En segon lloc, la comparació entre el patró d'isoformes de l'LPL de la glàndula mamària alletant i el del PHP de les rates alletants no confirma la nostra hipòtesi de trobar, entre d'altres, les isoformes de pI de la glàndula mamària alletant en el PHP. Hauríem esperat trobar les mateixes isoformes de pI de l'LPL de la glàndula mamària alletant en el PHP de les alletants amb un MW aparent de 56,2 kDa. En canvi, en el PHP de les rates alletants trobem isoformes amb els mateixos pI que les isoformes trobades a la glàndula mamària alletant però amb un MW aparent diferent. Concretament, només les dues isoformes més bàsiques trobades a la glàndula mamària alletant coincideixen, en pI i MW aparent, amb dues isoformes del PHP de les alletants. Les tres isoformes restants de la glàndula mamària alletant, encara que podem trobar coincidència de pI amb isoformes trobades al PHP de les rates alletants, no tenen el mateix MW aparent ja que en les isoformes del PHP és superior a 56,2 kDa.

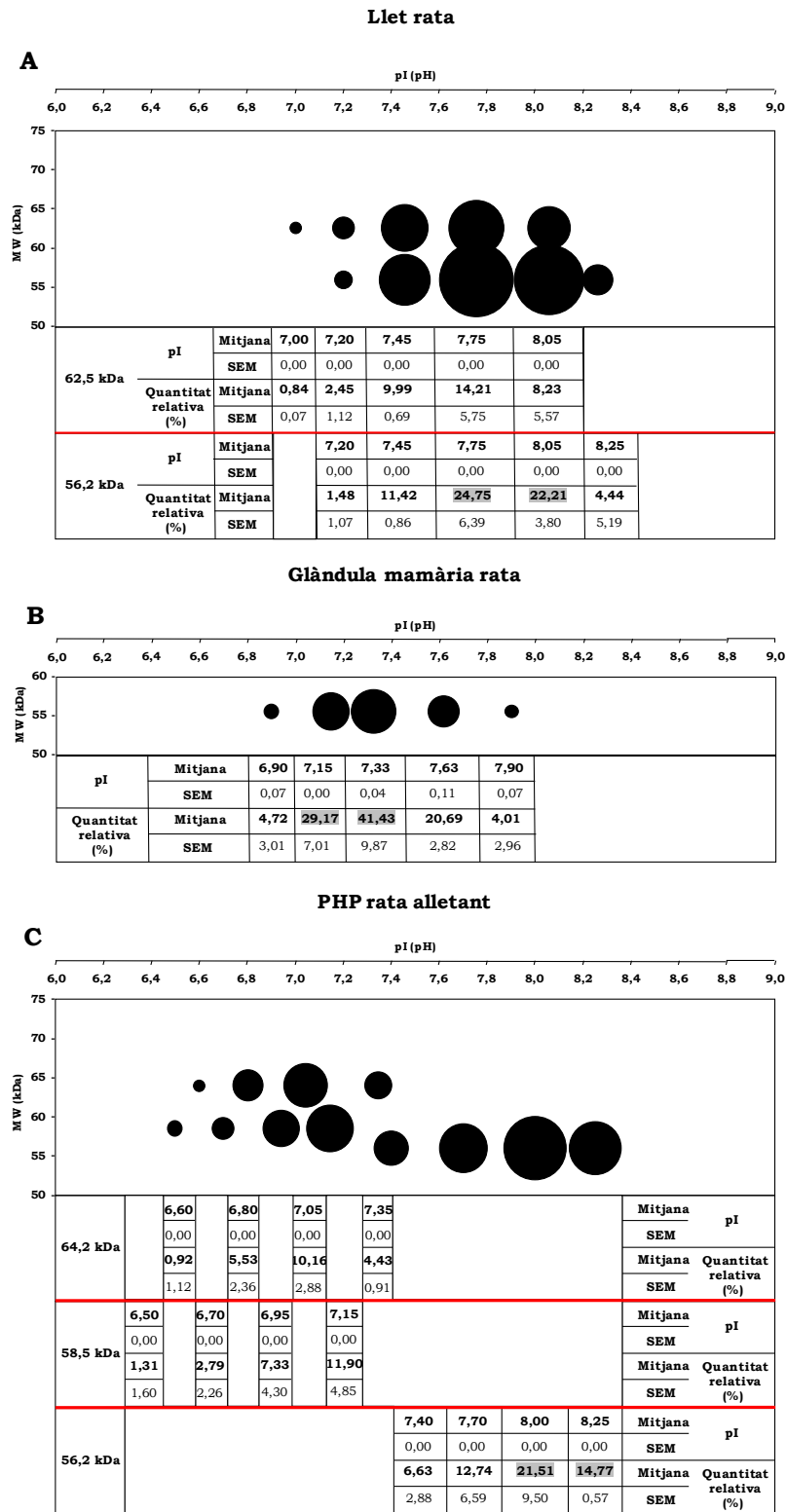


Figura 46. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el model d'alletament en rata. (A) Patró d'isoformes de pI de l'LPL de la llet Figura 39., de la (B) glàndula mamària alletant Figura 42. i del (C) PHP alletant Figura 45.. La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 10 isoformes; B, total 5 isoformes; C, total 12 isoformes). A la taula es presenta aquesta quantitat respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb seu pI i el seu MW aparent. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques de la llet, de 2 rèpliques tècniques de la glàndula mamària alletant i de 3 rèpliques tècniques del PHP de les alletants. MW = Pes molecular aparent.

En el nostre grup, s'ha publicat prèviament [180] que en el **PHP de rata mascle** s'observen set isoformes de pI en un rang de pH d'entre 6,50 i 8,00 aproximadament. Degut a la troballa d'isoformes de MW aparent en el **PHP de rata femella verge**, vàrem voler comparar els seus patrons per estudiar el possible efecte del gènere en les isoformes de l'LPL. A més, la generació del patró d'isoformes de pI de l'LPL del PHP de rata mascle ens permetria, també, comparar-lo amb el generat amb el PHP d'humans i, així, poder fer una comparativa entre espècies (veure V. Discussió Global).

En primer lloc, vam voler corroborar el resultat mostrat en la publicació de les isoformes de pI de l'LPL provinent de PHP de rata mascle [180] i, en segon lloc, generar el patró d'aquestes isoformes de pI. Així, primerament, vàrem tornar a purificar parcialment l'LPL procedent de PHP de rata mascle i, amb el *pool* de l'elutit resultant, vàrem realitzar una anàlisi mitjançant 2DE-WB per observar les isoformes de la mostra (dades no mostrades). Per últim, vàrem generar el patró de les isoformes de pI de l'LPL del PHP de rata mascle (veure Figura 47. (A)) on s'observen vuit isoformes amb un pI d'entre 6,70 i 8,40, un rang de pH proper a l'observat en estudis anteriors en el nostre grup [180]. En el patró, observem dues isoformes de pI amb una quantitat relativa superior (un 30% de la quantitat total d'LPL cadascuna d'elles) i amb un pI neutre (7,30 i 7,60). La tercera isoforma més abundant té un pI més bàsic (7,90). D'acord amb els estudis previs del grup [180], totes les isoformes de pI de l'LPL provinents de PHP de rata mascle tenen un MW aparent de 56,2 kDa.

El patró d'isoformes de pI de l'LPL obtingut en el PHP de les rates femella i mascle no és idèntic. Si comparem els dos patrons, observem que la principal diferència rau en l'existència d'isoformes de MW aparent de l'LPL al PHP de les femelles, que no es troben en els mascles. En els dos gèneres, el rang de pH en el qual es troben les isoformes és similar encara que no idèntic (mascles entre 6,70 i 8,40; femelles entre 6,40 i 8,10) i les isoformes més abundants es troben en la zona neutra de pH. La presència de les dues isoformes de MW aparent de 62,5 kDa en les femelles, coincideix amb la presència de dues isoformes de MW aparent de 56,2 kDa amb el mateix pI (6,40 i 6,55). Aquestes quatre isoformes àcides no les trobem en el PHP dels mascles ni tan sols al MW aparent de 56,2 kDa. De manera contrària, la isoforma més bàsica trobada al PHP de les rates mascle (8,20 i 8,40) no es troba en el PHP de les femelles verges.

Com aquest últim resultat està al marge dels objectius definits per aquest estudi, la discussió sobre el mateix es troba a l'apartat V. Discussió global.

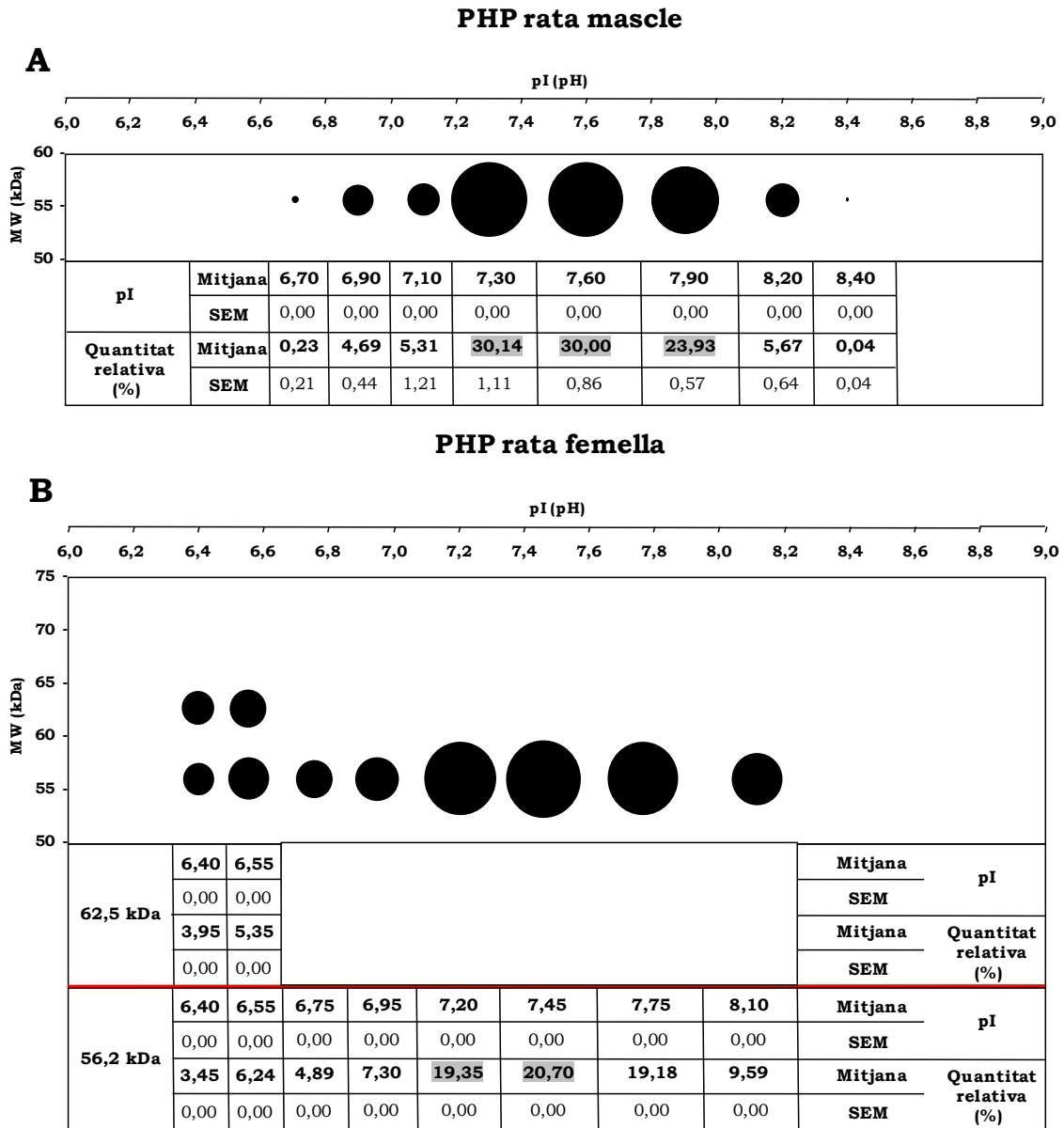


Figura 47. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL de plasma post-heparínic de rates mascle i femella. Patró d'isoformes de l'LPL del (A) PHP de rates mascle i del (B) PHP de rates femella verges (veure Figura 45. (A)). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 8 isoformes; B, total 10 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb el seu pI i el seu MW aparent. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques del PHP de rata mascle i de 2 rèpliques tècniques del PHP de rata femella. MW = Pes molecular aparent.

4.2.5 Discussió

La tècnica de l'IEF ens hauria permès comparar els pI de les isoformes de l'LPL de dues o més mostres diferents en un mateix gel per determinar si es tractava o no de la mateixa isoforma. Aquesta informació ens hauria estat molt útil en els estudis d'aproximació a la caracterització funcional de les isoformes i en els de distribució tissular de les mateixes. Malgrat que la posada al punt de l'IEF no s'ha assolit, hem pogut concloure que l'LPL, una proteïna amb un pI neutre alcalí, no és la més adient per aquest tipus d'anàlisi. En aquesta tesi, vàrem optar per emprar la 2DE per comparar els patrons d'isoformes entre mostres. De manera paral·lela, en la tesi d'en Pere Carulla [181], es va posar al punt el mètode d'electroforesi diferencial en gel (2DE-DIGE) per estudiar les possibles diferències de pI. Aquest mètode té l'avantatge de poder analitzar fins a tres mostres diferents en una sola 2DE ja que cada mostra és unida prèviament a un fluoròfor diferent. Les isoformes de cada mostra es poden analitzar de manera individual o combinada mitjançant un escàner de fluorescència i seleccionant els fluoròfors específics de cada mostra. Aquesta metodologia es va emprar per estudiar les possibles diferències de pI de les isoformes de l'LPL en diferents situacions fisiològiques (fred i dejuni/realimentació) per avançar en la caracterització funcional de l'enzim. Malauradament, al tractar-se de dues tesis que es van realitzar al mateix temps, la 2DE-DIGE no estava posada al punt en el moment d'analitzar les mostres de la present tesi.

En aquest estudi hem corroborat que l'activitat LPL en la llet humana és molt elevada, tal i com es descriu en estudis previs [88]. El fet d'haver obtingut activitats LPL molt disperses en la llet humana pot haver estat degut a diferències en el moment de l'extracció de la llet. A diferència d'altres tipus de mostra, podem visualitzar l'LPL en un homogenat de llet mitjançant SDS-PAGE i WB, sense necessitat de purificar-la parcialment mitjançant la tècnica de la cromatografia d'afinitat a HS. Aquest fet, probablement és degut a l'elevada activitat LPL i a la baixa concentració de proteïna total present a la mostra de llet humana. En el PHP d'humans, també vàrem observar una elevada activitat LPL en la mostra però la concentració de proteïna total era més elevada que en el cas de la llet humana [202]. Suposem, doncs, que aquesta elevada activitat específica (activitat enzimàtica (mU)/quantitat de proteïna total (mg)) de l'LPL en la llet humana, comparada per exemple amb l'observada en el PHP d'humans, fa que puguem visualitzar l'enzim mitjançant WB sense necessitat de purificar-lo parcialment.

Hem descrit, per primera vegada, que existeixen almenys vuit isoformes de pI de l'LPL en la llet humana amb un rang que va del pH neutre al bàsic, essent les neutres les més abundants. Els patrons de les isoformes de pI de l'LPL en les quatre donants estudiades són similars. Això suggereix que el patró de les isoformes en la llet humana està altament conservat, com en el cas del PHP humà. A més es confirma que les isoformes no són degudes a variants al·lèliques (pel fet de trobar més de dues isoformes en cada donant) i que el seu origen, és molt probablement,

degut a PTM tal i com comentàvem en l'apartat 4.2.3 (discussió PHP d'humans).

Jensen *et al.* [89], van obtenir una activitat LPL en la llet de rata d'aproximadament 140 nano-equivalents d'àcids grassos/minut per mL. En l'estudi no especificaven el temps de maduració post-part de la llet. La comparaven amb l'activitat LPL en la llet humana, d'aproximadament 200 nano-equivalents d'àcids grassos/minut per mL, obtinguda per Neville *et al.* [88]. Els valors obtinguts en ambdós estudis són del mateix ordre de magnitud i, per tant, les activitats LPL en les llets de les dues espècies eren comparables. En el nostre estudi, vam trobar una elevada activitat LPL en les llets d'ambdues espècies del mateix ordre de magnitud i, per tant, també concloem que són similars i comparables. Concretament, en l'espècie murina vam trobar una mitjana d'activitat LPL de 104 mU/mL i en la humana una mitjana de 113 mU/mL.

L'activitat LPL trobada a la mostra d'ambdues llets en el seu pas a través de la columna d'HS és la mateixa, 20 mU/mL. Així com l'activitat LPL en l'homogenat d'ambdues espècies és similar, la concentració de proteïna total no ho és. L'homogenat de llet de rata presentava el doble de concentració de proteïna que la humana. Aquests resultats es troben en la línia dels publicats per Jensen (veure Taula 8.), en la llet de rata hi ha més proteïna que en la humana [252]. De manera que, com passa amb els PHP humans i a diferència de la llet humana, cal fer una purificació parcial de l'LPL de la llet de rata per a poder-la visualitzar mitjançant WB. Val a dir, que encara que en la llet de rata hi hagi més quantitat de greix que en la humana, aquest no pot ser el responsable de la no detecció d'LPL, mitjançant WB, en l'homogenat de llet de rata perquè ambdues mostres (llet de rata i humana) són deslipidades durant la preparació per a poder ser carregades a la columna d'HS (veure apartat 3.5).

Espècie	Greix (%)	Proteïna (%)	Carbohidrats (Lactosa) (%)	Vitamines i Minerals (%)	Sòlids totals (%)
Humana	4,5	1,1	6,8	0,2	12,6
Rata	14,8	11,3	2,9	1,5	31,7

Taula 8. Composició de la llet humana, murina i bovina. Taula adaptada del llibre *Handbook of Milk Composition* de R.G. Jensen [252].

L'estudi d'aproximació a la caracterització funcional de les isoformes aprofitant el rol clau de l'LPL en l'alletament, ens ha permès ampliar l'estudi de distribució tissular de les isoformes de l'LPL en rates femella. D'aquesta manera, hem demostrat l'existència d'isoformes de pI i de MW aparent de l'LPL en la llet de rata. De les 10 isoformes observades en la llet de rata les que tenen una abundància relativa superior es troben en el rang de pH neutre-bàsic. La diferència de MW aparent entre ambdós conjunts d'isoformes (5 isoformes de pI per cada conjunt d'isoformes de MW) és d'aproximadament uns 6,3 kDa. Aquesta diferència de MW és similar a la trobada quan es deglicosila l'LPL de cor de rata [180] o de WAT de macaco [181]. Aquesta circumstància suggereix que la llet de rata

presenta LPL altament glicosilada. A més, se sap que existeixen altres proteïnes amb isoformes de pI i de MW aparent, com per exemple l'adiponectina provinent de sèrum boví fetal on les isoformes de MW aparent són degudes a glicosilacions [253]. Caldrien futurs experiments deglicosilant l'LPL de la llet per contrastar aquesta hipòtesi. A part, se sap que en humans existeixen variants o isoformes de MW aparent de la BSSL degudes a diferents graus de glicosilació de la proteïna [254]. És conegut que la glicosilació en la BSSL facilita el transport i la preservació de les formes actives de l'enzim a l'estómac de l'infant influenciant en l'eficiència de la digestió i absorció lipídica, una font d'energia vital pels nounats [255]. Aquestes isoformes de la BSSL tenen una implicació funcional directa en l'alletament ja que el seu grau de glicosilació va variant durant, com a mínim, els sis primers mesos d'alletament, sobretot, durant el primer mes de vida [255]. En rata no es troba BSSL en la glàndula mamària alletant ni en la llet però sí en humans [225]. En la llet humana, doncs, no existeixen les isoformes de MW aparent de l'LPL però sí les de la BSSL. En canvi, la llet de rata no presenta BSSL i l'LPL està formada per isoformes de pI i de MW aparent. Si aquestes isoformes de MW aparent de l'LPL en la llet de rata fossin degudes a diferents glicosilacions, especulem que podrien tenir la mateixa implicació funcional que les isoformes de MW aparent de la BSSL en la llet humana i afavorir la preservació de l'activitat de l'enzim a l'estómac del nounat.

Alguns autors proposen que l'activitat LPL trobada a la llet és el resultat de l'excedent d'LPL existent en la glàndula mamària alletant [92] o bé procedeix de filtracions procedents de la mateixa glàndula [90, 91]. D'acord amb aquestes teories, i tenint en compte l'elevada activitat LPL que hem trobat a la llet de rata, no és d'estranyar que en la glàndula mamària alletant de rata també haguem obtingut una elevada activitat LPL. Ara bé, malgrat haver comprovat l'existència de 5 isoformes de pI de l'LPL en la glàndula mamària alletant (estant la més abundant en un pH neutre) amb un MW aparent esperat de 56,2 kDa, no hem trobat isoformes de diferent MW com en la llet i, a part, els pI de les isoformes de la glàndula mamària alletant no coincideixen amb els trobats a la llet (les isoformes són més bàsiques en la llet i més neutres en la glàndula mamària alletant). Aquests resultats suggereixen que l'LPL de la llet podria tenir algunes PTM com podria ser la glicosilació, entre d'altres. Hem de tenir en compte, també, que la glàndula mamària alletant analitzada encara contenia llet i que, malgrat aquesta circumstància, no hi hem trobat les isoformes de diferent MW aparent. Això, ens porta a plantejar que les possibles PTM es donarien en la transició de l'LPL de la glàndula a la llet o en la mateixa llet i no abans. Si es confirmés aquesta hipòtesi s'hauria d'intentar establir quines implicacions funcionals podria tenir aquest fet, ja que si l'LPL de la llet és només un excedent o una filtració no tindria gaire sentit a nivell fisiològic que l'organisme malbaratés energia en la seva modificació post-traduccional.

Tenint en compte que, com ja hem comentat, l'LPL sintetitzada a les cèl·lules epitelials de la glàndula mamària alletant pot ser secretada a la llet o bé, dirigida a la superfície luminal de les cèl·lules endotelials dels capil·lars sanguinis [45], vam incloure el PHP de les rates alletants en

l'estudi de l'alletament. Hem descrit tres grups d'isoformes de diferent MW aparent (56,2; 58,5 i 64,2 kDa) amb diverses isoformes de pI cadascun en el PHP de les rates alletants. La nostra hipòtesi es basava en que en el PHP de les alletants hauríem de trobar representades, entre d'altres, les isoformes de la glàndula mamària alletant. No hem trobat totes les isoformes de pI de l'LPL de la glàndula mamària alletant en el PHP de les alletants, només dues de les cinc isoformes de la glàndula coincideixen, en pI i MW aparent, amb dues isoformes del PHP. Aquest fet pot ser degut a la presència, en el PHP, d'altres isoformes de l'LPL procedents d'altres teixits de l'organisme amb una quantitat relativa superior a les de la glàndula mamària de manera que, aquestes últimes, es troben en una menor concentració en el plasma i no es poden detectar mitjançant 2DE-WB. Una altra possible explicació, a aquesta no coincidència parcial, és que algunes isoformes de l'LPL en el plasma pateixen alguna o algunes PTM de manera que és molt complicat relacionar una isoforma del PHP amb el seu teixit d'origen.

Tenint present que vàrem decidir explorar la possible existència d'isoformes de pI de l'LPL en el PHP de rates femella verges per comprovar possibles diferències amb el patró d'isoformes del PHP de les alletants, degudes principalment a l'aportació d'isoformes de l'LPL procedents de la glàndula mamària alletant, hem descrit fins a vuit isoformes situades en un rang d'entre 6,40 i 8,10 de pH amb un MW aparent de 56,2 kDa. A més també hem descrit dues isoformes a la banda més àcida del rang de pH amb un MW aparent de 62,5 kDa. Hem comprovat que existeixen diferències en el patró d'isoformes d'un mateix tipus de mostra, el PHP, en funció del context fisiològic (no alletant o verge *vs.* alletant). A més, si comparem els patrons d'isoformes de l'LPL de la glàndula mamària alletant i del PHP de les verges, comprovarem que, efectivament, en el PHP de les femelles verges no estan representades les isoformes de la glàndula mamària alletant. Aquest fet és lògic tenint en compte que la glàndula mamària alletant és un teixit només present en les femelles alletants. En les verges, aquest teixit mamari es troba transdiferenciat a WAT [256]. Seria interessant poder explorar el patró d'isoformes de l'LPL en el WAT mamari en les rates femella verges per comprovar si el patró és o no similar al de la glàndula mamària alletant.

Pensem que l'existència d'isoformes de diferent MW aparent de l'LPL al PHP de les rates alletants i verges es deu a diferents graus de glicosilacions, o a d'altres PTM, que ha patit la proteïna en el seu teixit de procedència o bé en el mateix plasma. Una d'aquestes possibles PTM podria ser la ubiquitinació ja que aquesta modificació pot provocar un increment en el MW aparent de més de 1000 Da [175] ja que la ubiquitina té un MW aparent de 8,6 kDa. Ara bé, en el patró d'isoformes de l'LPL del PHP de les alletants existeix una major complexitat d'isoformes amb uns MW aparents més diversos que no pas en el PHP de les verges. Això, ens indica una major complexitat de les PTM en el cas de les rates alletants que en el de les verges, de manera que en l'alletament l'LPL possiblement està regulada de manera específica en teixits implicats en aquesta situació fisiològica com per exemple la glàndula mamària alletant.

4.2.6 Conclusions

- ✓ No hem aconseguit la posada al punt de l'IEF per l'LPL probablement degut a les dificultats intrínseques de l'enfocament de proteïnes amb pI alcalí mitjançant aquest mètode. Per tant, no hem pogut realitzar un estudi comparatiu i simultani de les isoformes de pI de l'LPL de diferents individus i situacions fisiològiques mitjançant l'IEF.

En humans

- ✓ Suggerim que degut a l'elevada activitat específica de l'LPL present a la llet humana, és possible detectar la proteïna en l'homogenat de llet mitjançant SDS-PAGE i WB sense necessitat de purificar-la parcialment mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. Aquesta circumstància no es dona amb la llet de rata.
- ✓ Hem comprovat, per primera vegada, que existeixen com a mínim 8 isoformes de pI de l'LPL en la llet humana.
- ✓ Hem confirmat que l'origen molecular de les isoformes de pI de l'LPL en humans no és degut a variacions al·lèliques i, per primera vegada en humans, que tampoc és multi-orgànic, ja que el patró observat en la llet, provinent d'una única glàndula mamària alletant i d'una sola donant, mostra més de dues isoformes de pI. Per tant, les isoformes de l'LPL en humans són probablement degudes a modificacions post-traduccionalment de la proteïna. Aquest fet ja s'havia demostrat en rata.

En rata: Aproximació per la caracterització funcional (alletament)

- ✓ Hem demostrat l'existència d'isoformes de pI i, també, de MW aparent en la llet de rata. Concretament, hi ha dos conjunts d'isoformes de pI (amb 5 isoformes cadascun) amb un MW aparent diferent, un és l'esperat per l'LPL (56,2 kDa) i l'altre és un 10% superior (62,5 kDa). Les isoformes amb un MW aparent superior podrien ser degudes a diferents graus de glicosilació de l'LPL.
- ✓ Hem comprovat l'existència de, com a mínim, 5 isoformes de pI de l'LPL en la glàndula mamària de rata alletant. Sorprenentment, no s'ha trobat cap isoforma de MW aparent com en el cas de la llet.
- ✓ Els patrons d'isoformes de l'LPL obtinguts en la llet i en el seu teixit de procedència, la glàndula mamària alletant, són diferents. Suggerim que l'LPL deu patir alguna o algunes modificacions post-traduccionalment en la mateixa llet o durant la secreció de l'enzim des de la glàndula mamària alletant.
- ✓ Hem demostrat que existeixen isoformes de pI i, també, de MW aparent en el PHP de rates femella (alletants i verges). Els patrons d'isoformes obtinguts són diferents entre ambdues condicions fisiològiques. El fet de trobar fins a 3 conjunts d'isoformes de pI amb MW aparent diferent en el PHP de les rates alletants podria ser degut

a que, en l'alletament, existeix una major complexitat en les possibles modificacions post-traduccionals de l'LPL. Aquest resultat suggereix la diversitat funcional de les isoformes de l'enzim, que fa que el patró es reguli segons les condicions fisiològiques.

4.3 ESTUDI PATOLÒGIC: OBESITAT I LIPOPROTEÏNA LIPASA

Arribats a aquest punt de la tesi ja havíem descrit en humans la presència d'isoformes de pI de l'LPL en el PHP i en la llet materna. A partir de les dades obtingudes prèviament en diferents teixits (cor, WAT, BAT, etc.) i espècies (rata i macaco) en el nostre grup de recerca, esperàvem que el WAT humà presentés isoformes de l'LPL.

La possible presència d'isoformes de pI de l'LPL en aquest teixit ens permetria seguir avançant de manera indirecta en la caracterització funcional de l'enzim. Així com vàrem escollir l'alletament per tractar-se d'una situació fisiològica en la qual l'LPL té un rol important, vàrem escollir l'obesitat, una situació patològica en aquest cas, pel mateix motiu. El WAT escollit va ser el subcutani ja que va resultar l'únic adipós que vam poder obtenir d'individus control o normopès. A més, encara que en el procés de recollida de mostres demanàvem tant homes com dones, només vàrem obtenir scWAT de dones control de manera que, finalment, vam realitzar l'estudi amb el gènere femení. Per tant, l'aproximació per la caracterització funcional de les isoformes de l'LPL la vam començar amb l'estudi comparatiu de les mateixes en l'scWAT de dones normopès i obeses mòrbides. No obstant, l'scWAT no és el WAT associat als estudis de l'obesitat, és el vWAT [188, 189]. Degut a la impossibilitat d'obtenir vWAT de dones normopès, vàrem decidir ampliar el nostre estudi a models murins d'obesitat per assegurar una aproximació més acurada per la caracterització funcional de les isoformes en l'obesitat. Concretament, vàrem emprar el model d'inducció d'obesitat per dieta de cafeteria amb rates Wistar i el model d'inducció d'obesitat per modificació genètica amb rates Zucker.

L'obesitat és una malaltia crònica que forma part de la síndrome metabòlica i en la qual estan associats diversos factors: ambientals, genètics i metabòlics. La distribució dels lípids a l'organisme està regulada per l'expressió específica de teixit de l'LPL. Models murins de delectió o sobreexpressió d'LPL per estudiar la regulació específica de teixit d'aquest enzim han atorgat un rol molt important a l'LPL en la regulació del pes corporal i la seva composició [12]. Estudis en humans també han mostrat evidències que indiquen que el gen que codifica l'LPL és clau en l'obesitat [12]. El teixit adipós pot sintetitzar àcids grassos *de novo* o bé captar-los mitjançant l'LPL que hidrolitza els TAG de les TRL que circulen per la sang. Aquesta última opció preferencialment serveix per l'emmagatzematge de lípids en el teixit adipós tal i com ja va postular Hollenberg l'any 1966 [257]. L'LPL és doncs considerada un enzim clau en la iniciació i/o el desenvolupament de l'obesitat. La capacitat de modificar selectivament l'LPL al múscul esquelètic i/o al teixit adipós pot influenciar cap a un determinat pes corporal i composició [12].

En estudis en murins podem induir l'obesitat mitjançant la dieta de cafeteria. Aquest model experimental murí per induir l'obesitat s'ha postulat com el més robust per poder fer estudis comparatius amb la síndrome metabòlica humana [188]. En aquest model, als animals se'ls permet lliure accés al pinso estàndard i a l'aigua i, a més, se'ls ofereix *ad libitum* menjar humà poc saludable (altament apetitós i molt energètic).

Aquesta dieta promou la hiperfàgia i, per tant, un ràpid augment de pes, un increment dels paquets de greix i un augment dels paràmetres prediabètics com la intolerància a la glucosa i la resistència a la insulina. Una lleu inflamació sistèmica crònica pot jugar una paper molt important en la síndrome metabòlica. Aquesta dieta indueix inflamació al fetge i als teixits adiposos blancs i marró, fent-la encara més robusta per a escollir-la com a model d'estudi de l'obesitat.

Un altre model diferent, és el de l'obesitat induïda per modificació genètica. En aquest cas, les rates Zucker són les més utilitzades per a estudis d'obesitat genètica. Les rates Zucker obeses tenen una mutació en el gen del receptor de la leptina (*lepr^{fa}*) que causa obesitat en les rates homozigotes per aquesta mutació [194]. La leptina, hormona reguladora del balanç energètic, es sintetitza al teixit adipós i quan és alliberada a la circulació sanguínia ho fa de manera proporcional a la quantitat de lípids emmagatzemats al teixit adipós. Al cervell, interacciona amb els seus receptors produint una disminució de la ingesta i un augment de la despesa energètica. Aquests animals, a part de l'obesitat, presenten alteracions endocrines similars a les que apareixen en la síndrome metabòlica humana: insulinoresistència, dislipidèmia, hiperinsulinèmia, hiperfàgia, etc. [194]. La hipertensió o la hiperglucèmia no es consideren característiques de les rates Zucker obeses, tot i que a la literatura podem trobar moltes contradiccions [194]. Les rates Zucker obeses o *fatty* (*fa/fa*) desenvolupen hiperplàsia i hipertròfia dels adipòcits del WAT a diferència de les Zucker primes o *lean* (*Fa/+*) [194, 258, 259]. Alguns estudis indiquen que l'augment de l'activitat LPL en el teixit adipós durant els primers dies d'edat de les rates obeses podria ser una de les primeres lesions relacionades amb el gen *lepr^{fa}* [194, 260, 261]. L'augment d'activitat d'aquest enzim podria correlacionar-se amb l'augment de la captura de TAG per part del WAT [194, 260, 262]. Aquest increment d'activitat promouria la hiperfàgia i conduiria a l'obesitat [194, 263]. No obstant, hi ha altres estudis que indiquen que no existeix cap implicació directa entre l'augment d'activitat LPL i el gen *lepr^{fa}*, ja que en rates induïdes nutricionalment a l'obesitat també s'hi observa un augment [259].

4.3.1 Objectius

Primerament, havíem de determinar si en WAT humana, així com el nostre grup havia descrit en d'altres mamífers [181], l'LPL està formada per un conjunt d'isoformes de pI. Si es confirmava aquesta circumstància, preteníem continuar amb la caracterització funcional de les isoformes de l'LPL mitjançant dues aproximacions.

Per un costat l'estudi **indirecte** en la situació d'obesitat, ja que es coneix que l'activitat LPL al WAT varia en aquesta patologia, i vàrem voler determinar si també variava el patró d'isoformes. A més de l'estudi en humans, vàrem ampliar aquesta caracterització funcional de les isoformes de l'LPL amb dos models murins d'obesitat induïda (per dieta de cafeteria i per modificació genètica).

A part d'aquesta aproximació funcional indirecta, preteníem abordar un estudi funcional **directe** per avaluar si totes les isoformes de l'LPL

presenten o no activitat lipolítica. Per dur-lo a terme, havíem de posar al punt el mètode *Activity-based protein profiling* (ABPP) o, com l'hem anomenat en aquesta tesi, mètode del substrat suïcida (SS) per a lipases.

A continuació es detallen els objectius que ens plantejàvem:

En WAT humà

- Conèixer si el WAT subcutani d'humans presenta isoformes de pI de l'LPL.

En WAT de rata

- Conèixer si el WAT retroperitoneal de rata presenta isoformes de pI de l'LPL.

Aproximació per la caracterització funcional indirecta (obesitat) i estudi directe de l'activitat enzimàtica de les isoformes

- En cas de presència d'isoformes de l'LPL al WAT d'humans i de rates, establir si existeixen diferències en el patró d'isoformes en l'obesitat. Preteníem realitzar l'aproximació per la caracterització funcional indirecta de les isoformes comparant els patrons d'isoformes de:
 - Dones obeses mòrbides *vs* dones controls normopès
 - Rates obeses per dieta de cafeteria *vs* controls amb dieta normal (Wistar)
 - Rates obeses per modificació genètica (*Zucker fafa*) *vs* controls primes (*Zucker lean*)
- A més, essent els dos primers objectius certs, estudiar la possible activitat enzimàtica de cada isoforma per separat (aplicació del mètode del substrat suïcida).

4.3.2 Obesitat mòrbida en humanes

La síndrome metabòlica en humans es defineix com una combinació de, com a mínim, tres de les següents característiques: obesitat central, alts nivells de TAG en sèrum, baixos nivells d'HDL en sèrum, nivells elevats de colesterol, hipertensió i elevats nivells de glucèmia en dejuni o basal [1]. L'obesitat es defineix com una malaltia sistèmica que mostra acumulació excessiva de greix en el cos comportant això una sèrie d'efectes nocius per la salut. En humans, l'obesitat mòrbida es classifica com a obesitat de classe III amb un BMI superior a 40 kg/m² (veure Taula 4.).

Les dones obesas estudiades en aquest projecte presenten algunes comorbiditats associades a l'obesitat mòrbida que pateixen, com per exemple: hipertensió, DM tipus 2, apnea obstructiva del son, esteatosi hepàtica, esteatohepatitis, malalties cardiovasculars, dislipidèmies, etc. Els seus BMI són tots superiors a 40 kg/m². Segons la classificació EOSS (veure apartat 1.2.2), en el qual s'avalua l'impacte de l'obesitat en els individus, les voluntàries estudiades es classifiquen en els estadis 2 o 3 de severitat. En aquests estadis els pacients són candidats a una intervenció quirúrgica per l'obesitat mòrbida que pateixen. Segons la classificació KOSC (veure apartat 1.2.2), en el qual s'analitzen 12 aspectes relacionats amb les morbiditats associades a l'obesitat, les voluntàries estudiades es classifiquen en l'estadi 2 amb una puntuació diferent segons cada voluntària. La majoria de les dones obesas estudiades presenten síndrome metabòlica.

El teixit que vàrem utilitzar pels experiments d'obesitat en humanes, com ja hem comentat, va ser l'scWAT ja que era el més fàcil d'obtenir en humans control. S'aprofitava la cirurgia estètica per agafar una mica de teixit del voluntari. Com hem dit en el punt 3.2.3, vàrem obtenir l'scWAT abdominal dels voluntaris control quan aquests varen ser sotmesos a una liposucció abdominal o a una abdominoplàstia i l'scWAT abdominal dels voluntaris obesos quan aquests varen ser sotmesos a cirurgia bariàtrica.

Com ja s'ha comentat en la introducció de l'apartat 4.3, en els criteris d'inclusió de l'estudi demanàvem tant homes com dones. Ara bé, un cop finalitzat el temps de recollida de mostres, no vàrem obtenir cap voluntari home control. Per aquest motiu, vàrem decidir realitzar tot l'estudi en dones i no afegir la variabilitat del gènere.

D'altra banda, per a l'estudi de l'activitat funcional de cada isoforma vàrem posar al punt el mètode de l'SS aplicat a l'LPL. Tot seguit, es descriu la posada al punt d'aquest mètode a fi de poder comprendre millor els resultats que es presenten més endavant sobre aquest estudi funcional.

4.3.2.1 Substrat suïcida / *Activity-based protein profiling*

L'anàlisi global de canvis en la transcripció i/o traducció dels gens mitjançant aproximacions genòmiques o proteòmiques basades en l'abundància d'un transcrit o una proteïna proporciona informació indirecta sobre la funció de les mateixes, ja que els nivells d'mRNA no tenen perquè correlacionar amb l'abundància d'una proteïna i aquesta abundància tampoc necessàriament correlaciona amb l'activitat de la

proteïna [264]. Es necessiten, doncs, altres mètodes per poder estudiar de manera directa la funció de les proteïnes. El mètode de l'SS, és un mètode proteòmic basat en l'activitat de les proteïnes amb el qual es pot analitzar de manera directa la funció d'una proteïna. Aquest mètode, originalment, es va desenvolupar i aplicar a proteomes sencers de teixits diferents per comparar l'activitat lipolítica de totes les lipases presents. Nosaltres, vam adaptar el mètode per estudiar l'LPL purificada parcialment a partir d'una cromatografia d'afinitat a HS (veure apartat 3.5). L'adaptació d'aquest mètode s'ha basat en diferents articles publicats, principalment, en els estudis del Dr. Albin Hermetter (*Institute of Biochemistry, Graz, Àustria*).

Mitjançant aquest mètode volíem realitzar un estudi funcional de les isoformes de l'LPL. Aquest mètode permetria conèixer si totes les isoformes presenten activitat enzimàtica i si l'activitat canvia depenent de la situació fisiològica o patològica de l'organisme, de manera que ens ajudaria a avançar en la caracterització funcional de les isoformes de l'LPL.

A continuació es detalla la tècnica emprada ja posada al punt per l'LPL com si fos un apartat de materials i mètodes i, tot seguit, es descriuen els assajos principals per a la seva posada al punt.

A) Mètode del substrat suïcida

Fonament del mètode

Aquesta tècnica és essencial per poder estudiar l'activitat dels enzims en proteomes complexos i entre les seves aplicacions podríem destacar la caracterització de l'activitat enzimàtica, el descobriment d'inhibidors enzimàtics, la visualització per imatges *in vivo* o *in vitro* de l'activitat enzimàtica o l'estudi d'aquesta activitat en relació a algunes malalties o situacions fisiològiques [265, 266].

La idea principal és poder visualitzar només la forma activa dels enzims mitjançant sondes químiques, anomenades sondes basades en activitat (ABP), que són reconegudes pel centre actiu de l'enzim com un substrat i que, quan l'enzim actua sobre ells, s'hi uneixen de forma covalent, inactivant-lo. D'aquí el nom d'SS (veure Figura 48.). Aquesta reacció és, doncs, estequiomètrica, específica i irreversible [267]. Aquestes sondes, a més, disposen d'un grup químic (sovint un fluoròfor) que és fàcil de detectar i quantificar. Es va descriure per primera vegada una ABP radioactiva contra esterases l'any 1961 [268] i, d'ençà, s'han desenvolupat un gran nombre de sondes contra diferents famílies d'enzims. Les ABP consten de 3 elements fonamentals (veure Figura 48.): (i) el *grup reactiu* (GR) que, com indica el seu nom, reacciona amb el centre actiu de l'enzim diana, (ii) l'*element de reconeixement* (ER) que és reconegut per l'enzim diana o per una família enzimàtica i (iii) l'*agent de detecció* (*tag*) que permet la visualització o reconeixement de l'enzim [264-266, 269, 270].

En el centre actiu dels enzims lipolítics o serina hidrolases es troba típicament una tríada catalítica formada per una serina, una histidina i un aspàrtic o un glutamat (Ser-His-(Asp/Glu)) [264, 266] (veure Figura 48.). La serina és nucleofílica i el seu grup reactiu és un hidroxil que, quan l'enzim és actiu, reacciona de manera covalent amb el grup reactiu de la sonda [266, 270]. En les sondes per lipases, el grup reactiu és un fosfonat i quan esdevé la reacció el producte resultant és el grup *p*-nitrofenol o fluorur [264, 266, 270]. La inhibició irreversible de l'enzim és causada pel canvi nucleofílic del grup *p*-nitrofenol de la sonda amb el centre actiu serina nucleofílic [264].

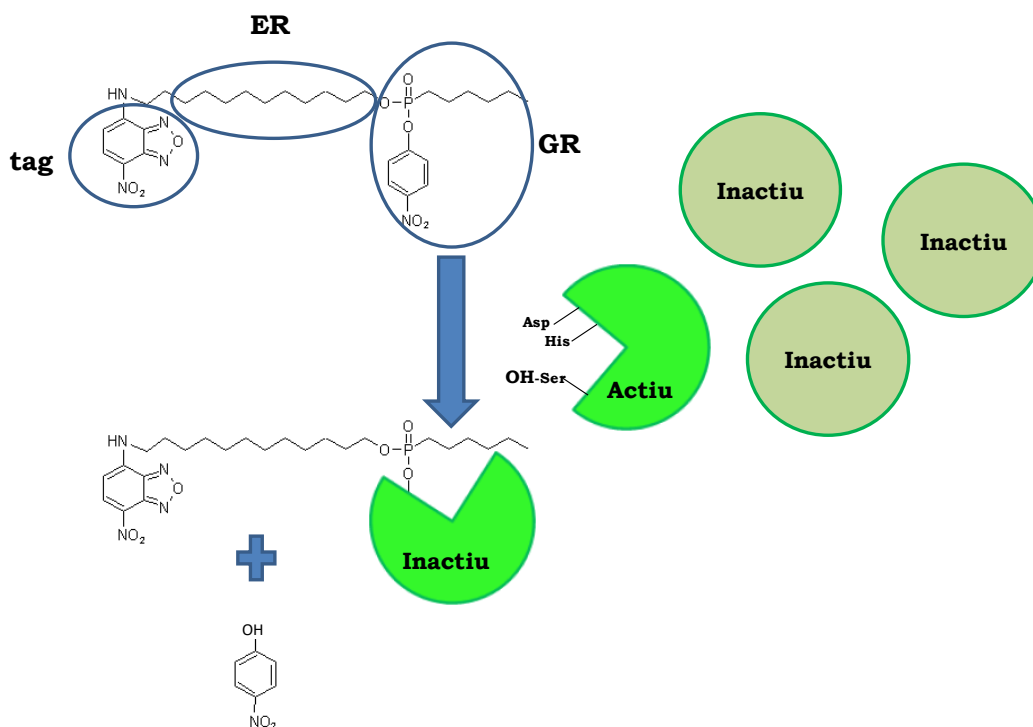


Figura 48. Esquema de la reacció d'un substrat suïcida amb un enzim serina hidrolasa. La sonda que conté el GR, l'ER i el tag fluorescent, és capturada per un enzim actiu que té exposat la tríada catalítica. Aleshores, té lloc la reacció química donant lloc a: (i) l'enzim inactivat de manera irreversible i formant una unió covalent i estable amb part de la sonda fluorescent i (ii) el producte *p*-nitrofenol del GR de la sonda. (Adaptat de Birner-Gruenberger i col. [264] i de Schicher i col. [270])

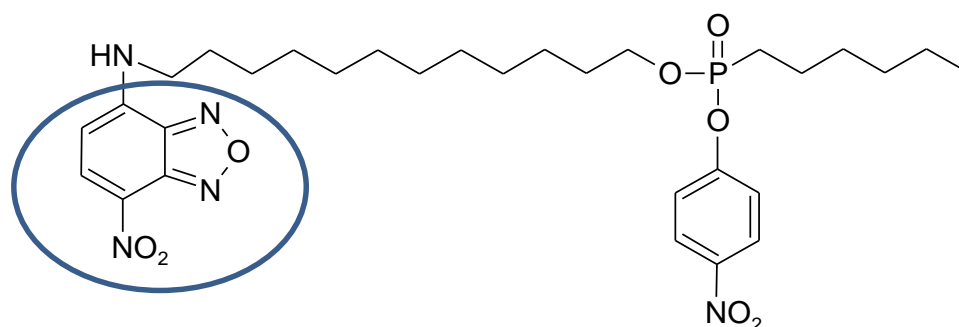


Figura 49. Estructura química de la sonda fluorescent NBD-D-HP. Sonda que reacciona amb les serina hidrolases. El tag, encerclat en blau, és l'NBD i té una λ d'excitació màxima a 488 nm i una λ d'emissió màxima a 530 nm [266, 270].

L'ABP utilitzada en aquesta tesi ha estat cedida pel Dr. Albin Hermetter i és l'NBD-D-HP (fórmula molecular C₃₀H₄₄N₅O₈P) (veure Figura 49.). És una sonda fluorescent que mimetitzava un èster d'àcid carboxílic monocatenari i que reacciona amb els enzims de la família de les lipases [270]. El *tag* fluorescent és l'NBD (N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amina) i té l'avantatge d'ésser una molècula petita i no estar carregada, de manera que no interfereix en l'isoelectrofocament que ens interessa realitzar posteriorment per tal de separar les isoformes de l'LPL. Aquest *tag* és hidrofòbic i, això, també és beneficiós pel reconeixement de la sonda per part de l'enzim lipolític ja que aquest és específic per substrats hidrofòbics [264, 266].

Reactius i aparells

La **sonda fluorescent o SS** arriba assecada en vials de vidre protegits de la llum a temperatura ambient i, en el laboratori, es fan alíquotes de 10 nmol de sonda assecada en vials de vidre de 3 mL amb tap de tefló. Aquestes alíquotes s'assequen en nitrogen gas i s'emmagatzemen protegides de la llum dins una caixa opaca a -20°C.

Aparells

- ◆ Escàner làser *Typhoon FLA 9500* (GE Healthcare) del Servei de Proteòmica de la Fundació Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

Reactius

Els tampons i solucions es van preparar amb aigua Milli-Q (Millipore):

- ◆ Cloroform (Scharlau).
 - ◆ Solució de Tritó X-100 en cloroform.
 - Tritó X-100 (Sigma) 10 mM
 - Cloroform (Scharlau)
 - ◆ TCA (Panreac). 20% (v/v)
 - ◆ Acetona (Panreac).
 - ◆ Tampó de mostres x4 (*Sample buffer*, SBx4).
 - Tris base pH=6,8 (Roche Diagnostics) 250 mM
 - Glicerol (Panreac) 40% (v/v)
 - SDS (Merck) 8% (p/v)
 - Blau de bromofenol (Sigma) traces
 - DTT (Plus One DTT, GE Healthcare) 600 mM
- NOTA: el DTT s'afegeix en el moment d'utilitzar-lo.
- ◆ Tampó de rehidratació amb IPG *buffer* (*Rehydration buffer*).
 - Urea (GE Healthcare) 7 M
 - Tiourea (GE Healthcare) 2 M

- CHAPS (Sigma) 2% (p/v)
- Blau de bromofenol (Sigma) traces
- IPG *buffer* (del mateix rang de pH que la tira)
(GE Healthcare) 0,5% (v/v)
- DTT (Plus One DTT, GE Healthcare) 18 mM
- *DeStreak* (GE Healthcare) 1,2% (v/v)

NOTA: el DTT (per les mostres) o el *DeStreak* (per les tires) s'afegeixen en el moment d'utilitzar-lo.

◆ Solució de fixació.

- Àcid acètic glacial (Panreac) 7,5% (v/v)
- Etanol absolut (Panreac) 10% (v/v)

Procediment

Preparació de la mostra

La mostra emprada consistia en l'eluit d'una cromatografia d'afinitat a HS (columna mitjana d'aproximadament 5 mL d'HS) (veure apartat 3.5), és a dir, d'LPL purificada parcialment procedent d'un homogenat de teixit de mamífer. En el perfil d'activitat LPL d'una columna mitjana típica s'observa el pic màxim d'activitat enzimàtica entre la tercera i la cinquena fracció de l'eluit. Per dur a terme l'experiment de l'SS es va utilitzar la quarta fracció de l'eluit o, si calia més volum de mostra, també es van utilitzar la tercera i/o cinquena fracció.

Tot el procediment a partir d'aquest punt es realitzava com més a les fosques millor, sobretot evitant l'ús de llum artificial (incandescent, halògena o, sobretot, fluorescent), per evitar la degradació del fluoròfor de l'SS.

Preparació de la sonda fluorescent

A la campana d'extracció de gasos, es va preparar la solució de Tritó X-100 en cloroform en un vial de vidre de 3 mL amb tap de tefló. Seguidament, es va resuspendre amb 100 µL de cloroform un vial de vidre de 3 mL amb tap de tefló que contenia 10 nmol d'SS assecats amb nitrogen gas i, tot seguit per evitar la ràpida evaporació del cloroform, es van afegir 100 µL de la solució de tritó. Es va vortejar el vial i es va assecar amb nitrogen gas. Es va mantenir el vial protegit de la llum i a temperatura ambient fins el moment d'inici de la incubació amb la mostra.

Assaig

a) Elució de la mostra

- Un cop es va tenir preparada la sonda es va començar a passar el tampó d'eluit d'1,50 M NaCl per la columna d'HS on, el dia anterior, va ser passat l'homogenat de la mostra a analitzar i el tampó de rentat de 0,75 M NaCl. La cromatografia d'afinitat es va realitzar en dos dies pel fet que l'experiment de l'SS, comptant des del moment

de la preparació de la sonda fins al final, té una durada aproximada de 12 hores. Per això, es va deixar durant la nit l'LPL unida a l'HS on la seva activitat es manté estable.

b) Incubació amb la sonda

- Un cop va eluir la quarta fracció, es va mantenir en gel a 4°C i, ràpidament, per evitar la disminució de l'activitat LPL, 1 mL d'aquesta fracció es va afegir al vial de la sonda fluorescent preparat amb antelació (veure apartat Preparació de la sonda fluorescent).
- Es va vortejar i, protegit de la llum, es va incubar durant 1 h a 25°C en un bany d'aigua.

c) Precipitació proteïnes

- Després de la incubació, i mantenint a partir d'ara la mostra sempre en gel, es va traspasar la mostra a un tub *Eppendorf* de 2 mL i es va procedir a precipitar les proteïnes amb TCA fred (4°C) gota a gota sobre la mostra amb agitació moderada. Es va aplicar el volum necessari de TCA al 20% per tal de que la proporció de mostra i TCA 20% fos 3:1 (v:v), és a dir, tenint al final el TCA al 5% (p/v). Aquest és un pas crític i s'ha de ser especialment curós.
- El tub *Eppendorf* es va col·locar en un orbital vertical durant 1 h a 4°C.
- Es va centrifugar (16.000 g, 10 minuts, 4°C) i es va descartar el sobrenedant. S'ha de tenir en compte que moltes vegades, per la poca quantitat de proteïna precipitada, no es visualitza cap precipitat (*pellet*) en el tub. Una manera senzilla de saber on es situa aquest *pellet* invisible en el tub *Eppendorf* és centrifugar el tub sempre seguint la mateixa orientació en referència al centre del rotor. Per tant, es recomana especial cura en les successives retirades de sobrenedant situant la punta de la pipeta a l'extrem contrari del *pellet*.
- Es van fer dos rentats amb 1 mL de TCA fred (5% p/v), per eliminar restes de sals, centrifugant (16.000 g, 5 minuts, 4°C) i eliminant el sobrenedant després de cada rentat.
- Finalment, es va fer un últim rentat amb acetona freda (-20°C), per eliminar les restes de TCA, centrifugant (16.000 g, 1 minut, 4°C) i després d'eliminar el sobrenedant es va deixar assecar el precipitat amb el tap del tub obert a la campana d'extracció de gasos i a temperatura ambient uns 5 minuts.
- Per acabar, el precipitat es va resolubilitzar amb 50 µL de tampó SBx4 (1DE) o de tampó de rehidratació (2DE) amb DTT i es va sonicar alternant 5 segons de sonicació en fred (amplitud 30%, sonicador UPH100, Hielscher Ultrasonics) i 5 segons de repòs en fred repetint el cicle 6 vegades.

d) Desenvolupament 1DE o 2DE

- Arribats a aquest punt i un cop es té precipitada la proteïna de la mostra, el procediment era el mateix que es segueix en qualsevol 1DE o 2DE (veure apartats 3.7.1 i 3.7.2). L'única precaució que calia prendre era la protecció lumínica de la mostra el màxim possible

durant tot el procés, ja fos evitant l'ús de llum artificial o utilitzant paper d'alumini o tapes opaques.

e) Fixació proteïnes i detecció fluorescència

- Tant si es va realitzar 1DE o 2DE al final s'obtenia un gel de poliacrilamida amb les proteïnes separades segons el seu MW aparent i, en el cas de la 2DE també separades segons el seu pI. Es van fixar les proteïnes al gel amb 100 mL de solució de fixació en un recipient de vidre hermètic i es va deixar a temperatura ambient i protegit de la llum fins al moment de la lectura.
- Finalment, el gel va ser escanejat a una resolució de 100 μm amb l'escàner làser. La detecció de la fluorescència de l'NBD es va dur a terme utilitzant una λ d'excitació a 473 nm i una λ d'emissió a 532 nm.

B) Adaptació del mètode del substrat suïcida

- Aplicació de la tècnica en homogenats de teixits

Primer assaig

Partint dels experiments d'Hermetter [269] es va realitzar un primer assaig del mètode de l'SS aplicat a homogenats de diversos teixits: cor, fetge i eWAT de rata mascle i llet humana (veure Figura 50.). Es va realitzar una 1DE i es va visualitzar amb l'escàner làser *Fujifilm Luminescent image analyzer 3000 (LAS-3000)* del Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia (Universitat de Barcelona). Aquest aparell no té una gran sensibilitat però per una primera aproximació al mètode era suficient.

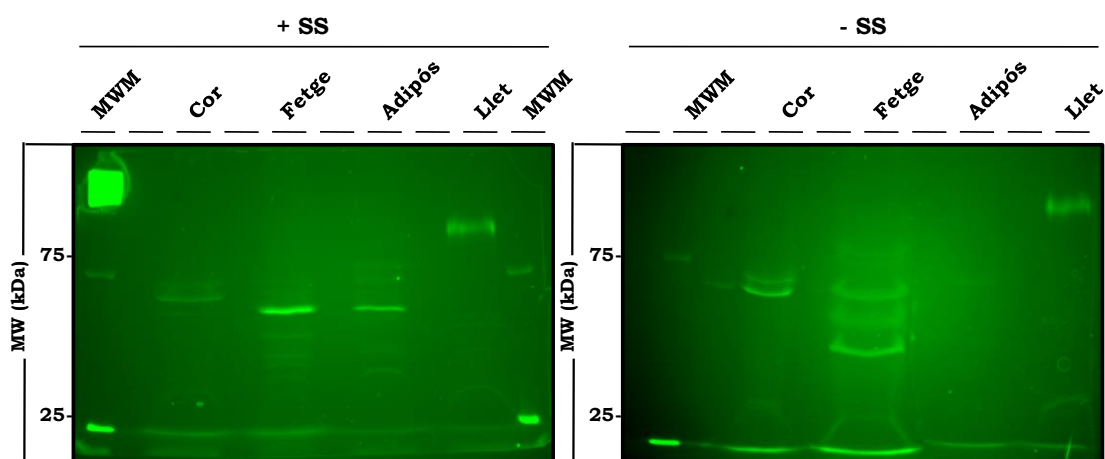


Figura 50. Aplicació de la tècnica del substrat suïcida per a lipases en homogenats de teixit. 1DE de diversos teixits de rata mascle i de llet humana incubats en presència d'SS (+SS) o no (-SS) per a lipases. La incubació, amb o sense SS, va ser a 37°C i durant 2 h sota protecció lumínica. Fluorescència visualitzada amb l'escàner làser *LAS-3000* utilitzant un làser blau (λ 470 nm) i un filtre 510DF10 per a llum blava. Totes les mostres segueixen la relació següent: per cada 50 μg de proteïna s'incuba amb 0,5 nmol de sonda fluorescent. MWM, patró de pesos moleculars. MW = Pes molecular aparent.

Val a dir que les proteïnes que es puguin visualitzar en un homogenat de teixit (tant pel mètode de l'SS, com per WB o per Tinció amb plata) seran les majoritàries en aquell teixit, les minoritàries (com l'LPL) no es podran visualitzar a no ser que s'enriqueixi la mostra per una o unes proteïnes determinades utilitzant, per exemple, una cromatografia d'afinitat o d'exclusió.

En el primer assaig els homogenats van ser incubats 2 hores a 37°C amb l'SS (veure imatge esquerra Figura 50.), i les bandes que s'observen poden ser lipases que romanien actives en l'homogenat en el moment de la incubació o proteïnes amb autofluorescència. En aquest mateix primer assaig (veure imatge dreta Figura 50.), els homogenats també van ser incubats sense SS i, les bandes que s'observen, són només l'autofluorescència de les proteïnes dels homogenats.

Si s'analitzen les bandes teixit per teixit s'observa que: (i) els homogenats de cor i de llet no tenen lipases majoritàries actives ja que sense SS s'observen les mateixes bandes que amb la presència de l'SS, (ii) l'homogenat de fetge conté moltes proteïnes amb autofluorescència però hi ha una lipasa majoritària activa i autofluorescent alhora que es pot visualitzar de manera molt marcada amb l'SS i que, en canvi, sense l'SS la seva intensitat lumínica és molt menor i equiparable a les altres proteïnes autofluorescents, i (iii) l'homogenat d'adipós no té proteïnes autofluorescents però sí una lipasa majoritària activa sense autofluorescència.

El marcador de MW (MWM) conté dues proteïnes amb autofluorescència, a 25 i 75 kDa, que es poden visualitzar a la mateixa longitud d'ona d'emissió i excitació que el *tag* de la nostra sonda. També es pot observar en la part superior del primer carril de l'MWM del gel incubat amb SS un quadrat fluorescent. Es tracta d'un paper Whatmann de 0,5 x 0,5 cm amb 1 µL de sonda en cloroform i tritó col·locat directament a sobre del gel en el moment de la visualització en l'escàner làser. Es va utilitzar com a control positiu de la fluorescència de la sonda.

Amb aquest primer assaig es va poder: (i) testar la sonda fluorescent cedida pel Dr. Hermetter i (ii) reproduir el mètode en el nostre laboratori.

Per poder aplicar aquest mètode a l'LPL calien fer alguns canvis en el procediment. És conegut que un cop s'elueix l'LPL de la columna d'HS aquesta té una activitat elevada però que decau en qüestió de minuts si no s'estabilitza amb alguna proteïna (com ara BSA 1 mg/mL, concentració final) [201]. També es coneix que el NaCl disminueix l'activitat LPL de manera que a concentracions superiors a 2,5 M l'activitat pot quedar inhibida [271]. Com ja s'ha explicat amb anterioritat (veure apartat 3.4), al valorar l'activitat LPL pel mètode radioquímic cal estabilitzar-la amb BSA. En la incubació del substrat amb l'LPL en el mètode radioquímic la concentració final de NaCl és de 0,16 M. Per estudiar l'activitat LPL pel mètode de l'SS s'utilitzarien les fraccions eluïdes de la columna d'HS que es troben a una concentració d'1,50 M d'NaCl.

Segon assaig

Es plantejà un segon assaig (veure Figura 51.), per estudiar d'una banda l'estabilitat de l'activitat lipolítica de les lipases en tampó d'eluït de columna d'HS (NaCl 1,50 M i 30% glicerol) diluït 1/3 pel mètode de l'SS i de l'altra estudiar l'activitat esterasa de la BSA [272-274]. S'utilitzà eWAT en comptes d'rWAT per reservar aquest teixit per a les proves finals.

El primer objectiu d'aquest segon assaig era comprovar si l'SS continuava essent tan eficient per detectar l'acció lipolítica de les lipases en aquestes condicions. Com s'observa en la imatge de fluorescència de la Figura 51., tant en absència com en presència de tampó d'eluït diluït 1/3, si s'incuba amb l'SS es veu una banda que correspon a alguna lipasa majoritària activa. Aquest fet demostra que el tampó d'eluït a una concentració de sals superior a la del mètode radioquímic (0,16 M en el radioquímic i 0,50 M en el de l'SS) no interfereix en l'acció lipolítica de les lipases. Es torna a repetir en aquest experiment el mateix resultat a l'observat en el primer assaig (veure Figura 50.), el teixit adipós no conté proteïnes autofluorescents ja que sense la incubació amb l'SS no es visualitza cap banda.

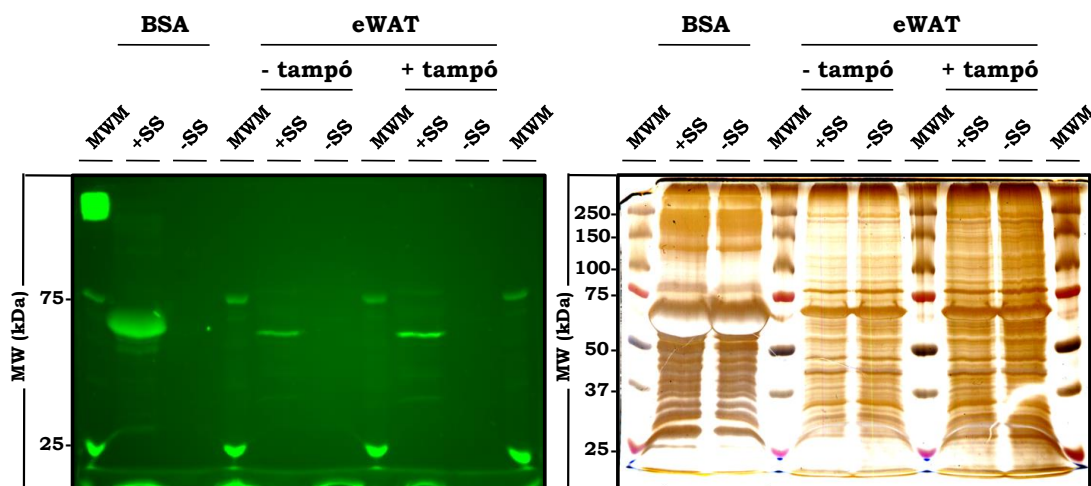


Figura 51. Estudi de l'activitat esterasa de la BSA i de l'estabilitat de l'activitat lipolítica de les lipases en tampó d'eluïts de cromatografia d'afinitat d'heparina-Sepharose pel mètode del substrat suïcida. 1DE de BSA (100 µg) i d'homogenat d'eWAT de rata (100 µg) incubats amb (+) i sense (-) SS, a 37°C i 2 h sota protecció lumínica, i, en el cas de l'eWAT també amb (+) i sense (-) tampó d'eluït (concentració final 0,50M NaCl i 10% glicerol). La imatge de l'esquerra ens mostra la fluorescència del gel (visualitzada amb l'escàner làser LAS-3000 utilitzant un làser blau (λ 470 nm) i un filtre 510DF10 per llum blava) i la imatge de la dreta és el mateix gel tenyit posteriorment amb plata. En tots els casos, per cada 50 µg de proteïna s'incuba amb 0,5 nmol de sonda fluorescent. MWM, patró de pesos moleculars. MW = Pes molecular aparent.

Segons la bibliografia [272-274], la BSA té activitat esterasa i, per aquest motiu, en el mateix experiment s'estudià un segon objectiu: si la BSA podria actuar sobre l'SS. Es van carregar 100 µg de BSA per carril tenint en compte que: (i) en una alíquota de l'eluït de columna d'HS s'hi afegixen 50 µg de BSA per estabilitzar l'activitat LPL i poder-la valorar i, (ii) si es necessités coprecipitar la BSA amb mostra procedent d'eluït de columna

d'HS per realitzar una 2DE, com a màxim, la quantitat de BSA hauria de ser 125 µg (per tira d'IEF es carreguen un màxim de 300 µg de proteïna). Com es veu en la imatge de fluorescència de la Figura 51. l'acció esterasa de la BSA actua sobre l'SS donat que es veu una banda en el carril de la incubació amb SS. També s'observa que la BSA no té autofluorescència perquè no hi ha cap senyal en el carril de la incubació sense SS.

Després de la visualització per l'escàner làser es va procedir a tenyir les proteïnes del gel amb plata (veure apartat 3.7.3) i el resultat és el que s'observa a la imatge del gel tenyit de la Figura 51.. Aquesta tinció, serveix com a control de l'assaig ja que permet detectar si hi ha hagut algun problema amb la precipitació d'alguna mostra o bé aquesta no ha migrat bé en el gel durant l'SDS-PAGE. Com s'observa en la imatge totes les mostres es van precipitar de manera correcta i en els carrils sense incubar amb l'SS (on per fluorescència no es visualitzava res) apareixen les mateixes bandes que en els seus carrils homòlegs incubats amb SS.

Amb aquest segon assaig s'obtenen dues conclusions importants per l'adaptació del mètode: (i) es poden incubar amb SS les fraccions eluïdes de la cromatografia d'afinitat a HS amb el tampó d'eluït diluït 1/3 i (ii) no és possible afegir BSA per estabilitzar l'activitat LPL en les fraccions eluïdes per dos motius principals. El primer és que la BSA al reaccionar també amb l'SS faria que disminuís la concentració d'SS per l'LPL i el segon és que no es podria realitzar una 1DE ja que la BSA i l'LPL tenen un MW aparent similar i no es podrien diferenciar les dues bandes fluorescentes en un mateix carril.

Tercer assaig

Aleshores, es plantejà un tercer assaig per estudiar l'activitat LPL pel mètode radioquímic a concentracions creixents de NaCl (de 0,16 a 1,50 M) (veure Figura 52.) per esbrinar si hi havia prou activitat a les fraccions eluïdes a 1,50 M NaCl o era imprescindible diluir-les (tenint en compte que amb el mètode de l'SS la mostra estaria a aquesta mateixa concentració de sals). Per posar al punt el mètode es va decidir utilitzar rWAT de rata mascle ja que era el teixit en el qual s'aplicaria en una situació patològica (l'obesitat) en aquesta tesi. La mostra utilitzada va ser, doncs, LPL d'rWAT de rata parcialment purificada mitjançant cromatografia d'afinitat a HS.

En el mateix experiment s'estabilitzà o no la mostra amb BSA per estudiar si, en absència de BSA, l'activitat dequeia molt des que l'LPL eluïa de la columna i es començava la incubació amb el substrat (aproximadament uns 15 minuts mantenint sempre la mostra a 4°C).

A la Figura 52. es pot veure que l'activitat LPL de les dues fraccions (3 i 4) de l'eluït de la columna d'HS analitzades disminueix a mesura que s'augmenta la concentració de NaCl, tant en presència com en absència de BSA. No obstant, l'activitat LPL a la concentració de NaCl 1,50 M és prou elevada per preveure un bon funcionament del mètode de l'SS. També es demostra que l'activitat LPL decau molt ràpid en el temps (en 15 minuts aproximadament un 26%) si no és estabilitzada amb BSA tal i com està descrit en la bibliografia [201].

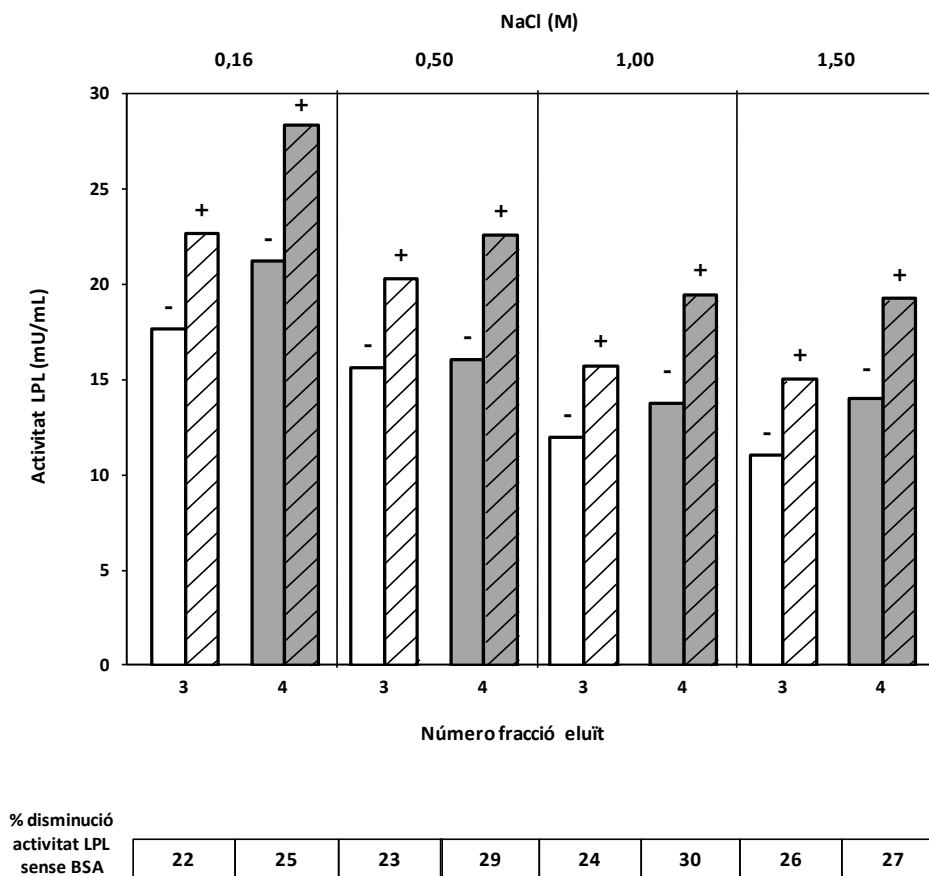


Figura 52. Estudi de l'activitat LPL en eluït de cromatografia d'afinitat d'heparina-Sepharose a concentracions creixents d'NaCl i en absència o presència de BSA. Mostra semipurificada mitjançant columna d'HS d'WAT de rata mascle. Les barres blanques són la tercera fracció eluïda i les barres grises la quarta. S'incubà en absència (-, barres llises) o en presència (+, barres ratllades) de BSA (1 mg/mL). La disminució de l'activitat LPL (mètode radioquímic) sense BSA respecte amb BSA representa una mitjana del 26%.

D'aquest tercer assaig es conclou: (i) que es pot realitzar la incubació amb l'SS a 1,50 M NaCl sense que l'activitat LPL es vegi molt compromesa i (ii) que si bé l'absència de BSA fa disminuir una quarta part l'activitat LPL total en només uns 15 minuts, seria una pèrdua assumible perquè encara es continuaria tenint una activitat LPL important (més de 10 mU/mL).

➤ Adaptació de la tècnica als eluïts de cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose (LPL purificada parcialment)

Com s'ha descrit a l'apartat 3.4, la incubació amb el substrat radioactiu per a la mesura de l'activitat LPL és de 30 minuts a 25°C. El mètode original de l'SS recomana una incubació dels homogenats de teixit amb la sonda de 2 hores a 37°C [269]. Es van fer proves d'incubació a diferents temps (30 minuts i 2 hores) i temperatures (25 o 37°C) amb el substrat radioactiu i l'LPL (dades no mostrades). L'activitat LPL disminuïa un 80% si incubàvem en les condicions del mètode de l'SS (2 hores i 37°C), més d'un 50% si incubàvem durant 30 minuts però augmentàvem la temperatura a 37°C i més d'un 60% si incubàvem durant 2 hores però

mantenint els 25°C. Es va decidir que per adaptar la tècnica de l'SS a l'LPL la temperatura no podia ser superior a 25°C i el temps d'incubació seria d'1 hora.

Es va canviar l'aparell de detecció/visualització de la fluorescència per un altre més sensible i amb possibilitat d'ajustar la resolució de l'escaneig i la potència lumínica del làser. El canvi va ser del LAS-3000 al *Typhoon FLA 9500* del Programa d'Epigenètica i Biologia del Càncer (PEBC) de la Fundació Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) a l'Hospital Duran i Reynals (Institut Català d'Oncologia, ICO).

Detecció d'LPL activa mitjançant SS en 1DE

Es va aplicar el mètode de l'SS adaptat a l'LPL (veure apartat 4.3.2.1 A) per detectar l'LPL activa en 1DE (veure Figura 53.).

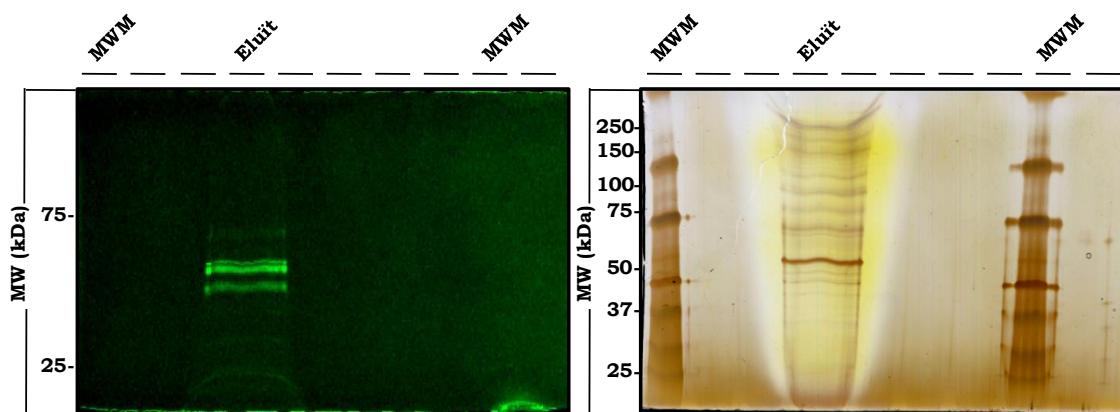


Figura 53. Detecció de l'LPL mitjançant substrat suïcida. 1DE de l'LPL (29 mU) parcialment purificada d'rWAT de rata mascle incubada amb substrat suïcida (10 nmol), a 25°C i 1 h sota protecció lumínica. La imatge de l'esquerra ens mostra la fluorescència del gel (visualitzada amb l'escàner làser *Typhoon FLA 9500*, λ d'excitació a 473 nm i d'emissió a 532 nm) i la imatge de la dreta és el mateix gel tenyit posteriorment amb plata. MWM, patró de pesos moleculars. MW = Pes molecular aparent.

Es va realitzar l'experiment amb LPL parcialment purificada (veure apartat 3.5) provinent d'rWAT de rata mascle. El Dr. Hermetter i col·laboradors feien servir 50 μ g de proteïna total i 0,5 nmol d'ABP en 50 μ L de volum final, representant una concentració final de proteïna d'1 mg/mL [269]. En 1 mL d'eluït de columna d'rWAT vam quantificar, aproximadament, 75 μ g de proteïna total, és a dir, una concentració final de 0,075 mg/mL. Es va decidir augmentar fins a 20 vegades més la quantitat d'ABP (10 nmol) perquè hi havia menys concentració de proteïna total en un volum final 20 vegades superior (de 50 μ L a 1 mL). En la imatge de fluorescència de la Figura 53. s'observa en el carril de l'eluït de la columna una doble banda que correspon a l'LPL (banda superior d'uns 56 kDa) i a alguna altra lipasa molt probablement (banda inferior de menys de 50 kDa). Com s'observa al carril de l'eluït tenyit posteriorment amb plata, a la mostra coexisteixen més proteïnes a part de l'LPL, això és el que s'espera després d'una purificació parcial, un enriquiment de la proteïna d'interès respecte les altres.

Detecció d'isoformes de pI de LPL actives mitjançant SS en 2DE

Amb aquest darrer experiment es considerarà finalitzada l'adaptació del mètode de l'SS al nostre enzim d'interès, l'LPL.

Per determinar possibles diferències d'activitat entre isoformes es va procedir a detectar les possibles isoformes de pI de l'LPL actives mitjançant SS i 2DE (veure Figura 54.). L'experiment es va realitzar amb LPL parcialment purificada provinent d'rWAT de rata mascle. S'observen, per primer cop, en la imatge de l'esquerra de la Figura 54. i encerclades en vermell 5 isoformes de pI de l'LPL actives. Típicament, en una 2DE-WB de teixits de rata [180], macaco [181] o d'humans [202] s'observen un mínim de 7 isoformes. Es podria pensar que les que resten són inactives i per això no es visualitzen amb l'SS però si s'observa la imatge de la dreta, és el mateix gel i les proteïnes estan tenyides posteriorment amb plata, es veuen enfocades únicament 5 isoformes. Aquest fet indica que en aquesta 2DE-SS s'han enfocat 5 isoformes de pI de l'LPL i no informa si les que resten són actives o no. Per experiències prèvies a aquesta tesi, es coneix que les isoformes amb un pI més àcid (inferior a 7) són més difícils d'enfocar probablement perquè la seva abundància relativa respecte al conjunt de les isoformes és menor.

També s'observen en la imatge de fluorescència altres lipases actives, dues a la part més àcida (pH 6,5-7) i de menys MW que l'LPL (coincidentes amb la banda de menys de 50 kDa observada en la 1DE de la Figura 53.), que podrien servir com a control intern de la tècnica en 2DE-SS d'rWAT de rata mascle. Aquestes lipases podrien ser la glicoproteïna lipasa àcida lisosomal (LAL) ja que estan descrites dues isoformes amb uns MW aparents d'aproximadament 41 i 46 kDa cadascuna, i el seu pI es situen sobre 6,30 en rata [275]. A més, està descrit que, a part de l'activitat lipasa, també té activitat esterasa [276].

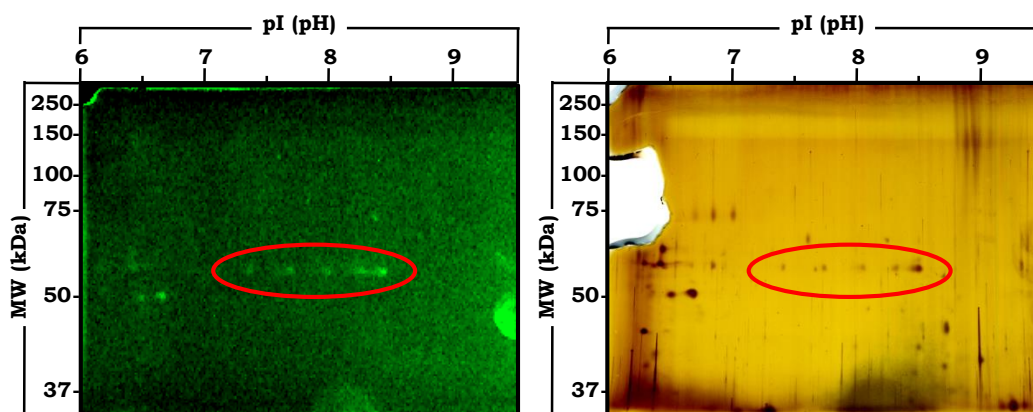


Figura 54. Detecció d'isoformes de pI de l'LPL mitjançant substrat suïcida. 2DE de l'LPL (40 mU) parcialment purificada d'rWAT de rata mascle incubada amb substrat suïcida (10 nmol), a 25°C i 1 h sota protecció lumínica. La imatge de l'esquerra ens mostra la fluorescència del gel (visualitzada amb l'escàner làser *Typhoon FLA 9500*, λ d'excitació a 473 nm i d'emissió a 532 nm) i la imatge de la dreta és el mateix gel tenyit posteriorment amb plata. Les isoformes de l'LPL estan encerclades en vermell. MW = Pes molecular aparent.

Comprovació de l'autofluorescència de l'LPL en 2DE

Per comprovar que les isoformes són actives i que la imatge visualitzada no és producte d'autofluorescència de les mateixes, es va procedir a repetir l'experiment amb les mateixes condicions però en la incubació no es va afegir l'SS (veure Figura 55.). En la imatge de l'esquerra de la Figura 55. no s'observa fluorescència de cap isoforma de pI de l'LPL ni cap altra lipasa. En canvi, en la imatge de la dreta de la mateixa figura, s'observa el mateix gel tenyit amb plata amb la zona on es troben les isoformes de pI de l'LPL encerclada en vermell. També s'observen les dues lipases que en l'anterior experiment van ser establertes com a control intern (veure Figura 54.). Per tant, es pot confirmar que la fluorescència de les isoformes de pI de l'LPL, incubades amb SS, es deu a la seva activitat i no a una autofluorescència de les mateixes.

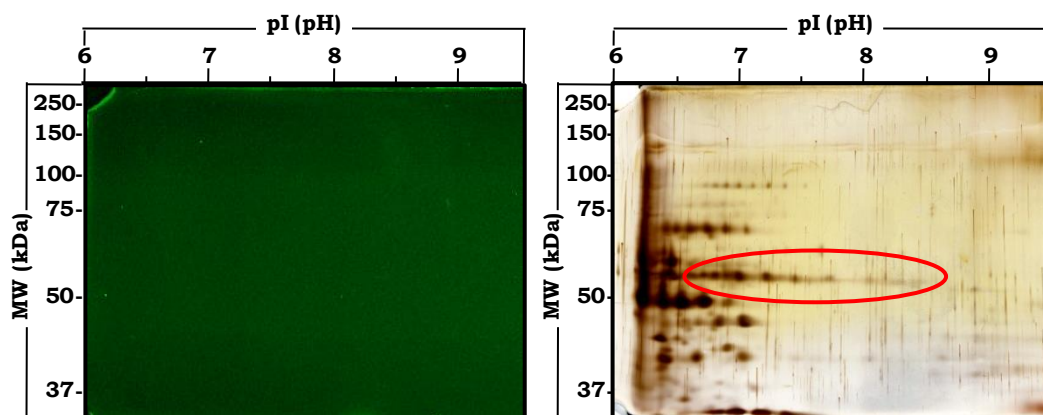


Figura 55. Estudi de l'autofluorescència de les isoformes de pI de l'LPL mitjançant substrat suïcida. 2DE de l'LPL (50 mU) parcialment purificada d'rWAT de rata mascle incubada **sense** substrat suïcida, a 25°C i 1 h sota protecció lumínica. La imatge de l'esquerra ens mostra la fluorescència del gel (visualitzada amb l'escàner làser *Typhoon FLA 9500*, λ d'excitació a 473 nm i d'emissió a 532 nm) i la imatge de la dreta és el mateix gel tenyit posteriorment amb plata. Les isoformes de l'LPL estan encerclades en vermell. MW = Pes molecular aparent.

Comprovació de la no interferència del mètode de l'SS en les isoformes de pI de l'LPL

Un últim experiment de comprovació d'eficàcia de la tècnica va ser dut a terme en la tesi de Pere Carulla [181]. Es tractava de comprovar que la tècnica de l'SS no interferia en la detecció de les isoformes de pI de l'LPL tenint en compte la incubació de la mostra amb l'SS i la pròpia unió de l'SS a l'LPL. Per fer-ho, es va utilitzar mostra (vWAT de macaco) procedent d'una única purificació parcial de l'LPL mitjançant HS. Aquesta mostra es va dividir en tres submostres:

- 1) va seguir tot el procés de la tècnica excepte que no es va incloure SS en la incubació i la detecció es va fer mitjançant WB
- 2) es va incubar amb SS però la detecció de les isoformes de pI es va fer mitjançant WB

3) es va incubar amb SS i es van detectar les isoformes mitjançant l'escàner de fluorescència (visualització d'activitat lipolítica).

Els resultats van evidenciar que si comparàvem les dues immunodeteccions les isoformes de pI detectades eren les mateixes, el seu patró era idèntic. Per tant, ni la incubació de la mostra amb l'SS ni tots els passos seguits en la tècnica emprada modificava les característiques d'aquestes isoformes (ni el seu MW aparent ni el seu pI). Comparant les mostres incubades amb SS però detectades per WB o per activitat lipolítica, es va corroborar el fet comentat anteriorment (veure Figura 54.): totes les isoformes de pI de l'LPL són actives, ja que es pot comptar el mateix nombre d'isoformes en ambdós experiments.

La principal conclusió que es pot extreure d'aquesta adaptació de la tècnica de l'SS és que hem comprovat que totes les isoformes de pI de l'LPL són actives, tal i com es postulava segons la teoria de la tècnica de la cromatografia d'afinitat a HS en la que es separa l'LPL monomèrica (inactiva) de la dimèrica (activa) [277].

4.3.2.2 Estudi de les isoformes d'LPL en l'obesitat mòrbida

Un cop posat al punt el mètode de l'SS, ens vàrem centrar en la comprovació de l'existència de les possibles isoformes de pI de l'LPL en l'scWAT d'humanes i, al mateix temps, vàrem iniciar l'estudi indirecte d'aproximació per la caracterització funcional de les isoformes aprofitant el paper clau de l'LPL en l'obesitat.

Vàrem realitzar la purificació parcial de l'LPL mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. En la Figura 56. podem veure el resultat de la purificació parcial. En (A) tenim representada l'activitat LPL de l'scWAT de les dones controls i en (B) el de les dones obesas. En ambdues representacions gràfiques veiem un pic molt petit d'activitat LPL, lleugerament superior en les dones obesas (un pic màxim d'11 mU/mL les dones control i de 17 mU/mL les obesas). L'activitat LPL per gram de teixit de l'homogenat era de 72 mU/g tx en les dones control i 15 mU/g tx en les obesas.

Com que els nivells d'activitat LPL no eren molt elevats en cap de les dues purificacions parcials (scWAT de dones control i obesas) malgrat haver carregat una quantitat de mostra elevada (67g d'scWAT en ambdós casos) vàrem decidir:

- i) en el cas de les dones control fer el *pool* de les tres fraccions amb més activitat LPL i prioritzar una 2DE-WB (vàrem deixar la quarta fracció amb més activitat reservada per fer una 2DE-SS)
- ii) en el cas de les dones obesas fer el *pool* de les dues fraccions amb més activitat LPL i prioritzar una 2DE-SS (vàrem deixar les següents dues fraccions amb més activitat LPL per fer una 2DE-WB).

L'estratègia va ser diferent en ambdós casos per tal d'assegurar-nos poder disposar d'alguna evidència en forma d'imatge de les isoformes de pI de l'LPL de l'scWAT.

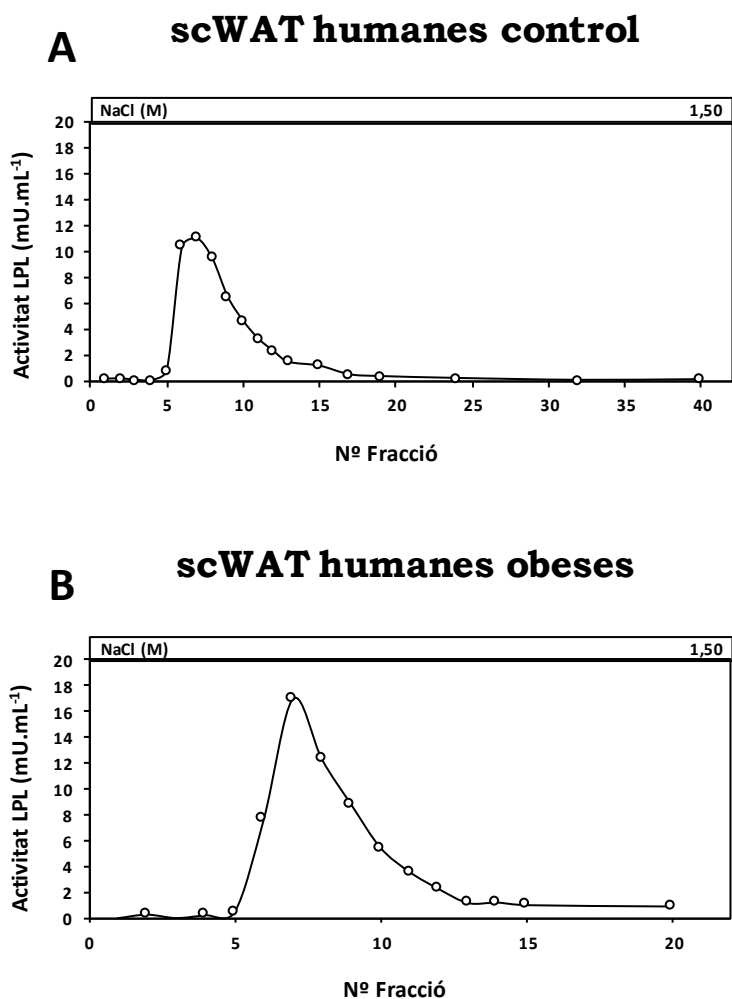


Figura 56. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc subcutani de dones control (A) i obeses (B) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose. Les fraccions van ser recollides després d'un increment esglaonat de la concentració de NaCl (0,75 M i 1,50 M). Al gràfic es representa l'eluit a 1,50 M, mostrant l'activitat LPL de les fraccions. En ambdues purificacions parcials d'LPL s'ha utilitzat 67 g d'scWAT, extret de lipopectomies en el cas de les dones control (n=4) i d'operacions de cirurgia bariàtrica en el cas de les dones obeses (n=2).

En la Figura 57. (A i B) observem el resultat de les 2DE-WB. En (A) veiem cinc isoformes de pI de l'LPL d'scWAT de les dones control amb un pI d'entre 7,20 i 8,40. En (B) observem dues isoformes de pI de l'LPL d'scWAT de les dones obeses. No aconseguim veure més isoformes de pI probablement per la poca activitat carregada en cada 2DE-WB o bé, per la dificultat d'enfocar isoformes d'scWAT. En la mateixa Figura 57. (C i D) observem el resultat de les 2DE-SS realitzades amb les fraccions de cada purificació parcial. Aconseguim veure un total de cinc isoformes de pI de l'LPL en el cas de l'scWAT de les dones control (C) (mateix nombre que per WB) i tres isoformes de pI en el cas de les dones obeses (D) (una isoforma més que per WB). Les possibles isoformes de pI restants no les podem observar probablement pel fons (molt fluorescent) o bé, per la poca activitat carregada a cada 2DE-SS. Vàrem tenyir els gels de les 2DE-SS amb plata i, com observem a (E) i (F), com a mínim hi ha el mateix nombre d'isoformes de pI de l'LPL que a les 2DE-SS.

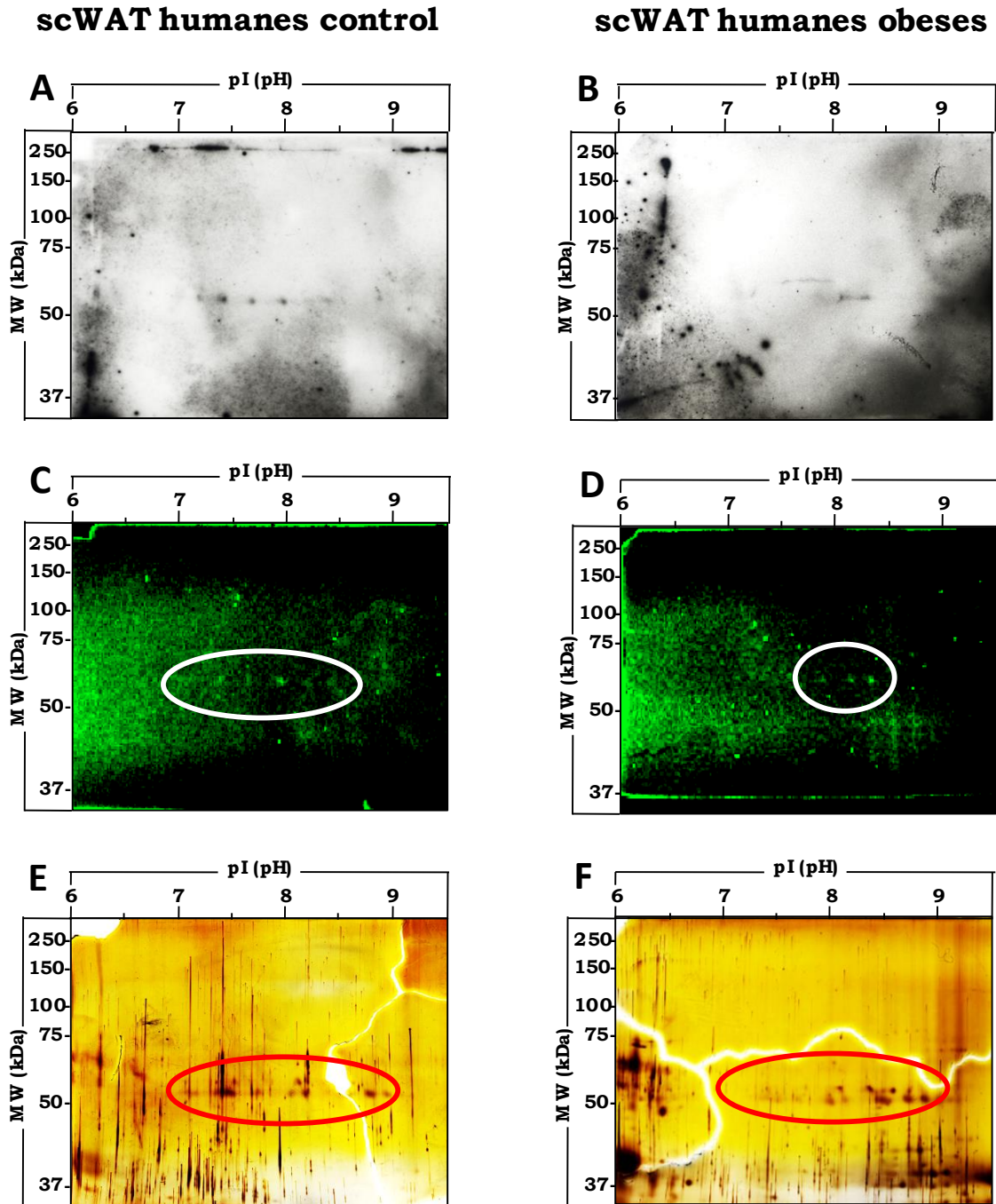


Figura 57. Detecció d'isoformes de pI de l'LPL de teixit adipós blanc subcutani d'humans control i obesos mitjançant Western blot, substrat suïcida i tinció amb plata. (A i B) 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2) de l'LPL purificada parcialment d'scWAT de dones control (A) (53 mU) i obeses (B) (28 mU). (C i D) 2DE-SS de l'LPL purificada parcialment d'scWAT de dones control (C) (18 mU) i obeses (D) (50 mU) incubada amb SS (10 nmol), a 25°C i 1 h sota protecció lumínica (encerclada en blanc la zona on trobem les isoformes de pI de l'LPL). La fluorescència del gel és visualitzada amb l'escàner làser Typhoon FLA 9500 (λ d'excitació a 473 nm i d'emissió a 532 nm). (E i F) Tinció amb plata del mateix gel de la 2DE-SS respectivament per dones control (E) i obeses (F) (encerclada en vermell la zona on trobem les isoformes de pI de l'LPL). Per a la primera dimensió, es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. Dones control n=4, dones obeses n=2. MW = Pes molecular aparent.

Malgrat que els resultats del WB no eren gaire aclaridors vàrem generar el patró (veure 3.9) de les isoformes de pI de l'LPL de l'scWAT de les dones control i de les obeses (veure Figura 58.). En les dones control la isoforma de pI més abundant (un 30% de la quantitat total d'LPL) té un pI neutre de 7,40 i un MW aparent de 56,2 kDa. En les dones obeses ambdues isoformes de pI observades tenen la mateixa quantitat relativa d'LPL i un pI bàsic (8,15 i 8,35) amb un MW aparent de 56,2 kDa. Aquests resultats suggereixen un desplaçament de les isoformes cap al rang bàsic de pH en l'obesitat.

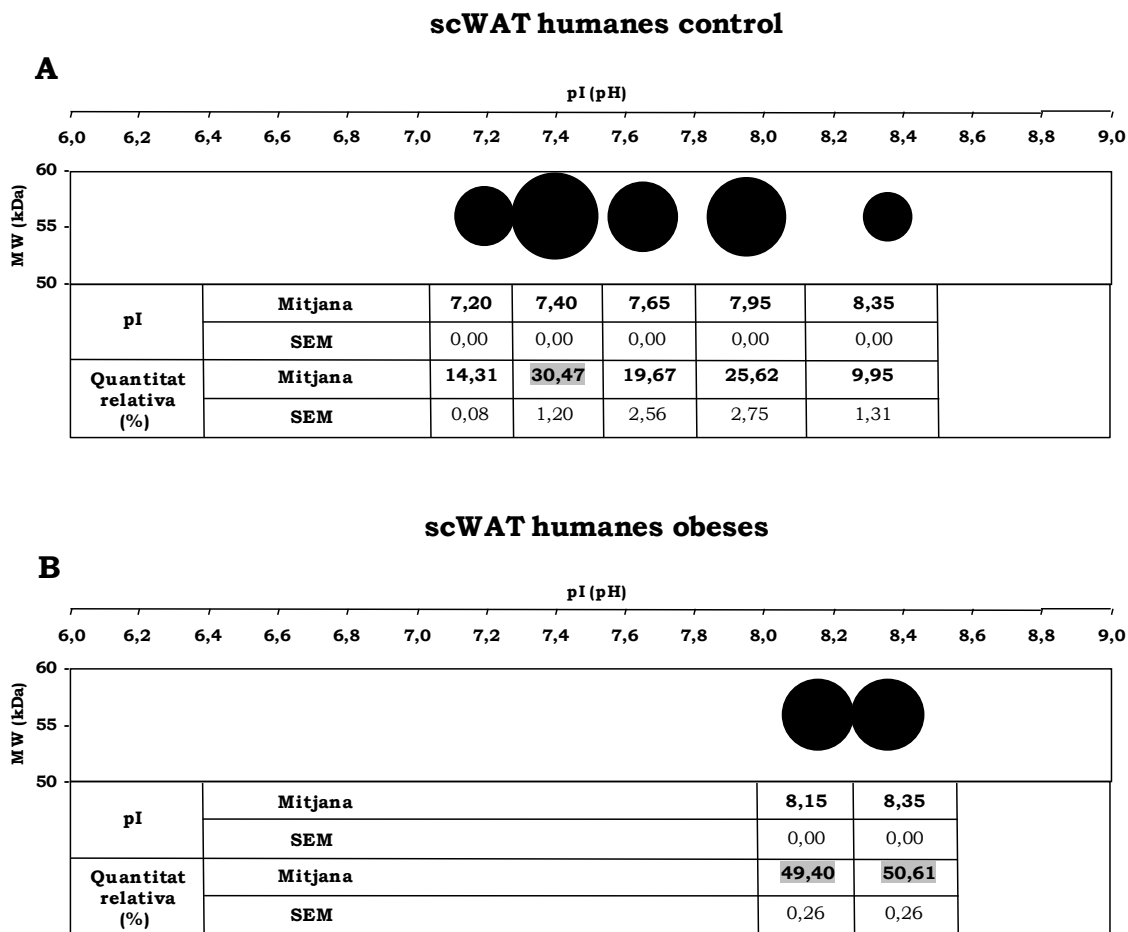


Figura 58. pI, pes molecular i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL trobades en el teixit adipós blanc subcutani de dones control (A) i obeses (B) (relacionada amb la Figura 57.). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 5 isoformes; B, total 2 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb el seu pI i el seu MW. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques de l'scWAT d'humanes control i de 2 rèpliques tècniques de l'scWAT d'humanes obesa. MW = Pes molecular aparent.

4.3.2.3 Discussió

En humans, està descrit que en una situació patològica com l'obesitat l'activitat LPL al teixit adipós augmenta en detriment de l'activitat al múscul. Aquest augment de la relació entre l'activitat LPL al teixit adipós i al múscul redirigeix els àcids grassos cap al teixit adipós i, aquest fet, deriva en un elevat emmagatzematge lipídic i, per tant, a l'obesitat [12]. L'LPL està considerada un enzim porter que juga un important rol en l'inici i/o el desenvolupament de l'obesitat [12, 263]. Està àmpliament descrit que en l'obesitat hi ha un augment d'activitat LPL per cèl·lula en el teixit adipós [12, 278]. A més, la mida dels adipòcits és molt important quan es calcula l'activitat LPL per cèl·lula ja que adipòcits més grans, hipertrofiats, sintetitzen més TAG i alliberen més àcids grassos que no pas adipòcits més petits [279, 280]. S'ha descrit que en individus obesos els adipòcits de l'scWAT estan hipertrofiats [280]. En aquest estudi, hem vist una major activitat LPL per gram de teixit en l'homogenat d'scWAT de dones normopès comparat amb el de dones obeses. No coneixem quina és la quantitat de WAT de cada voluntari, però tenint en compte que el pes corporal dels normopès és molt inferior al dels obesos mòrbids, el pes total de l'scWAT també ho serà. Per tant, si poguéssim calcular l'activitat LPL per quantitat total d'scWAT la relació que hem observat d'activitat LPL per gram de teixit s'invertiria i estaria en consonància amb la literatura. No vàrem calcular per número de cèl·lules l'activitat LPL, però tenint en compte la quantitat d'scWAT dels individus control i la dels obesos i també, la hipertròfia dels adipòcits en els obesos, segurament haguéssim vist una activitat LPL per adipòcit superior en els voluntaris obesos.

Com que no vàrem poder recollir mostres d'scWAT d'homes normopès o control, l'estudi de les isoformes de pI de l'LPL en l'obesitat el vàrem realitzar en dones. No vàrem ni barrejar mostres de diferents gèneres ni comparar mostres d'individus obesos i control de diferent gènere perquè s'ha demostrat que hi ha diferències d'activitat LPL segons el gènere. Fried *et al.* [281] van evidenciar que les dones tenen una activitat LPL significativament major que els homes fent una mitjana entre diferents zones de teixits adiposos (subcutani i visceral).

El vWAT, i no l'scWAT, es relaciona en humans amb la síndrome metabòlica [188, 189]. El nostre treball està realitzat amb scWAT ja que no vàrem poder obtenir vWAT en el cas dels individus control. Per poder obtenir aquest tipus de teixit adipós en els controls hauriem d'aprofitar operacions d'òrgans interns i sempre amb la condició que els individus no patissin malalties que poguessin interferir en el nostre estudi de l'LPL. El fet de realitzar el treball amb un teixit adipós no relacionat directament amb la síndrome metabòlica, pot ser el motiu pel qual no podem establir amb seguretat si existeixen diferències en les isoformes de pI de l'LPL entre els individus controls i els obesos.

Hi ha estudis que demostren que en dones normopès, amb obesitat moderada i amb obesitat mòrbida l'activitat LPL a l'scWAT abdominal és baixa comparada amb l'scWAT dels glutis (gluteal) o de les cuixes (femoral) [281]. El nostre estudi està realitzat amb scWAT abdominal, aquest pot ser un dels motius pels quals hem obtingut una baixa activitat LPL per gram

de teixit (72 mU/g tx en dones control i 15 mU/g tx en obeses). Aquesta baixa activitat LPL possiblement ha complicat la precipitació de la proteïna i el seu posterior enfocament per 2DE. Hem comprovat, però, que l'enfocament de les isoformes de pI de l'LPL de les dones control ha estat més ben resolt que no pas el de les obeses. En propers estudis, proposariem la coprecipitació de l'LPL amb alguna altra proteïna per tal de millorar la resolució de l'enfocament. Malgrat aquest inconvenient, hem aconseguit descriure, per primera vegada, l'existència d'isoformes de pI de l'LPL al WAT d'humans.

Fins ara, sabem que l'LPL eluïda de la columna d'HS era activa pels estudis fets amb el mètode radioquímic [201] i, aquest fet, concorda amb els estudis de la cromatografia d'afinitat a HS en la qual es separa l'LPL monomèrica (inactiva) de la dimèrica (activa) [277]. Per estudiar a nivell funcional les isoformes de pI de l'LPL hem aconseguit la posada al punt del mètode de l'SS. Els creadors del mètode de l'SS comparaven l'activitat lipasa o esterasa d'enzims en proteomes propers (concretament comparant el teixit adipós blanc amb el marró) [269]. Nosaltres, hem adaptat el mètode per estudiar l'activitat de les isoformes de la nostra proteïna d'interès, l'LPL. Preteníem conèixer si totes les isoformes de pI de l'LPL són actives i estudiar de manera indirecta la funció d'aquestes en una situació patològica com l'obesitat, on l'LPL és clau.

Hem comprovat que totes les isoformes de pI de l'LPL de l'scWAT que observem en el WB són funcionalment actives ja que són les mateixes que visualitzem amb el mètode de l'SS. Aquest fet, confirma la relació d'activitat LPL total, obtinguda després de la cromatografia d'afinitat a HS, amb la massa total de proteïna LPL [282]. Voldríem haver comparat els nivells d'activitat de les isoformes de l'LPL, de les imatges obtingudes per SS, trobades en les dones control i les obeses. Això però, no ha estat possible per diferents motius: (i) la quantitat d'activitat LPL incubada amb l'SS no era la mateixa en les dones normopès que en les obeses, (ii) havíem de creure que el centre actiu de totes les isoformes de l'LPL tenia la mateixa afinitat pel GR de l'SS, (iii) havíem de suposar que l'ER de l'SS seria reconegut de la mateixa manera per part de totes les isoformes i (iv) havíem de suposar també que el *tag* emet sempre la mateixa intensitat de senyal fluorescent.

Tot i la dificultat d'enfocar per 2DE les mostres provinents d'scWAT de dones controls i obeses, probablement per la baixa activitat LPL en aquest teixit, proposem que en l'obesitat les isoformes de pI de l'LPL tendeixen a desplaçar la seva quantitat relativa cap al rang bàsic de pH. Aquest fet, ens indica de manera indirecta i aproximada que existeix una variació de la funció catalítica de les isoformes de pI de l'LPL en l'obesitat.

En un futur, si poguéssim fer un estudi a gran escala de les isoformes de pI de l'LPL en l'obesitat en humans tindríem en compte els següents paràmetres:

- i) el gènere (més activitat LPL en dones que en homes) [281]

- ii) el tipus de teixit adipós (si fos possible obtenir visceral millor que el subcutani ja que el primer està relacionat directament amb la síndrome metabòlica) [188, 189]
- iii) la localització en el cos del teixit adipós (en el cas de les dones si és subcutani hi ha més activitat LPL en el femoral que en l'abdominal, si és visceral hi ha més activitat en el mesentèric que en l'omental) [281]
- iv) les variacions estacionals (existeixen contradiccions en la literatura ja que alguns autors troben més activitat LPL a l'hivern que a l'estiu [283] i d'altres a l'inrevés [284])
- v) en el cas de les dones, si són pre, peri o post menopàusiques (hi ha més activitat LPL com més avançada està la menopausa) [285]

Amb l'estudi de les isoformes de pI de l'LPL en WAT d'humans vàrem trobar-nos amb dos esculls importants: (i) el tipus de WAT estudiat no era el més adient per estudiar a nivell funcional les isoformes de l'LPL ja que l'scWAT no és el teixit relacionat directament amb la síndrome metabòlica i (ii) la baixa activitat LPL de l'scWAT probablement va influir en la dificultat per resoldre de manera satisfactòria l'enfocament per 2DE de les isoformes. No obstant, vam comprovar l'existència d'isoformes de pI de l'LPL en l'scWAT d'humans i, també, vam fer una primera aproximació indirecta a nivell funcional d'aquestes isoformes en una situació patològica com l'obesitat (en la qual l'LPL és un enzim clau).

Pel fet de no haver pogut treballar amb el tipus de WAT relacionat directament amb l'obesitat en humans, vàrem decidir ampliar l'estudi d'aproximació per la caracterització funcional de les isoformes de l'LPL en l'obesitat amb dos models murins. El primer model d'obesitat que es descriu és el d'obesitat induïda per dieta de cafeteria en rates Wistar (4.3.3) i, el segon, és el d'obesitat induïda per modificació genètica en rates Zucker (4.3.4).

4.3.3 Obesitat induïda per dieta de cafeteria

Les mostres procedents de rates Wistar per a aquest model d'obesitat van ser cedides pel grup del Dr. Xavier Remesar, aleshores del Departament de Nutrició i Bromatologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i actualment del Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular.

Vàrem iniciar l'estudi de les isoformes de pI de l'LPL en l'obesitat induïda per dieta de cafeteria amb rates mascle, però no vàrem aconseguir enfocar les isoformes en el cas de l'rWAT de les rates mascle obeses per dieta de cafeteria a diferència de les rates control. En el cas de les mostres de WAT d'humanes ja vàrem identificar el mateix problema: les isoformes de pI de l'LPL provinents de mostres d'individus obesos es resolen pitjor per 2DE que les d'individus control. Com ja s'ha comentat a la discussió de l'obesitat mòrbida en humans, ens vam proposar millorar aquesta resolució coprecipitant l'LPL amb alguna altra proteïna. La proteïna escollida va ser la BSA lliure d'àcids grassos.

4.3.3.1 Coprecipitació amb BSA lliure d'àcids grassos

En mostres derivades d'individus obesos no obteníem una bona resolució de les 2DE. Aquest fet afectava a la visualització de les isoformes de l'LPL ja que, o bé perdiem algunes de les menys abundants o bé la seva intensitat era molt inferior a l'habitual. Per solucionar aquest inconvenient vàrem decidir coprecipitar aquestes mostres amb una altra proteïna com a pas previ a la 2DE.

La proteïna escollida va ser la BSA lliure d'àcids grassos. La BSA té un MW aparent similar a l'LPL, 66 kDa, però el seu pI és àcid, 5,6 (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?P02769@25-607@average). Les tires IPG que fem servir en la primera dimensió de les 2DE tenen un rang de pH de 6 a 11, així que una proteïna com la BSA,

amb un pI més àcid al nostre mínim, quedaria sense enfocar en l'extrem àcid de la tira.

La concentració final de BSA que vàrem precipitar en tots els casos va ser 125 µg/mL. De manera, que la quantitat de proteïna total a enfocar fos sempre, com a mínim, 125 µg BSA + x µg de la proteïna del *pool* de la mostra d'LPL a precipitar. Tenint en compte que per a una tira IPG d'11cm d'una 2DE com a màxim podem enfocar 300 µg de proteïna, teníem de marge 175 µg per a la nostra mostra. De manera general, els *pools* obtinguts dels WAT de rata estudiats tenen una concentració de proteïna inferior a 100 µg/mL. Així, que podíem coprecipitar fins a 2 mL de *pool* (fins i tot una mica més en alguns casos) junt amb els 125 µg de BSA sense superar el límit dels 300 µg/tira.

Vàrem iniciar la posada al punt de la coprecipitació amb la BSA utilitzant l'eWAT de rata mascle obesa per dieta de cafeteria. Ho vam fer amb epididimal i no amb retroperitoneal per reservar l'rWAT per quan tinguéssim més seguretat de l'èxit de la coprecipitació. Com observem a la Figura 59. (A) la coprecipitació amb BSA de l'LPL d'eWAT de rata mascle obesa per dieta de cafeteria ens permet obtenir totes les isoformes de pI, sense aquesta coprecipitació només podem observar 3 de les 6 isoformes de pI, justament les més abundants. Com ja teníem l'evidència de que l'enfocament de mostres provinents de rates obesas (amb dificultats d'enfocament), millorava amb la coprecipitació amb BSA, vàrem comprovar si en mostres de rates no obesas obteníem també una millora en la resolució de les isoformes de pI de l'LPL. Si ens fixem en el panell (B), veiem un augment en la intensitat de les isoformes de pI de l'LPL al coprecipitar l'LPL de l'rWAT de rata femella control (no obesa) amb la BSA i, a més, no observem cap canvi en el patró d'aquestes. Per tant, aquest resultat evidencia que la BSA millora la resolució i detecció de les isoformes sense alterar el seu pI. En el panell (C), veiem que la coprecipitació de l'LPL d'eWAT de rata mascle obesa i BSA ens permet detectar en una 2DE-Tinció amb plata les mateixes isoformes de pI de l'LPL que observàvem en el WB en el panell (A). Si fos necessari, podríem retallar les taques del gel tenyit i identificar-les mitjançant MS. La mateixa Figura 59. (D) mostra que en una 2DE-Tinció amb plata de BSA sola, aquesta no s'enfoca en el rang de pH de 6 a 9,5. Per tant, la coprecipitació amb BSA no interfereix en l'enfocament i la detecció de l'LPL per 2DE.

En aquest bloc d'estudi, vam fer servir la coprecipitació amb BSA en algunes mostres difícils d'enfocar per 2DE. Si la mostra es va coprecipitar amb BSA s'indicarà al peu de figura.

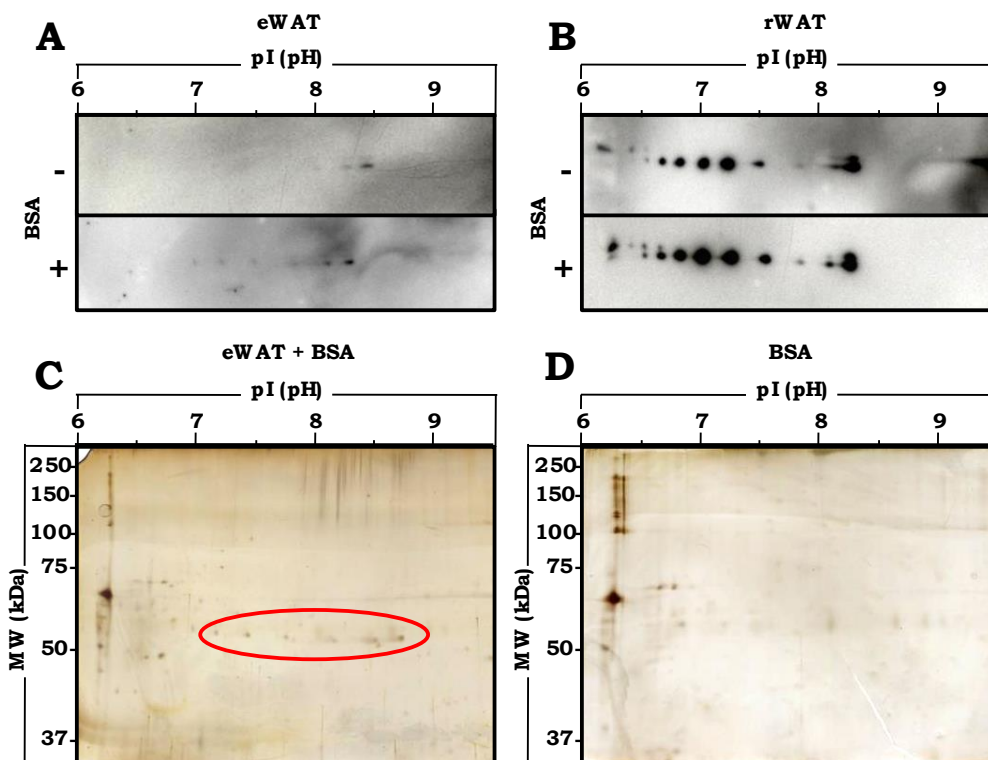


Figura 59. Coprecipitació de proteïnes amb o sense BSA. (A, B i C) 2DE d'LPL parcialment purificada d'eWAT (A i C) de rata mascle obesa per dieta de cafeteria i d'rWAT (B) de rata femella control. (D) 2DE de BSA. Les 2DE es van dur a terme utilitzant tires IPG d'11cm i rang de pH de 6 a 11 en la primera dimensió. (A i B) WB contra LPL (anticòs 5D2), (C i D) gels tenyits amb plata (encerclat en vermell la zona de les isoformes de pI de l'LPL). (- i +) sense i amb BSA sola. (A-) 36 mU d'LPL, (A+) 42 mU d'LPL + 250 µg de BSA, (B-) 42 mU d'LPL, (B+) 42 mU d'LPL + 169 µg de BSA, (C) 21 mU d'LPL + 125 µg de BSA i (D) 125 µg de BSA. MW = Pes molecular aparent. Mostra procedent de 6 animals en cada purificació.

4.3.3.2 Estudi de les isoformes d'LPL en el model d'obesitat per dieta de cafeteria

Després d'una sèrie d'intents frustrats per intentar resoldre les isoformes de pI de l'LPL d'rWAT de rates mascle obeses, ens vàrem quedar sense mostra. Aleshores, amb la coprecipitació amb BSA posada al punt, vàrem decidir realitzar l'estudi amb **rWAT de femelles**. La dieta de cafeteria, descrita al apartat 3.1.5, consistia en l'accés ad libitum a pinso estàndard, aigua i aliments altament energètics per part dels animals durant un període de 30 dies de durada.

En aquest model d'obesitat, no vàrem estudiar a nivell funcional les isoformes de pI de l'LPL, mitjançant el mètode de l'SS, perquè en el moment d'analitzar les mostres no teníem posada al punt la metodologia.

Per realitzar els estudis de les isoformes de pI de l'LPL d'rWAT de rates femella control i obeses per dieta de cafeteria vàrem purificar parcialment l'LPL mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. Com ja teníem experiència prèvia en purificacions parcials d'rWAT només vàrem recollir les fraccions amb l'elutit a 1,50 M que és on trobem l'LPL. En la Figura 60.,

la representació d'ambdues purificacions parcials mostra un pic d'activitat lipasa molt elevat que correspon a l'LPL eluïda de l'rWAT de rates femella control (A) i obeses per dieta de cafeteria (B). El pic d'activitat és més elevat en l'rWAT control (més de 50 mU/mL) que en el de les obeses (aproximadament 30 mU/mL). L'activitat LPL per gram de teixit de l'homogenat era gairebé 6 vegades més elevada en el cas de les femelles control (169 mU/g tx) que en el de les obeses (29 mU/g tx).

rWAT rates femella

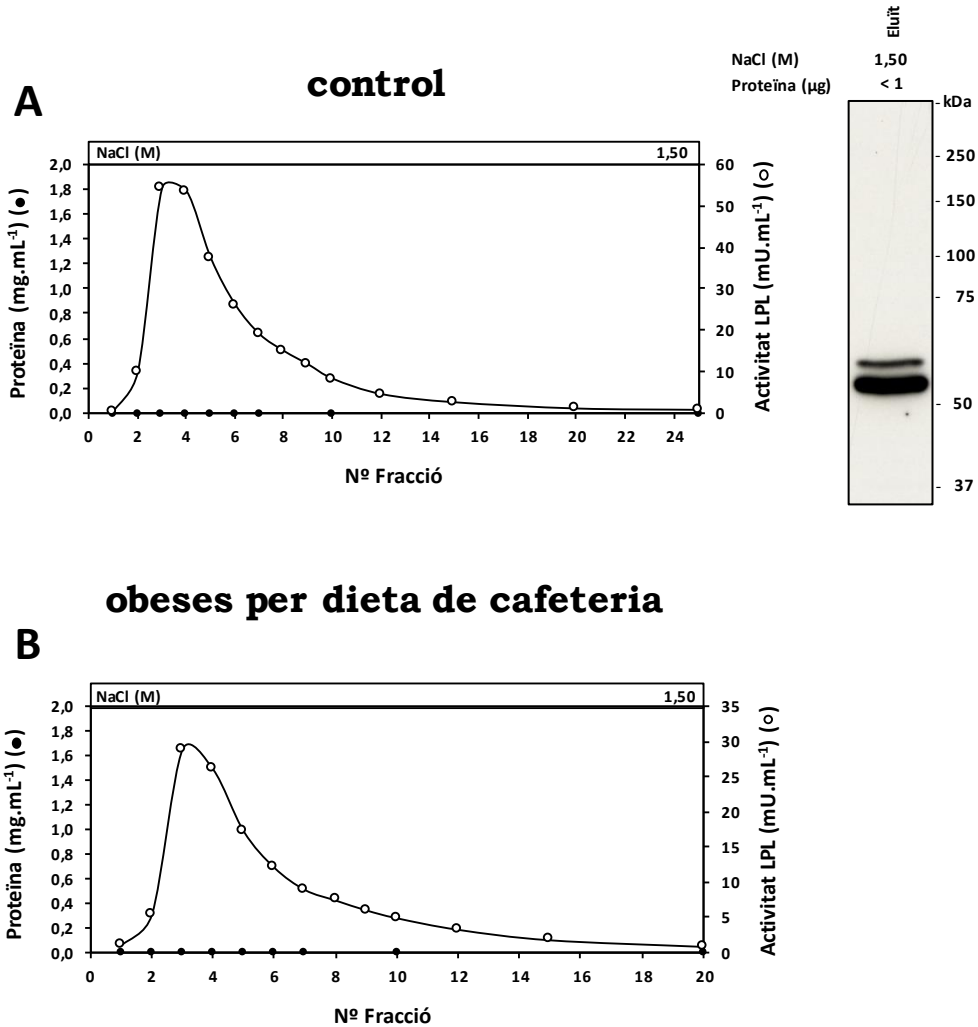


Figura 60. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc retroperitoneal de rates femella control (A) i obeses per dieta de cafeteria (B) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose. Les fraccions van ser recollides després d'un increment esglaonat de la concentració de NaCl (0,75 M i 1,50 M). Es mostra la proteïna total (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) de les fraccions de l'eluït a 1,50 M d'NaCl. A) A la dreta del perfil es troba la imatge d' SDS-PAGE i WB contra LPL (anticòs 5D2), del pool de les fraccions de l'eluït. La quantitat total de proteïna carregada s'indica sobre el carril. S'ha utilitzat 4,6 g d'rWAT procedent de 6 rates control i 3,2 g de 6 rates obeses.

Al costat de la representació gràfica de la purificació parcial de les femelles control (veure Figura 60. (A)) es mostra la imatge d' SDS-PAGE i WB contra l'LPL del *pool* de les fraccions del pic d'activitat eluït. En ella, s'aprecia una doble banda amb MW aparent diferent. La banda més gruixuda correspon al MW aparent descrit per l'LPL, 56 kDa. La banda més prima té un MW aparent aproximat de 62 kDa.

No vàrem poder obtenir cap imatge d'una SDS-PAGE i WB en el cas de les femelles obeses. Aquest fet, concorda amb la dificultat de precipitació que vàrem tenir amb l'rWAT dels mascles obesos per dieta de cafeteria, com hem comentat en el paràgraf anterior, i en la necessitat de coprecipitar algunes mostres amb alguna altra proteïna. En aquest cas, però, no vàrem poder coprecipitar amb BSA ja que la coprecipitació de l'LPL amb aquesta proteïna no és compatible amb una 1DE ja que els seus pesos moleculars són similars.

Vàrem analitzar mitjançant 2DE-WB (veure Figura 61.) el *pool* de les fraccions obtingudes en l'eluït de la purificació parcial de l'LPL procedent de l'rWAT de rates femella control i obeses per dieta de cafeteria.

rWAT rates femella

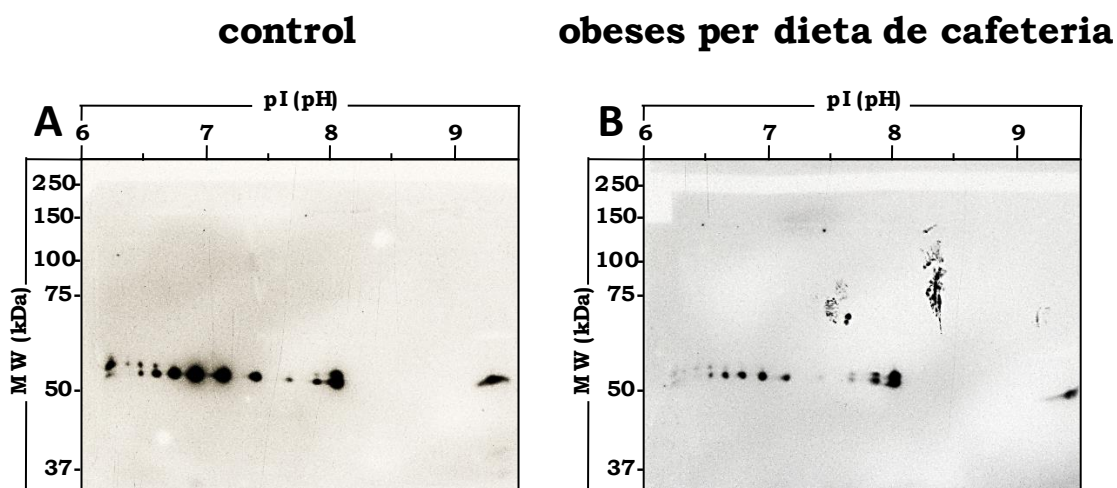


Figura 61. Isoformes de pI de l'LPL de teixit adipós blanc retroperitoneal de rates femella control (A) i obeses per dieta de cafeteria (B). 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2). Coprecipitació amb BSA. Activitat LPL carregada: 42 mU en (A) + 169 µg de BSA i 32 mU en (B) + 188 µg de BSA. Mostra provinent de 6 animals en cada purificació parcial. Per a la primera dimensió, es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. MW = Pes molecular aparent.

En la imatge de l'rWAT de les femelles control (A) observem nou isoformes amb un pI d'entre 6,60 i 8,35 i amb un MW aparent de 56,2 kDa. També observem l'existència de quatre isoformes amb un MW aparent més elevat, 62,5 kDa. Aquest fet concorda amb la banda de més MW aparent (aprox. 62 kDa) observada en l' SDS-PAGE i WB de la Figura 60. (A). Aquestes quatre isoformes estan ubicades als extrems àcid i bàsic del conjunt d'isoformes. En l'extrem àcid tenen un pI de 6,60 i 6,75, i en l'extrem bàsic

tenen un pI de 8,17 i 8,35. Observem doncs que en l'rWAT de rates femella control, a part de les isoformes de pI de l'LPL, també existeixen isoformes de MW aparent de l'LPL.

En la imatge de la Figura 61. (B) observem les isoformes de pI de l'LPL de l'rWAT de les rates femella obeses per dieta de cafeteria. Tornem a veure nou isoformes de pI d'entre 6,60 i 8,30 amb un MW aparent de 56,2 kDa i, en aquest cas, observem cinc isoformes amb un MW més elevat, 62,5 kDa. D'aquestes cinc isoformes dues tenen un pI de 6,60 i 6,75 (extrem àcid) i tres tenen un pI de 7,90, 8,13 i 8,30 (extrem bàsic). En aquest cas, però, no havíem pogut observar l'existència d'una possible doble banda en l'SDS-PAGE i WB de les rates femella obeses per dieta de cafeteria (veure Figura 60. (B)) per la impossibilitat de coprecipitar l'LPL amb BSA degut a la similitud dels seus MW aparents.

Per a l'obtenció dels patrons d'isoformes de l'LPL de l'rWAT (veure Figura 62.) de les rates femella controls (A) i obeses per dieta de cafeteria (B) vàrem fer vàries 2DE-WB i, de cada 2DE-WB, diferents exposicions en el revelat del WB. La isoforma de pI més abundant de l'rWAT de rates femella control (un 17% de la quantitat total d'LPL) té un pI neutre (7,32) i un MW aparent de 56,2 kDa que és l'esperat. La següent isoforma més abundant té un pI més bàsic que la isoforma majoritària (8,35) i el mateix MW aparent.

En el patró de l'rWAT de les rates femella obeses per dieta de cafeteria observem que la isoforma de pI més abundant (un 17% de la quantitat total d'LPL) té un pI bàsic (8,30) i un MW aparent de 62,5 kDa, aquest no és l'esperat per l'LPL. La següent isoforma més abundant té el mateix pI que la isoforma majoritària (8,30) però el MW aparent és de 56,2 kDa.

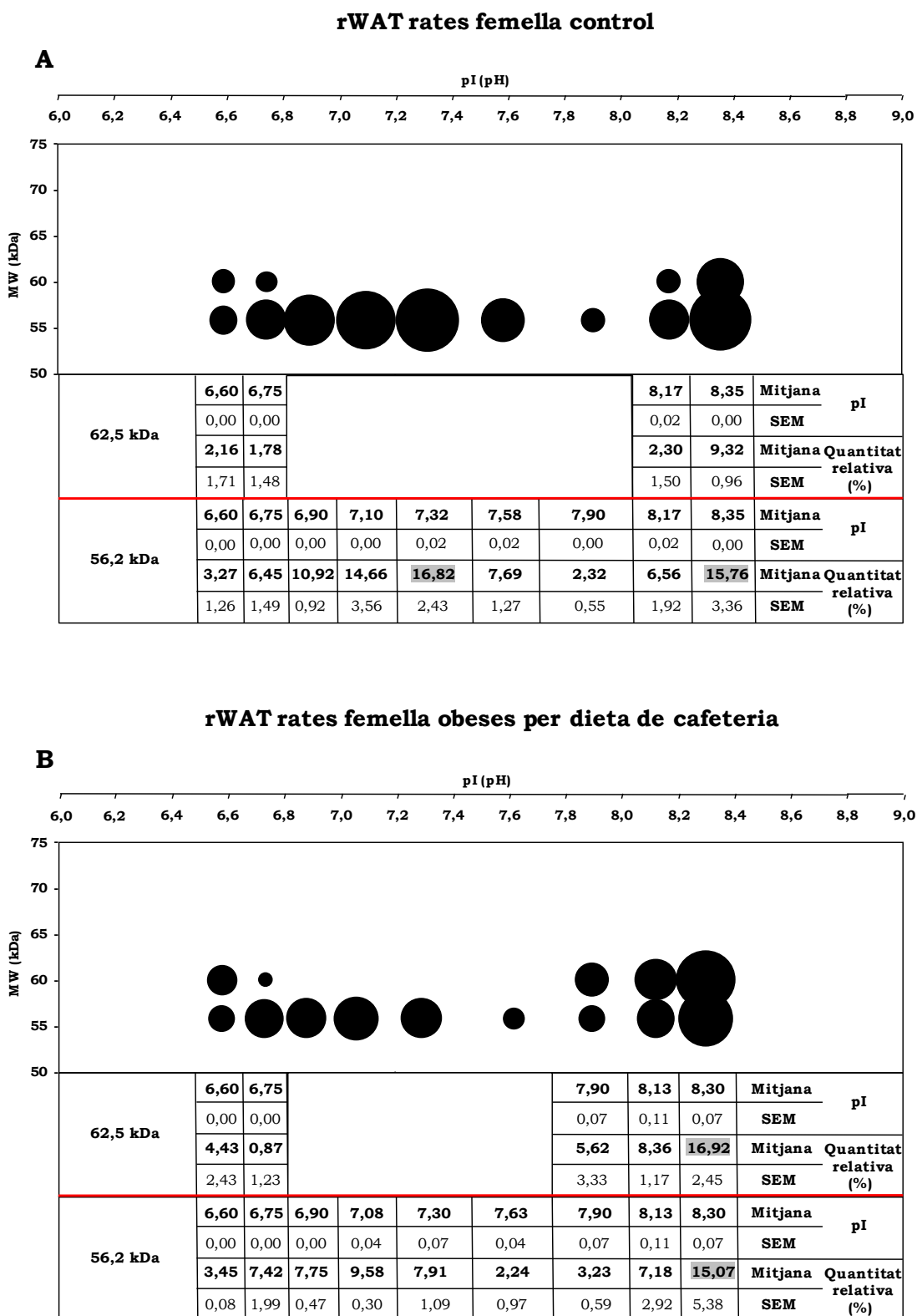


Figura 62. pI, pes molecular i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rates femella control (A) i obeses per dieta de cafeteria (B) (relacionada amb la Figura 61). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 13 isoformes; B, total 14 isoformes). A la taula es presenta aquesta quantitat respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb el seu pI i el seu MW. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 3 rèpliques tècniques de l'rWAT de femelles control i de 2 rèpliques tècniques de l'rWAT de femelles obeses. MW, pes molecular aparent.

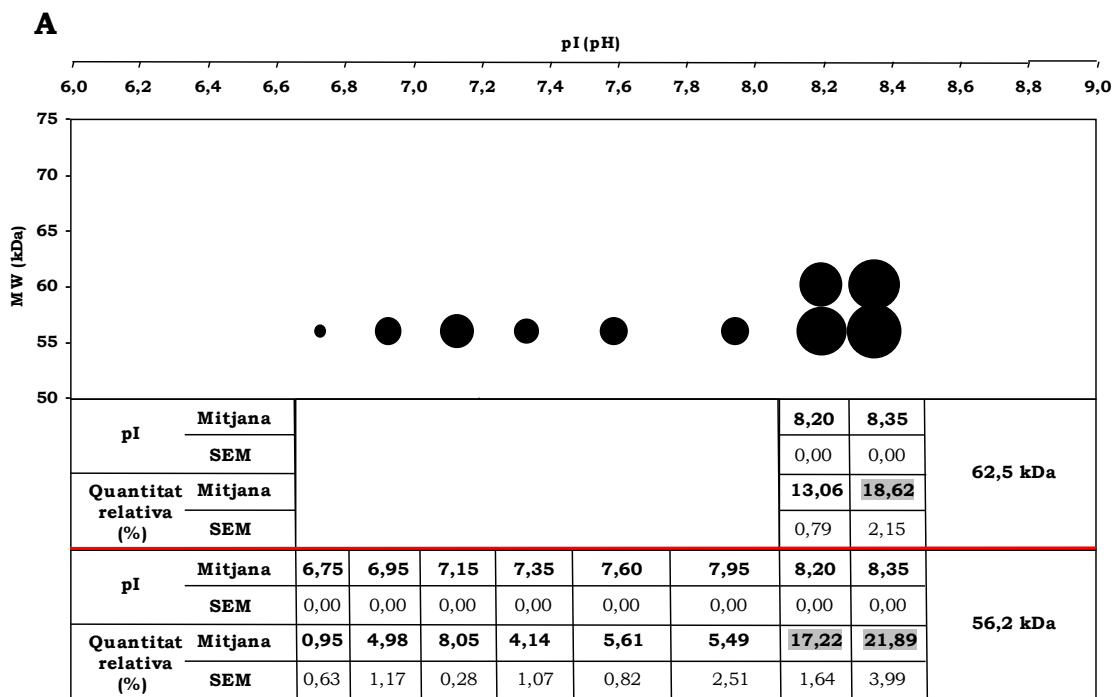
Donat que anteriorment en aquesta tesi hem descrit una diferència entre els patrons de les isoformes de l'LPL dels PHP de rates mascle i femella (veure Figura 47.) vam voler comprovar si trobàvem aquesta **diferència de gènere** en un teixit concret, l'rWAT, tenint en compte que el PHP es considera un recull de l'LPL madura de tot l'organisme i, per tant, les diferències observades provenen d'algun o alguns teixits concrets. Aprofitant que teníem el patró d'isoformes de l'rWAT de rates femella control (veure Figura 62. (A)) vàrem obtenir el patró de l'rWAT de rates mascle control (que, com hem descrit en la introducció de l'apartat 4.3.3, sí que havíem aconseguit enfocar). Vàrem purificar parcialment l'LPL procedent de l'rWAT de rata mascle control i vam utilitzar el *pool* de l'elut (a 1,50 M NaCl) com a font d'LPL per obtenir el patró d'isoformes d'aquest teixit mitjançant 2DE-WB (dades no mostrades).

En la Figura 63. (A), observem el patró d'isoformes de pI i de MW aparent de l'LPL de l'rWAT de rata mascle. El patró mostra que l'rWAT de rata mascle control presenta un mínim de vuit isoformes de pI (de pH entre 6,75 i 8,35) amb un MW aparent de 56,2 kDa i, també, un mínim de dues isoformes de pI (8,20 i 8,35) amb un MW aparent superior a l'esperat, de 62,5 kDa. La isoforma més abundant (un 22% de la quantitat total d'LPL) té un pI bàsic (8,35) i un MW aparent esperat. Les dues isoformes més abundants següents (un 17 i 18% respecte el total) també tenen un pI bàsic (8,20 i 8,35) però divergeixen en el seu MW aparent (56,2 kDa i 62,5 kDa, respectivament).

Si comparem els patrons d'isoformes de l'rWAT de rata obtinguts en ambdós gèneres, veurem que no són idèntics. El rang de pH en el qual trobem les isoformes és el mateix, però la distribució de les mateixes divergeix. Així, en l'rWAT de les femelles trobem un mínim de quatre isoformes amb un MW aparent de 62,5 kDa, dues en la part àcida del rang de pH i dues en la part bàsica. En canvi, en el dels mascles només trobem isoformes de MW aparent de 62,5 kDa en la zona bàsica. Una altra diferència la trobem en les isoformes majoritàries de cada gènere. En el cas de les femelles, les isoformes es distribueixen de manera similar en tot el rang de pH, en canvi, en els mascles es troben representades de manera majoritària, un 71% respecte la quantitat relativa total d'LPL, en la zona bàsica (superior a 8,00).

Com aquest últim resultat està al marge dels objectius definits per aquest estudi i, en canvi, està en consonància amb els resultats de la diferència dels patrons de les isoformes de l'LPL del PHP entre gèneres, la discussió sobre ambdós resultats es troba a l'apartat V. Discussió global.

rWAT rates mascle control



rWAT rates femella control

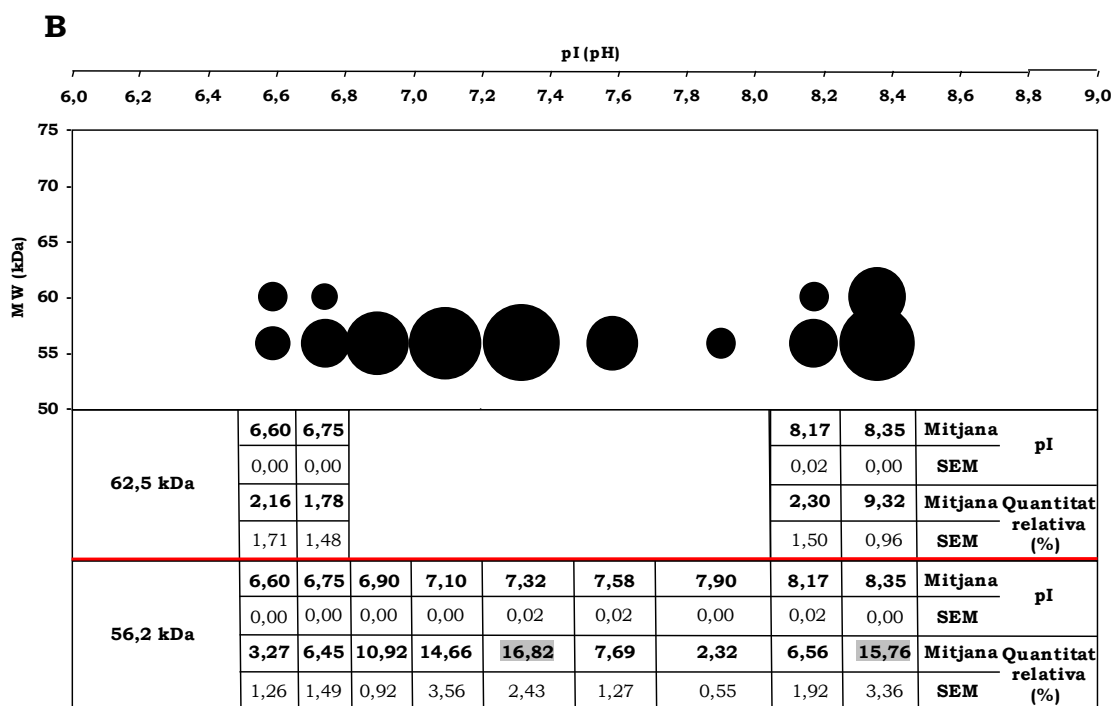


Figura 63. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rates mascle (A) i femella (B). Patró d'isoformes de (A) l'LPL de l'rWAT de rates mascle control i de (B) l'rWAT de rates femella control (veure Figura 62. (A)). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 10 isoformes; B, total 13 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb el seu pI i el seu MW. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 3 rèpliques tècniques de l'rWAT de mascles i de 3 rèpliques tècniques de l'rWAT de femelles. MW = Pes molecular aparent.

4.3.3.3 Discussió

Diferents treballs realitzats en humans i en rates obesas genèticament modificades evidencien una major activitat LPL en els individus o animals obesos comparats amb els normopès o *lean* [12, 67, 164, 263]. Els nostres resultats mostren una major activitat LPL, gairebé 6 vegades superior, en les rates control comparada amb les obesas per dieta de cafeteria. Aquesta diferència d'activitat està en consonància amb els resultats de Lladó *et al.* [286], els quals també utilitzen pel seu estudi rates femella obesas per dieta de cafeteria, el mateix teixit adipós blanc, l'rWAT, i les rates tampoc han estat dejunades abans del seu sacrifici. Els autors mostren una activitat LPL lleugerament superior en les rates control que en les obesas. En el nostre estudi les rates van seguir una dieta de cafeteria durant 30 dies, les rates de Lladó *et al.* van seguir la dieta 100 dies. Està descrit que per trobar una activitat LPL més elevada en les rates obesas per dieta de cafeteria que en les control cal seguir la dieta durant una període més llarg, de 180 dies o més [287].

D'aquest estudi sorprèn la dificultat per precipitar la proteïna de l'rWAT en el cas de les rates obesas, tant mascles com femelles. En canvi, la proteïna de les rates control precipita bé i som capaços de visualitzar-la per SDS-PAGE i WB sense necessitat de coprecipitar amb BSA. Ambdues mostres (obesas i controls) van ser deslipidades com a pas previ a la cromatografia d'afinitat a HS, per tant, un excés de greix no seria la causa d'aquesta dificultat de precipitació. En l'homogenat teníem una major activitat LPL en les rates femella control (169 mU/g tx) comparada amb la de les obesas (29 mU/g tx). Aquesta diferència en l'activitat LPL podria indicar uns nivells més baixos de proteïna LPL i aquest podria ser el motiu pel qual les mostres provinents d'una situació d'obesitat són més difícils de precipitar i resoldre per 2DE-WB.

Una altra dada rellevant de l'estudi és el fet de trobar també isoformes de MW aparent de l'LPL en l'rWAT d'ambdós casos, rates control i obesas, a part de les isoformes de pI. El nostre grup, ha demostrat que en l'eWAT, en canvi, no existeixen les isoformes de MW aparent de l'LPL [181]. En aquestes isoformes de MW aparent (superior a l'esperat (62.5 kDa)) també hi trobem isoformes de pI. Hi ha una diferència d'uns 6,3 kDa entre ambdós conjunts d'isoformes, aproximadament un 10%. Aquesta diferència de MW, és similar a la trobada en les deglicosilacions de l'LPL realitzades al nostre laboratori tant a cor de rata [180] com a WAT de macaco [181] i, coincideix també, amb la diferència de MW observada en les isoformes de MW aparent de llet de rata (veure apartat 4.2.5). Aquest fet ens fa pensar que l'rWAT de rata també presenta LPL altament glicosilada. Com hem dit abans, caldrien futurs experiments deglicosilant l'LPL per contrastar aquesta hipòtesi.

Si comparem els patrons de les isoformes entre els dos grups no veiem diferències quant al nombre (només veiem una isoforma de pI i de MW aparent de més en el cas de les obesas) ni a la distribució per pI o per MW. No obstant, la quantitat relativa de les isoformes canvia lleugerament entre els dos grups. En la situació d'obesitat les isoformes tendeixen a distribuir-se de manera similar en tot el rang de pH concentrant-se una

mica més en la zona bàsica (rang àcid-neutre 44%, rang bàsic 56%). En canvi, en la situació control les isoformes tendeixen a tenir una major representació en el rang àcid-neutre (rang àcid-neutre 64%, rang bàsic 36%). Per tant, en una situació control les isoformes es troben en una major concentració en la zona de pH àcid-neutre, mentre que en l'obesitat es desplacen i tendeixen a igualar-se en tot el rang de pH amb una lleugera major concentració en la zona bàsica.

És a dir, en l'obesitat hi hauria una major abundància relativa d'isoformes bàsiques en comparació amb la situació control. Aquest fet ens porta a preguntar-nos què passaria si el nostre estudi s'allargués als 180 dies i l'activitat LPL en les rates obeses per dieta de cafeteria fos més elevada que en les rates control. Segons els nostres resultats, esperariem que la diferència en el patró de les isoformes d'LPL entre les rates obeses i les control fos encara més evident trobant un major desplaçament de les isoformes cap a la zona de pH bàsica en les rates obeses.

4.3.4 Obesitat induïda per modificació genètica

A diferència del model d'obesitat induïda per dieta de cafeteria en el qual vàrem acabar utilitzant el gènere femení, degut a que ens vam quedar sense mostra dels mascles obesos per problemes amb la precipitació i posterior visualització per WB de l'LPL, en el model d'obesitat que es presenta tot seguit vàrem utilitzar el gènere masculí. Els dos estudis van ser coetanis, de manera que el canvi de gènere en el model d'obesitat induïda per dieta de cafeteria es va realitzar quan ja teníem demanades a la casa comercial les rates Zucker mascle.

En aquest model d'obesitat, però, vam poder estudiar a nivell funcional les isoformes de pI de l'LPL mitjançant el mètode de l'SS.

4.3.4.1 Caracterització del model genètic

Vàrem adquirir 16 rates mascle Zucker, 8 *fafa* i 8 *lean*, d'entre 4-5 setmanes de vida. Voldríem haver-les genotipat, abans de la seva arribada a les nostres instal·lacions, però la casa comercial (Charles River) no ofería aquest servei ja que assegurava que el fenotip de les rates a les 5 setmanes de vida era prou clar com per classificar-les correctament en el seu grup. Tot i això, ens vàrem proposar, abans del nostre experiment, assegurar-nos que les rates estaven ben classificades. L'experiment va finalitzar a les 15 setmanes de vida de les rates, està descrit que a partir de les 14 setmanes de vida un 40% del seu pes corporal està format per greix [194].

A continuació, es presenten algunes dades que permeten comprovar que les rates que finalment vam establir com a grup obès (*fafa*) o com a grup control (*lean*) ho són realment.

Vàrem mesurar el seu **pes corporal** un cop per setmana. En la Figura 64. (A), veiem la corba de creixement de les 16 rates. Veiem representades en cercles negres les 11 rates en les que el pes corporal ha evolucionat més al llarg de 10 setmanes i en quadrats blancs les 5 en les que ho ha fet menys. Només observant el pes corporal al llarg del temps ja vàrem sospitar que la classificació original de la casa comercial (8 *fafa* i 8 *lean*) no era correcta. Per aquest motiu, vàrem decidir classificar-les segons el pes corporal que tenien cadascuna per separat. En la Figura 64. (B) tenim representada la mitjana del pes corporal de totes les rates que componen cada grup (*fafa* o *lean*) calculada a partir dels pesos individuals (veure Figura 64. (A)).

A partir d'aquest punt les rates estan classificades com a Zucker *fafa* o *lean* en totes les figures per igual. És a dir, tenim sempre les mateixes 11 rates classificades com a obesos o *fafa* i les mateixes 5 rates classificades com a controls o *lean*.

Vàrem recollir dades sobre la **ingesta** de les rates Zucker durant el temps que va durar la seva estabulació. En la Figura 65., tenim representada la ingesta de pinso (A) i d'aigua (B) per gàbia i dia respectivament. Es va mesurar la ingesta dos cops per setmana durant 8 setmanes d'estabulació dels animals. Com observem en ambdós gràfics, la ingesta de les Zucker *fafa* (en negre) és superior a les Zucker *lean* (en blanc). Com veiem en (A), la ingesta de pinso de les Zucker *fafa* és molt

elevada i té un creixement exponencial durant les primeres tres setmanes d'estabulació (corresponents a les setmanes de vida 5 a 8) i després hi ha una estabilització d'aquesta ingesta. En canvi, la ingesta de pinso de les Zucker *lean* és estable durant tota l'estabulació. Una de les gàbies no està representada en la Figura 65. perquè en ella hi estaven establulades una rata de cada grup i vàrem decidir no tenir-la en compte pels càlculs.

Rates Zucker

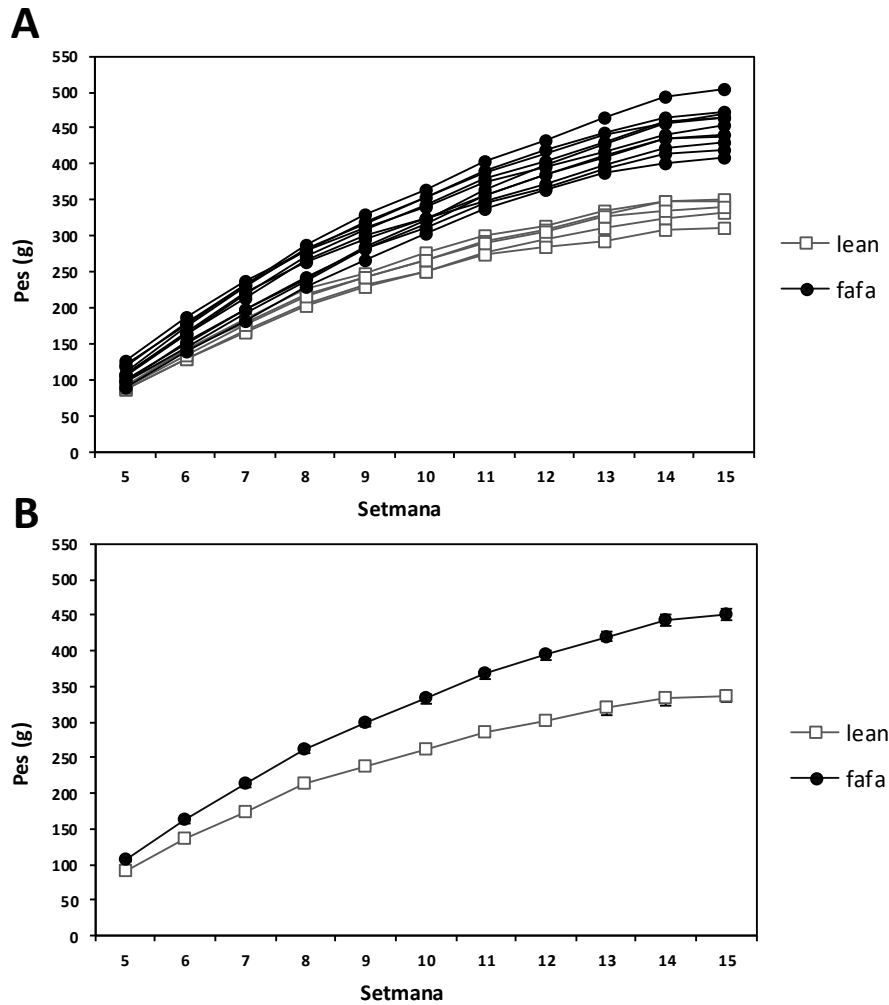


Figura 64. Evolució del pes corporal en rates Zucker mascle. Els marcadors quadrats blancs corresponen a rates Zucker *lean* (n=5) i els rodons negres a Zucker *fafa* (n=11). (A) Pes individual de cada rata. (B) Mitjana dels pesos de les rates de cada grup, *lean* o *fafa*. Les barres representen la desviació estàndard de la mitjana.

Ingesta Rates Zucker

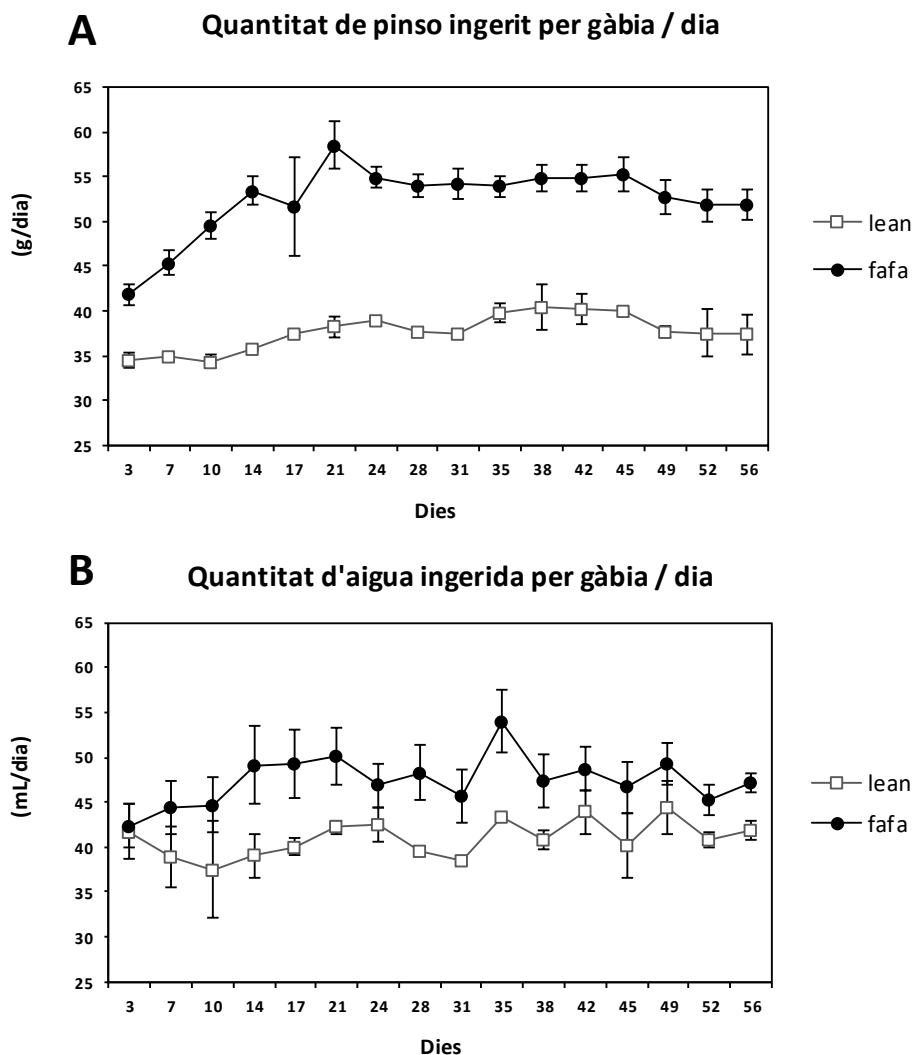


Figura 65. Evolució d'ingesta i consum d'aigua per gàbia en rates Zucker mascle. (A) Quantitat de pinso per gàbia (g/dia) i (B) aigua per gàbia (g/dia) ingerits pels animals Zucker *lean* (quadrats blancs) i Zucker *fafa* (rodones negres) des de l'inici de l'estudi. Mitjana \pm desviació estàndard de 2 gàbies en el grup Zucker *lean* (2 animals per gàbia) i de 5 gàbies en el grup Zucker *fafa* (2 animals per gàbia).

En la Taula 9. observem la classificació de les 16 rates Zucker, 5 classificades com a *lean* (1-5) i 11 com a *fafa* (6-16), segons el pes de l'eWAT, de l'rWAT i del pes corporal a les 15 setmanes de vida. Si ens fixem en el pes de l'eWAT veiem que, de mitjana, en les classificades com a *lean* és d'1,39 g, en canvi, en les classificades com a *fafa* és de 7,48 g (més de 5 vegades superior en les *fafa* que en les *lean*). Si ens fixem en el pes de l'rWAT, observem que les mateixes rates que tenien un pes d'eWAT més baix tenen també un pes més baix d'rWAT, concretament 2,60 g de mitjana. I, en la mateixa línia, les rates amb un major pes d'eWAT també tenen un major pes d'rWAT, 8,98 g (tres vegades superior al de les *lean*). Si ara analitzem el pes corporal d'ambdós grups també veiem les mateixes

coincidències descrites abans. El grup classificat com a *lean* té una mitjana de pes corporal de 336 g (cap rata supera els 400 g) i el grup classificat com a *fafa* té una mitjana de 451 g (cap rata té un pes inferior als 400 g). Per últim, si calculem el percentatge del pes corporal que representen la suma del pes dels dos WAT veiem que el grup classificat com a *lean* té una relació mitja d'1,18 i el grup classificat com a *fafa* té una relació mitja de 3,64, tres vegades superior.

Rata	Pes eWAT (g)	Pes rWAT (g)	Pes corporal (g)	% pes corporal (eWAT+rWAT)
1	1,32	2,26	333	1,08
2	1,07	2,15	311	1,04
3	1,39	2,42	348	1,09
4	1,32	3,07	350	1,25
5	1,83	3,08	340	1,44
6	6,94	7,36	408	3,50
7	6,36	9,10	464	3,33
8	5,84	9,14	439	3,41
9	8,00	9,37	470	3,70
10	9,80	9,40	454	4,23
11	8,87	9,45	440	4,16
12	7,10	7,40	430	3,37
13	7,88	8,09	473	3,38
14	9,55	11,15	503	4,12
15	5,67	8,22	420	3,31
16	6,28	10,12	465	3,53

Taula 9. Pes corporal i pes del teixit adipós blanc epididimal i retroperitoneal en rates Zucker mascle a les 15 setmanes de vida. Les rates 1 a 5 són Zucker *lean* i les rates 6 a 16 són Zucker *fafa*.

Vàrem mesurar l'**activitat LPL** de l'eWAT i de l'rWAT de les 16 rates (veure Figura 66.). En (A) es representa l'activitat LPL per gram de teixit. Els valors obtinguts en la quantificació de l'activitat, tant en el cas de l'eWAT com en el de l'rWAT, no ens permeten establir una classificació de les rates i dir si pertanyen al grup Zucker *fafa* o *lean*. Aquest fet és degut a que l'activitat LPL per gram de teixit no és diferent entre rates obeses i controls. Per poder establir una classificació hem d'analitzar l'activitat LPL total de cada paquet d'adipós o *fat pad*.

En la Figura 66. (B) podem observar una diferència en l'activitat LPL per *fat pad* entre les rates obeses i les controls de manera que les obeses tenen una activitat major que les controls tant en l'eWAT com en l'rWAT.

Activitat LPL Rates Zucker

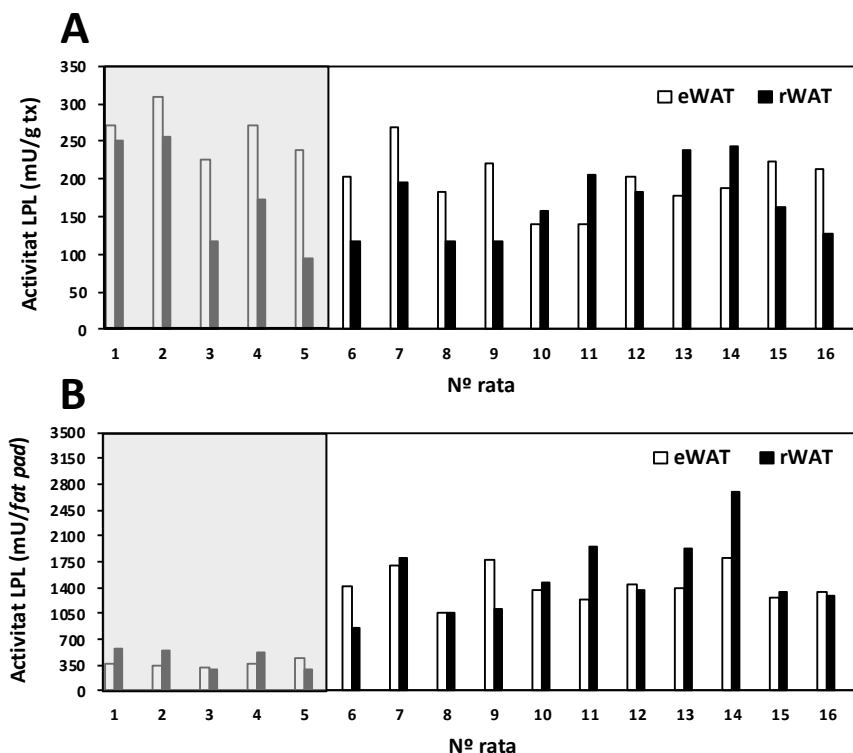


Figura 66. Activitat LPL dels teixits adiposos epididimals i retroperitoneals de les rates Zucker mascle. Les rates 1 a 5 són Zucker *lean* (fons ombrejat gris) i les rates 6 a 16 són Zucker *fafa*. eWAT (barres blanques), rWAT (barres negres). Es representa l'activitat LPL per gram de teixit (A) i per *fat pad* (B). Mitjana activitat LPL mU/g tx \pm SEM: eWAT, *lean* 264 ± 16 i *fafa* 196 ± 12 ; rWAT, *lean* 178 ± 34 i *fafa* 170 ± 42 . Mitjana activitat LPL mU/*fat pad* \pm SEM: eWAT, *lean* 360 ± 23 i *fafa* 1437 ± 73 ; rWAT, *lean* 443 ± 72 i *fafa* 1533 ± 166 .

Per continuar amb l'establiment d'una bona classificació dels nostres animals vàrem quantificar els **TAG** en plasma.

Com veiem a la Figura 67. les rates classificades com a Zucker *fafa* (barres negres) tenen uns nivells de TAG en plasma 4 vegades superiors al de les classificades com a Zucker *lean* (barres blanques). Aleshores, vàrem voler conèixer si el pes corporal de les rates o el seu BMI correlacionaven amb els nivells de TAG. En la Figura 68. observem: en (A) la correlació entre el BMI i els TAG d'ambdós grups i en (B) la correlació entre el pes corporal i els TAG d'ambdós grups també. Hi ha una bona correlació entre els factors analitzats i el grup d'estudi. Un pes corporal més gran o un BMI més elevat correlacionen positivament amb uns nivells de TAG més elevats (rates classificades com a Zucker *fafa* (rodones negres)). Un pes corporal més petit o un BMI inferior correlacionen positivament amb uns nivells més baixos de TAG en sang (rates classificades com a Zucker *lean* (quadrats blancs)).

TAG Rates Zucker

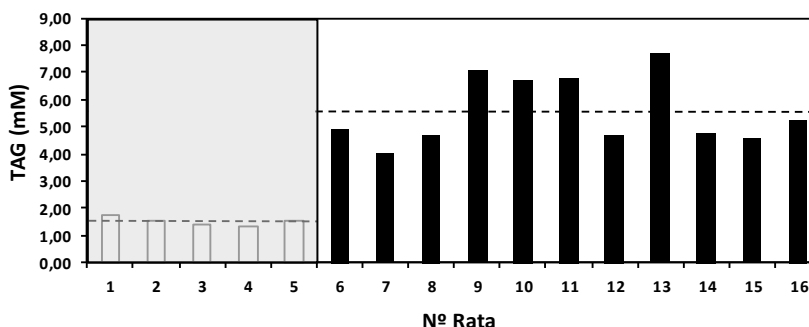


Figura 67. Nivells de triacilglicèrids en plasma a rates Zucker mascle.

Les rates 1 a 5 són Zucker *lean* (barres blanques i fons ombrejat gris) i les rates 6 a 16 són Zucker *fafa* (barres negres). Les línies puntejades representen la mitjana dels valors de TAG del grup de les *lean* (mitjana \pm SEM, $1,50 \pm 0,09$) i de les *fafa* (mitjana \pm SEM, $5,55 \pm 0,40$), respectivament. La mostra de sang es va obtenir el mateix dia del sacrifici de les rates, a les 15 setmanes de vida.

Rates Zucker

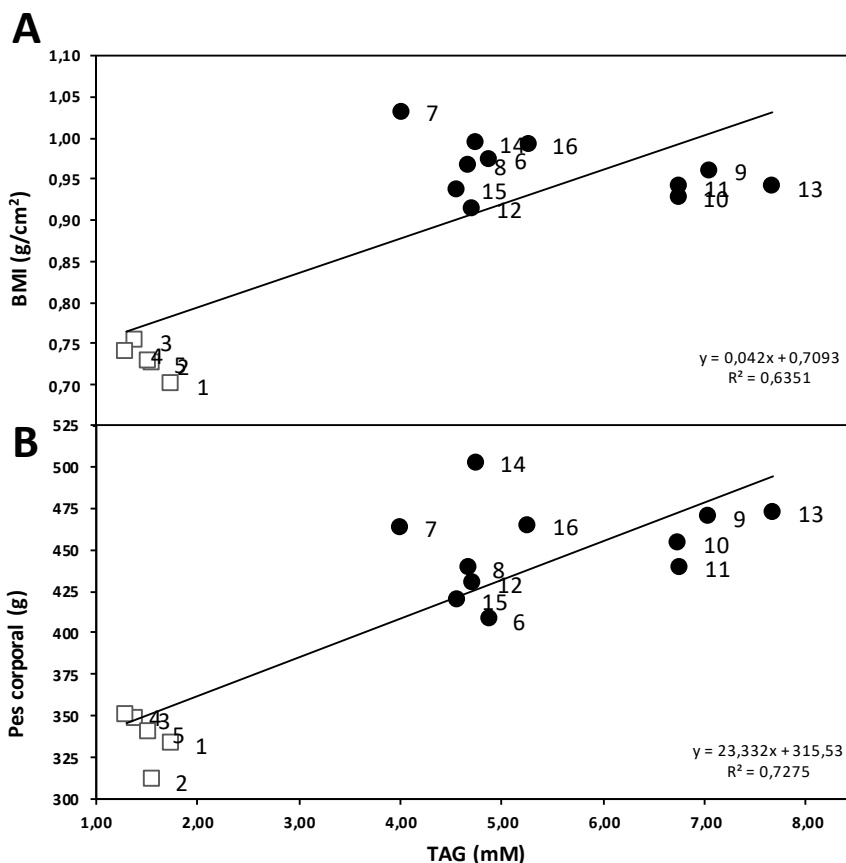


Figura 68.

Correlació dels nivells de TAG amb l'índex de massa corporal i amb el pes corporal de rates Zucker mascle.

Els cercles negres corresponen a Zucker *fafa* (n=11) i els quadrats blancs a Zucker *lean* (n=5). Cada marcador va acompanyat pel número de rata corresponent.

(A) Correlació entre els TAG i el BMI de cada rata. El

BMI es calcula dividint el pes corporal de la rata en grams per la longitud de la rata des del musell a la base de la cua en cm al quadrat [195, 196]. (B) Correlació entre els TAG i el pes corporal de cada rata. La mostra de sang es va obtenir el mateix dia del sacrifici de les rates, a les 15 setmanes de vida.

Per últim, es va comprovar la **glucèmia** de totes les rates un cop per setmana durant 9 setmanes (excepte les setmanes 11 i 14) (veure Figura 69.). Com es pot observar a la figura no hi ha diferències entre el grup Zucker *fafa* i el *lean* en quant al nivell de glucosa en sang. Aquest fet no és estrany ja que la diabetis és una possible comorbiditat derivada de l'obesitat però no és una condició *sine qua non* per declarar, en aquest cas a una rata, obesa. A més a més, ja hem comentat en la introducció d'aquest bloc d'estudi que la hiperglucèmia no és característica de les rates obeses Zucker.

Glucèmia Rates Zucker

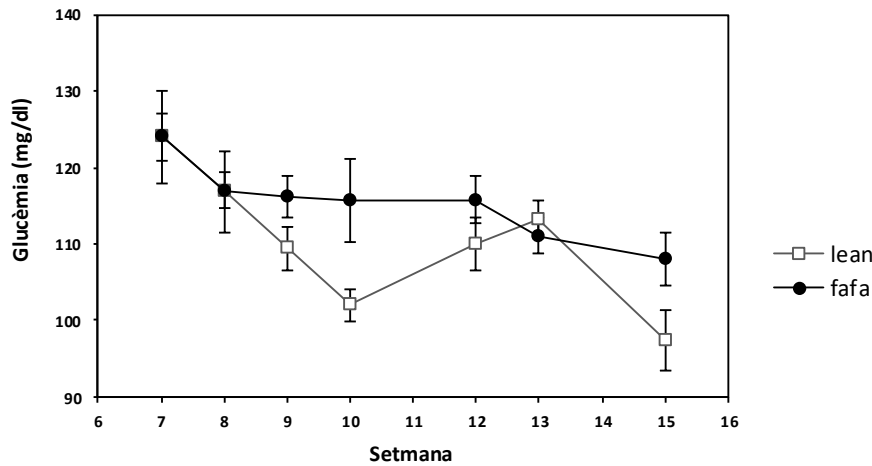


Figura 69. Evolució de la glucèmia a les rates Zucker mascle de les 7 a les 15 setmanes de vida. Zucker *lean* (quadrats blancs) i Zucker *fafa* (rodones negres). Les barres representen la desviació estàndard de la mitjana de 5 animals en el grup Zucker *lean* i 11 animals en el grup Zucker *fafa*.

La Taula 10. (A) mostra un resum de les característiques estudiades a les setmanes 5 i 15 de vida de les rates Zucker. En (B), mostrem els paràmetres de pes corporal, BMI i nivells de TAG en plasma amb els valors límits que hem establert per considerar una rata *lean* o *fafa*.

A	<i>lean</i>		<i>fafa</i>	
	5 setmanes	15 setmanes	5 setmanes	15 setmanes
Pes (g)	90	336	107	452
BMI (g/cm²)	nd	0,73	nd	0,96
TAG (mM)	nd	1,50	nd	5,55
Glucèmia (mg/dL)	nd	97	nd	108
Ingesta pinso/dia	34,50	nd	41,90	nd
Consum aigua/dia	41,80	nd	42,30	nd
Pes (g) eWAT	nd	1,39	nd	7,48
Pes (g) rWAT	nd	2,60	nd	8,98
Activitat LPL				
eWAT (mU/fat pad)	nd	360	nd	1437
rWAT (mU/fat pad)	nd	443	nd	1533

B	Dades reals	Aproximació
<i>lean</i> rates 1-5	Pes ≤ 350	Pes < 400
	BMI ≤ 0,75	BMI < 0,90
	TAG ≤ 1,75	TAG < 2,00
<i>fafa</i> rates 6-16	Pes ≥ 408	Pes ≥ 400
	BMI ≥ 0,91	BMI ≥ 0,90
	TAG ≥ 4,01	TAG ≥ 4,00

Taula 10. Resum de la caracterització del model Zucker a 5 i 15 setmanes de vida. Zucker *lean* n=5, Zucker *fafa* n=11. (A) Valors promig de la caracterització a les setmanes 5 i 15. Nd= no determinat. (B) Dades reals i aproximades obtingudes de la mesura del pes, el BMI i els TAG de les rates Zucker.

4.3.4.2 Estudi de les isoformes d'LPL en el model d'obesitat per modificació genètica

Un cop ben establerts els dos grups d'estudi (*lean* = 5 rates i *fafa* = 11 rates) (veure Taula 10.), vàrem realitzar la purificació parcial de l'LPL de l'rWAT mitjançant cromatografia d'afinitat a HS.

La Figura 70. mostra el resultat de la purificació de l'rWAT de les rates mascle Zucker *lean* (A) i de les *fafa* (B). En ambdues representacions veiem un pic d'activitat LPL i cap altre pic d'activitat lipasa en tota la purificació parcial. Els valors dels pics d'activitat LPL són similars en ambdós grups (Zucker *lean* 35 mU/mL i Zucker *fafa* gairebé 40 mU/mL). Aquestes dades estan en consonància amb els valors d'activitat LPL per gram de teixit carregats a la columna d'HS d'ambdós grups d'estudi. L'homogenat de les Zucker *lean* tenia una activitat LPL de 195 mU/g tx i el de les *fafa* de 217 mU/g tx.

A la dreta de la representació de la purificació parcial de les Zucker *fafa* (B) veiem la imatge de l'SDS-PAGE i WB contra l'LPL del *pool* de les fraccions de l'eluit a 1,50 M d'NaCl. Observem una doble banda, la més gruixuda correspon al MW aparent esperat per l'LPL, 56,2 kDa. La més prima té un MW aparent aproximat de 62,5 kDa. No vàrem realitzar

l' SDS-PAGE i WB del *pool* de les fraccions eluïdes a 1,50 M de les Zucker *lean* (A) perquè disposàvem de molt poca quantitat de mostra que preferíem reservar per les 2DE. El fet de disposar de menys mostra d'rWAT de les Zucker *lean* s'explica per dos motius: (i) les rates control tenen menys quantitat de greix que les obeses i (ii) disposàvem de només 5 rates control (per contra teníem 11 rates obeses) (veure Taula 10.).

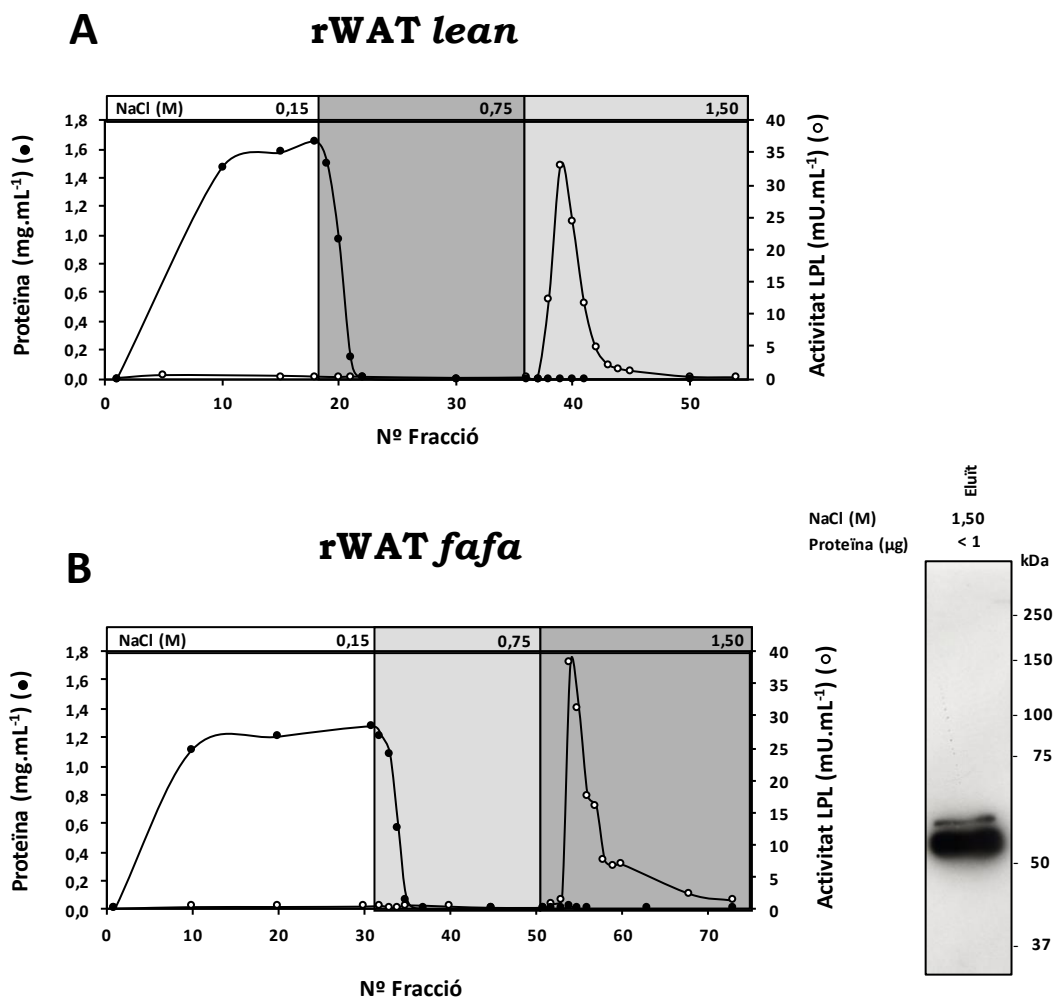


Figura 70. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc retroperitoneal de rata mascle Zucker *lean* (A) i *fafa* (B) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose*. Les fraccions van ser recollides després d'un increment esglaonat de la concentració de NaCl, com s'indica a la part superior. Es representa la proteïna total (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) de les fraccions. (A) rWAT Zucker *lean*, s'ha utilitzat 7,5 g d'rWAT de 5 animals en la purificació parcial. No es va fer SDS-PAGE i WB per reservar mostra per les 2DE. (B) rWAT Zucker *fafa*, a la dreta del perfil es troba la imatge d' SDS-PAGE i WB contra LPL (anticòs 5D2) del *pool* de les fraccions de l'eluït. La quantitat total de proteïna carregada s'indica sobre el carril. S'ha utilitzat 14,1 g d'rWAT de 5 animals en la purificació parcial.

Un cop posada al punt la tècnica de l'SS (veure Apartat 4.3.2.1), vàrem realitzar les 2DE en WB i en SS tant de les mostres d'rWAT de les rates Zucker *lean* com de les *fafa* (veure Figura 71.). En la 2DE-WB de l'LPL de l'rWAT de les Zucker *lean* (A) i en la de les Zucker *fafa* (B), observem vuit isoformes amb un pI d'entre 6,80 i 8,30 i amb un MW aparent esperat de 56,2 kDa. En ambdós casos observem també dues isoformes amb un pI bàsic i un MW aparent d'aproximadament 62,5 kDa.

Si ens fixem en la imatge de les isoformes de pI de l'LPL en la 2DE-SS d'ambdues mostres (*lean* (C) i *fafa* (D)) veiem un total de vuit isoformes que coincideixen en pI amb l'observat al WB. Les dues isoformes de més MW aparent es poden intuir però no s'observen clarament. També podem veure en ambdues imatges de 2DE-SS dues isoformes àcides de menor MW aparent que les isoformes de pI de l'LPL, són les que vàrem establir com a control intern de que la tècnica de l'SS ha funcionat en rWAT de rata mascle (veure Figura 54.).

Vàrem tenyir amb plata el mateix gel utilitzat per la 2DE-SS i tal i com veiem en la zona encerclada en vermell de les imatges ((E) Zucker *lean* i (F) Zucker *fafa*) aconseguim tenyir les mateixes isoformes que les observades en l'SS. Amb la tinció amb plata som capaços de diferenciar millor les dues isoformes de pI de més MW aparent en ambdues mostres.

La Figura 72. mostra el patró de les isoformes de pI de l'LPL de l'rWAT de les rates Zucker *lean* i *fafa*. En el patró de l'rWAT de les rates Zucker *lean* (A) observem que la isoforma de pI més abundant (un 23% de la quantitat total d'LPL) té un pI bàsic (8,35) i un MW aparent de 56,2 kDa. La següent isoforma més abundant (un 15%) té un pI neutre (7,35) i el MW aparent és també de 56,2 kDa.

Si observem el patró d'isoformes de l'rWAT de les Zucker *fafa* (B) veurem cinc isoformes de pI abundants (entre un 13 i un 16% de la quantitat total d'LPL cadascuna). Una d'elles té un pI neutre (7,13) i un MW aparent de 56,2 kDa. Les altres quatre tenen un pI bàsic (de 8,23 i 8,33) i un MW aparent de 56,2 kDa o bé de 62,5 kDa.

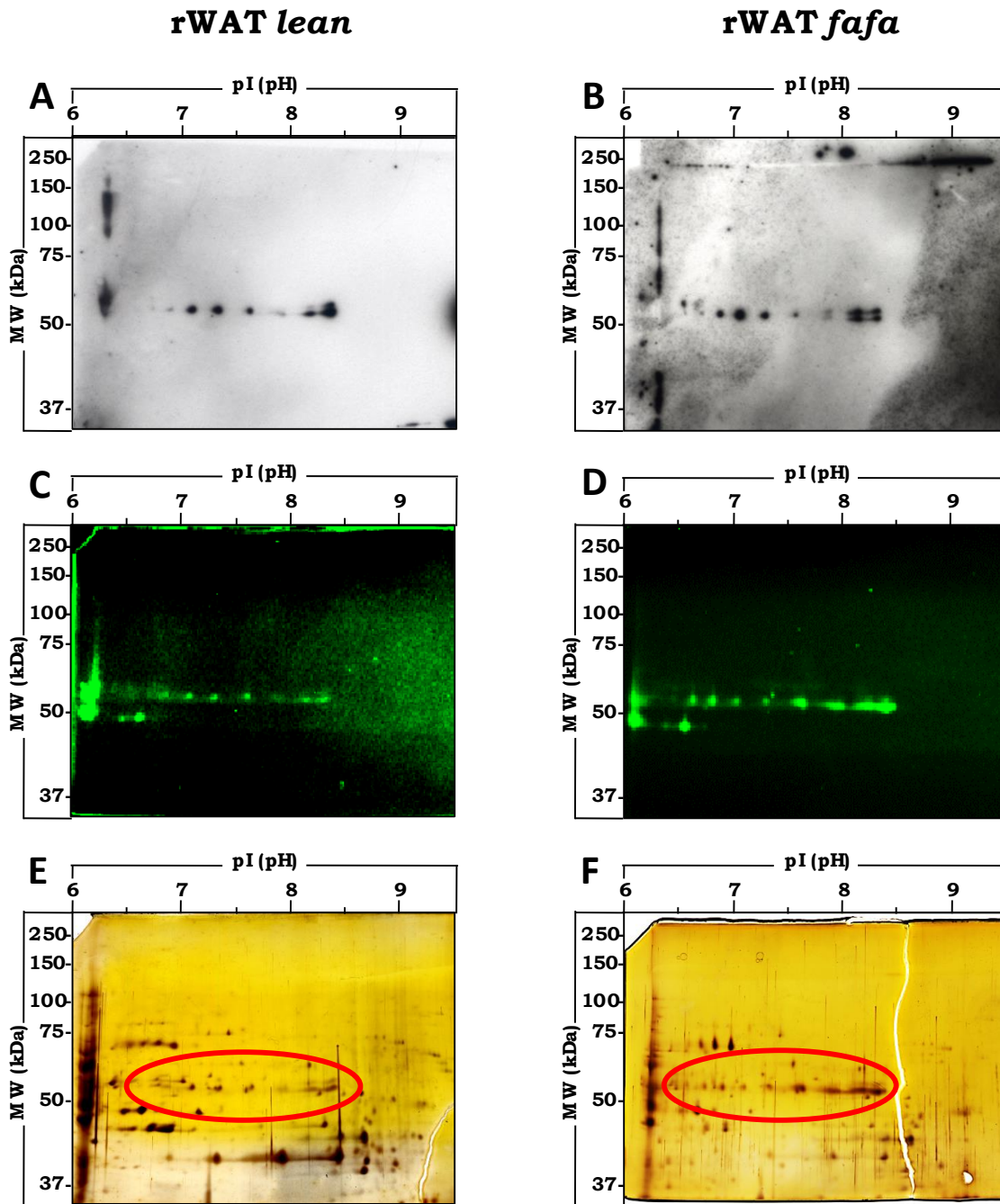


Figura 71. Detecció d'isoformes de pI de l'LPL de teixit adipós blanc retroperitoneal de rata Zucker *fafa* i *lean* mitjançant Western blot, substrat suïcida i tinció amb plata. (A i B) 2DE-WB contra LPL (anticòs 5D2) de l'LPL purificada parcialment d'rWAT de rata Zucker mascle *lean* (A) (78 mU) i *fafa* (B) (41 mU). (C i D) 2DE-SS de l'LPL purificada parcialment d'rWAT de rata Zucker *lean* (C) (45 mU) i *fafa* (D) (26 mU) incubada amb SS (10 nmol), a 25°C i 1 h sota protecció lumínica. La fluorescència del gel és detectada amb l'escàner làser Typhoon FLA 9500 (λ d'excitació a 473 nm i d'emissió a 532 nm). (E i F) Tinció amb plata del mateix gel de la 2DE-SS per *lean* (E) i *fafa* (F) (encerclada en vermell la zona on trobem les isoformes de pI de l'LPL). Per a la primera dimensió, es van utilitzar tires IPG d'11 cm i rang de pH 6-11. *lean* n=5, *fafa* n=5. MW = Pes molecular aparent.

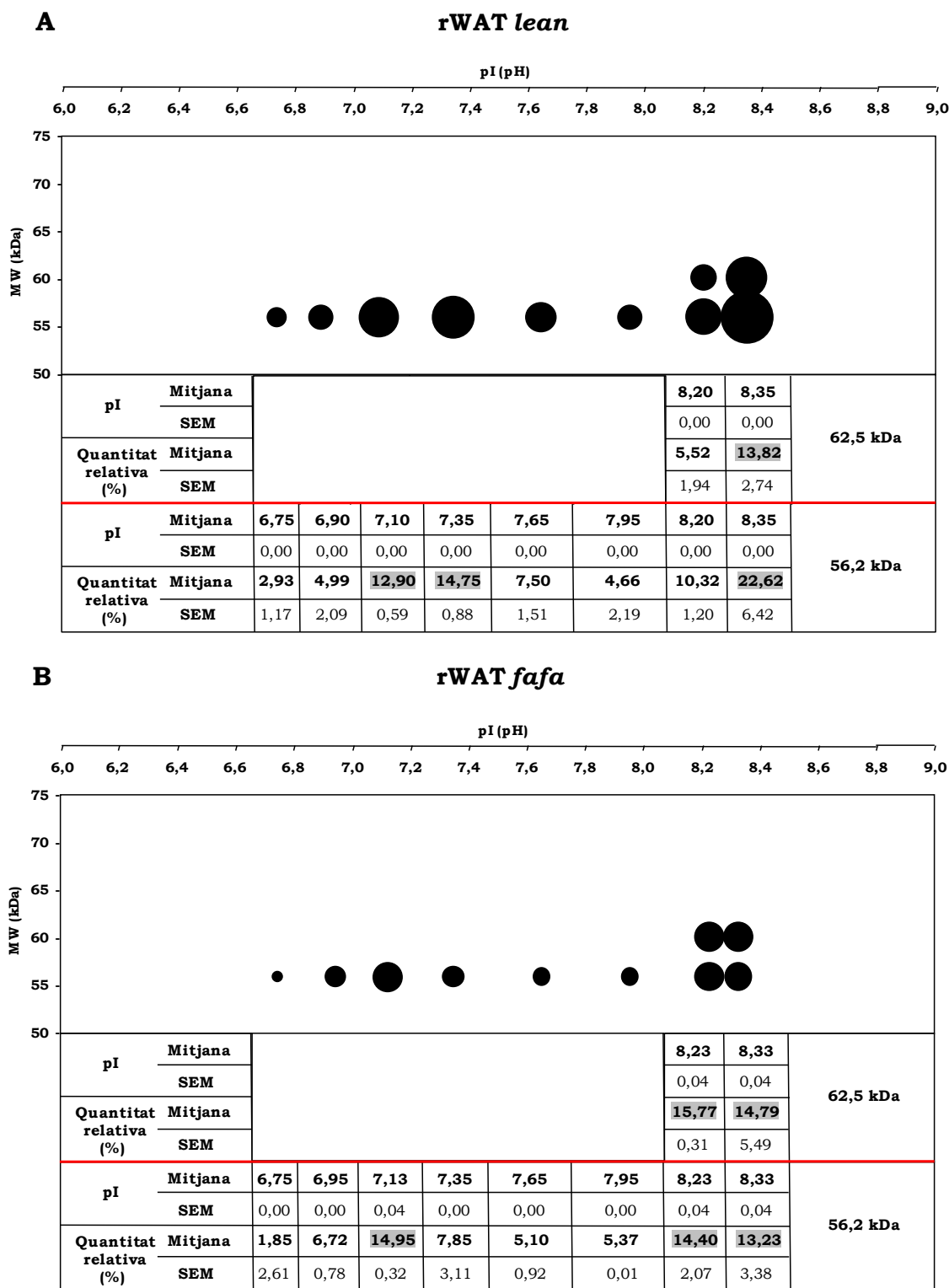


Figura 72. pI, pes molecular i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rata Zucker mascle lean (A) i fafa (B) (relacionada amb la Figura 71.). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (total 10 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb el seu pI i el seu MW. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques de l'rWAT de les *lean* i de 2 rèpliques tècniques de l'rWAT de les *fafa*. MW = Pes molecular aparent.

4.3.4.3 Discussió

Hem classificat les rates Zucker en obeses (*fafa*) o primes (*lean*) seguint una sèrie de paràmetres característics: el pes corporal, l'existència o no d'hiperfàgia, la relació entre el pes dels teixits adiposos i el pes corporal, els nivells d'activitat LPL per *fat pad* i els nivells de TAG en plasma. També hem comprovat que la hiperglucèmia no és un paràmetre característic de les rates Zucker obeses i, per tant, no és útil per la seva caracterització [194, 288]. Segons la casa comercial que ens va subministrar els animals, a les 5 setmanes de vida ja es veu una diferència de pes corporal significativa per classificar-les. Ara bé, segons la nostra corba de creixement, no les podríem classificar sense equivocar-nos fins a les 9 o 10 setmanes. Per tant, en aquest tipus de model experimental, és necessari fer un seguiment dels animals, amb els paràmetres descrits, per tal d'assegurar una correcta classificació dels mateixos al grup corresponent i no esbiaixar els experiments que se'n derivin.

També hem vist que els nivells de TAG correlacionen amb el pes corporal i amb el BMI de les rates obeses i primes. És a dir, les rates obeses pesen més, tenen un BMI superior i uns nivells de TAG en plasma també més elevats que les rates primes. Aquest fet, si bé no és sorprenent, no està descrit en la literatura per les rates obeses per modificació genètica però sí per les obeses per dieta de cafeteria [195, 196].

Pel que fa als nostres resultats d'activitat LPL en els tipus de WAT estudiats, epididimal i retroperitoneal, hem corroborat que per a obtenir una diferència entre *lean* i *fafa* hem d'expressar aquesta activitat per *fat pad* [259-262, 289-291]. Si expressem l'activitat LPL per gram de teixit no hi ha diferències significatives entre les rates obeses i primes [259, 261, 290, 292]. En principi, també seria possible expressar l'activitat LPL per cèl·lula per veure diferències significatives ja que en les Zucker obeses està descrit que les cèl·lules del teixit adipós tenen hipertròfia i també hi trobem hiperplàsia [258, 259, 289, 293].

D'altra banda, en el cas de les rates Zucker *fafa* no ha fet falta coprecipitar l'LPL amb BSA per poder-la detectar per 2DE, com sí era necessari en les mostres de WAT procedents en d'altres individus obesos (dones i rates obeses per dieta de cafeteria). L'activitat LPL per gram de teixit dels homogenats de l'rWAT de les Zucker *lean* i *fafa* era elevada i similar, 195 i 217 mU/g tx, respectivament. En canvi, en els homogenats de l'scWAT de les dones normopes i obeses vam trobar una activitat LPL per gram de teixit inferior en les obeses, 72 i 15 mU/g tx, respectivament. En la mateixa línia vam trobar que en els homogenats de l'rWAT de les rates control i obeses per dieta de cafeteria l'activitat LPL per gram de teixit era inferior en les obeses, 169 i 29 mU/g tx, respectivament. És a dir, en els homogenats amb una activitat LPL per gram de teixit inferior a 30 mU/g tx (dones obeses i rates obeses per dieta de cafeteria) no ha estat possible enfocar les isoformes sense, abans, coprecipitar l'LPL amb BSA. De manera general, doncs, podem dir que si hi ha menys activitat LPL (i probablement menys proteïna LPL) per gram de teixit, la precipitació de la proteïna i el seu posterior enfocament mitjançant 2DE són més complicats.

Tal i com havíem vist en les rates Wistar en l'estudi de l'obesitat induïda per dieta de cafeteria, amb les rates Zucker hem tornat a constatar que l'rWAT presenta isoformes de MW aparent a part de les isoformes de pI. Tal i com ja havíem comentat, aquestes isoformes podrien ser degudes a una glicosilació de l'LPL en aquest teixit. En un estudi realitzat en WAT de rates Zucker en el nostre grup [294], s'evidenciava que l'HL, enzim que pertany a la mateixa subfamília de lipases que l'LPL, presentava dues isoformes de MW aparent i s'especulava amb la possibilitat que poguessin ser degudes a diferents graus de glicosilació de la proteïna. Així, podria ser que com a mínim l'LPL i l'HL, ambdues de la TLGS, presentessin diferents graus de glicosilació en el WAT. L'altre membre de la TLGS, l'EL, presenta tres isoformes però són degudes a la maduració alternativa d'mRNA. La isoforma predominant és una forma glicosilada de 68 kDa, les altres dues deriven de la maduració alternativa de l'mRNA de la predominant resultant dues isoformes de 46 i 38 kDa, respectivament, que no tenen activitat lipasa com la predominant [295].

El mètode de l'SS ens ha servit en aquest estudi per comprovar que totes les isoformes de l'LPL en l'rWAT de les rates Zucker (obeses i primes) són actives. Com ja hem comentat en la discussió de l'obesitat mòrbida, el fet de visualitzar amb el mètode de l'SS que totes les isoformes són actives i no haver diferències amb el patró trobat mitjançant la tècnica de WB queda justificat pels estudis previs fets per Bergo *et al.* [282], els quals postulaven una relació entre l'activitat LPL total i la massa total de proteïna LPL. De la mateixa manera que no vàrem poder comparar els nivells d'activitat de cada isoforma entre elles en els resultats obtinguts amb les dones normopès i les obeses, tampoc ho hem pogut fer en l'estudi d'obesitat induïda per modificació genètica. La justificació és la mateixa que hem donat en la discussió de les mostres humanes: l'activitat LPL incubada amb l'SS no era la mateixa en ambdós grups d'estudi, no podem conèixer si totes les isoformes tenen la mateixa afinitat pel GR de l'SS ni tampoc si l'ER de l'SS és reconegut per igual per totes elles i tampoc tenim la certesa de que el *tag* emeti sempre la mateixa intensitat de senyal fluorescent. Per poder comparar l'activitat lipolítica entre les isoformes de l'LPL i veure possibles diferències en quant a nivells d'activitat podríem: posar al punt alguna tècnica que ens permetés separar les isoformes i poder valorar l'activitat LPL pel mètode radioquímic de manera individual o bé, augmentar el nombre de rèpliques de 2DE-SS per a que poguéssim, per densitometria, quantificar la fluorescència emesa i estadísticament tinguéssim la certesa de que cada isoforma emet sempre la mateixa.

Com en l'estudi de les rates obeses per dieta de cafeteria, no veiem diferències entre les Zucker obeses i les control pel que fa al nombre d'isoformes i els seus pI. No obstant, l'abundància relativa de les mateixes sembla, un altre cop, tenir una tendència a desplaçar-se cap a la zona més bàsica en la situació d'obesitat. Si ens fixem en les Zucker *lean* la quantitat relativa de les isoformes tendeix a estar més igualada en tot el rang de pH on es troben (43% zona àcida-neutra, 57% zona bàsica). En les Zucker *fafa*, en canvi, tendeix a desplaçar-se cap al rang bàsic (36% zona àcida-neutra, 64% zona bàsica). De la mateixa manera que amb l'altre model murí d'obesitat, ens preguntem si l'experiment s'hagués perllongat una

mica més en el temps aquest desplaçament cap a la zona bàsica de les isoformes en les rates obeses seria o no més evident.

4.3.5 Conclusions

Obesitat en humans

- ✓ Hem descrit, per primera vegada, l'existència d'isoformes de pI de l'LPL en el WAT subcutani (scWAT) de dones normopès i d'obeses mòrbides.
- ✓ Sorprenentment, el nombre d'isoformes en l'scWAT és molt més baix que el trobat en altres fluids humans i teixits de rata. Hem hipotetitzat que la troballa de només dues isoformes de pI de l'LPL en el rang bàsic de pH en les dones obeses pot ser degut a: (i) la dificultat de precipitació i enfocament de la proteïna per la baixa activitat LPL del teixit i pel fet de tractar-se de mostres d'obesitat i/o (ii) la tendència de trobar una abundància relativa major en el rang bàsic de pH en la situació d'obesitat.
- ✓ Totes les isoformes de pI de l'LPL, provinents d'una purificació parcial mitjançant cromatografia d'afinitat a HS, de l'scWAT de dones normopès i obeses mòrbides són actives.
- ✓ Hem suggerit que existeix un augment de l'activitat LPL en l'scWAT de les dones obeses respecte les normopès, sempre que s'expressessin els valors respecte tot l'scWAT i no per gram de teixit.
- ✓ Com a futura optimització en l'abordatge experimental de mostres de WAT d'obesos:
 - L'scWAT no és el teixit més adequat per estudiar l'obesitat, en un futur seria convenient, treballar amb el WAT visceral ja que és el que es relaciona directament amb la síndrome metabòlica.
 - L'LPL purificada parcialment per cromatografia d'afinitat a HS provinent de WAT d'individus obesos cal coprecipitar-la amb alguna altra proteïna per tal de visualitzar-la per 2DE. Aquest pas no és necessari en els individus normopès i se'n desconeix el motiu.

Obesitat induïda per dieta de cafeteria

- ✓ Hem descrit, per primera vegada, l'existència d'isoformes de pI i, també, de MW aparent de l'LPL en el WAT retroperitoneal (rWAT) de rata femella de la soca Wistar.
- ✓ Les isoformes de pI de l'LPL de les rates obeses per dieta de cafeteria estan més representades en la zona bàsica de pH, mentre que les de les rates control tenen una representació molt similar en tot el rang.
- ✓ Com a futura optimització en l'abordatge experimental d'aquest model d'obesitat:

- Caldria allargar el temps d'estudi (mínim 180 dies) amb una dieta de cafeteria per tal de veure una major activitat LPL en el WAT de les rates obeses i, conseqüentment, una probable major abundància de les isoformes d'LPL al rang bàsic de pH.

Obesitat induïda per modificació genètica

- ✓ Respecte a la caracterització d'aquest model d'obesitat podem dir que:
 - Existeixen paràmetres inequívocs de classificació de les rates Zucker en obeses o primes com: el pes corporal, la quantitat d'ingesta, la relació entre la suma total dels pesos dels teixits adiposos respecte al pes corporal de l'animal, els TAG plasmàtics i els nivells d'activitat LPL per paquet de greix (*fat pad*).
 - Amb aquest estudi verifiquem el fet que per a veure diferències significatives d'activitat LPL entre les rates Zucker obeses i les primes cal expressar-la per *fat pad* i no per gram de teixit.
 - La glucèmia no és un paràmetre fiable per la classificació de les rates Zucker.
- ✓ Hem descrit, per primera vegada, l'existència d'isoformes de pI i, també, de MW aparent de l'LPL en l'rWAT de rata mascle de la soca Zucker.
- ✓ Les isoformes de pI de l'LPL de les rates obeses per modificació genètica estan més representades en la zona bàsica, mentre que les de les rates primes tenen una representació molt similar en tot el rang de pH. Això coincideix amb el resultat obtingut en el WAT del model d'obesitat per dieta de cafeteria.
- ✓ Totes les isoformes de l'LPL (tant de pI com de MW aparent), provinents d'una purificació parcial mitjançant cromatografia d'afinitat a HS, de l'rWAT de rates Zucker són actives.

Conclusions comunes en els estudis d'obesitat

- ✓ És la primera vegada que es descriuen isoformes de pI i de MW aparent de l'LPL en l'rWAT de rata.
- ✓ Les isoformes de l'LPL provinents de la situació d'obesitat amb una baixa activitat LPL per gram de teixit (rates amb obesitat induïda per dieta de cafeteria i humanes amb obesitat mòrbida) són més difícils de precipitar i d'enfocar per 2DE que les provinents de la situació control. Aquest comportament metodològic no s'observa en mostres de WAT de no obesos i se'n desconeix el motiu.

- ✓ Hem comprovat que totes les isoformes de l'LPL, tant de pI com de MW aparent, provinents d'una purificació parcial per cromatografia d'afinitat a HS, són actives.
- ✓ En general, amb l'obesitat, hi ha una major quantitat relativa d'isoformes amb pI bàsic.

V. DISCUSSIÓ GLOBAL

L'enzim **lipoproteïna lipasa (LPL)** és un enzim àmpliament distribuït a l'organisme i és clau en el metabolisme lipídic. La seva funció principal és la hidròlisi de triacilglicèrids (TAG) circulants que formen part de quilomicrons (QM) i/o lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL). L'enzim està sotmès a una regulació específica de teixit de manera que diferents situacions fisiològiques o patològiques modulen la seva activitat lipolítica en diferents teixits, redirigint així el flux de TAG circulants de l'organisme. Degut a l'acció enzimàtica de l'LPL els teixits capten àcids grassos no esterificats (NEFA) que utilitzen com a font d'energia o bé emmagatzemen, depenent de la naturalesa del teixit. L'LPL es troba en la seva forma madura i activa en la superfície luminal de l'endoteli capil·lar de la majoria de teixits extrahepàtics de l'organisme, de manera més important s'expressa als teixits adiposos blanc i marró (WAT i BAT), la glàndula mamària alletant, la musculatura esquelètica i el cor.

Aquesta tesi s'inicia a partir del descobriment, realitzat en el nostre grup de recerca, que l'LPL no és una sola proteïna sinó un conjunt d'isoformes de diferent punt isoelèctric (pI) i mateix pes molecular (MW) aparent [180]. En el nostre grup, preteníem explorar diferents aspectes relacionats amb aquesta descoberta com per exemple conèixer la distribució tissular de les isoformes de l'LPL en diferents espècies, l'origen molecular de les isoformes, les seves característiques funcionals, etc. Per intentar abastar tots aquests aspectes, es van iniciar dues tesis doctorals que van anar de la mà en tot el seu recorregut, la tesi d'en Pere Carulla [181] i la present tesi.

La descoberta de les isoformes de pI de l'LPL es va fer en cor i plasma post-heparínic (PHP) de rata [180] i, més tard, també en teixit adipós de rata i macaco [181]. Seguint en la caracterització de la distribució de les isoformes tant en diferents espècies com en teixits, en aquesta tesi ens vam proposar com a primer objectiu determinar si les isoformes de l'LPL existien també en l'espècie humana, ja que la seva presència podria ser rellevant en l'estudi clínic de l'enzim. Hem confirmat l'existència d'un mínim de vuit **isoformes de pI de l'LPL en el PHP d'humans**. En aquest estudi en humans, hem descartat la possibilitat de que l'origen molecular de les isoformes de l'LPL pugui ser degut només a variacions al·lèliques (en el cas de la rata [181], es va descartar totalment aquesta opció estudiant un únic teixit d'un sol individu), ja que es presenten més de dues isoformes sempre en un únic individu.

Vàrem realitzar la primera aproximació a l'estudi de la possible presència de les isoformes en humans utilitzant PHP perquè és una mostra que es pot obtenir de manera poc invasiva. A més, tenint en compte que l'LPL present al PHP està considerada com un recull de la forma madura de l'enzim de tots els teixits de l'organisme, la troballa al PHP ens indicaria que les isoformes de pI provenien probablement de diferents teixits en relació amb l'àmplia distribució de la proteïna en l'organisme. I encara més, com ja havíem caracteritzat les isoformes del PHP de rata [180], podríem fer una **comparació entre espècies**.

La Figura 73. mostra que els patrons de les isoformes de pI de l'LPL del PHP de rates mascle i d'homes són similars, però no idèntics. Encara que el rang de pH en els dos patrons es mou entre els mateixos valors, l'abundància relativa de les isoformes de l'espècie humana és més alta en la zona bàsica de pH (al voltant de 8,00) i en l'espècie murina té una major representació en una zona de pH una mica més neutra (al voltant de 7,50). Tenint en compte que considerem el PHP com una mostra que recull l'LPL madura de tot l'organisme, el fet de trobar diferències en el patró d'isoformes en aquest fluid entre ambdues espècies suggereix que algun o alguns teixits de les dues espècies presenten un patró d'isoformes diferent o bé, que les diferències són degudes a la situació fisiològica en la que es troba cada espècie estudiada (com per exemple el dejuni/ingesta [181]).

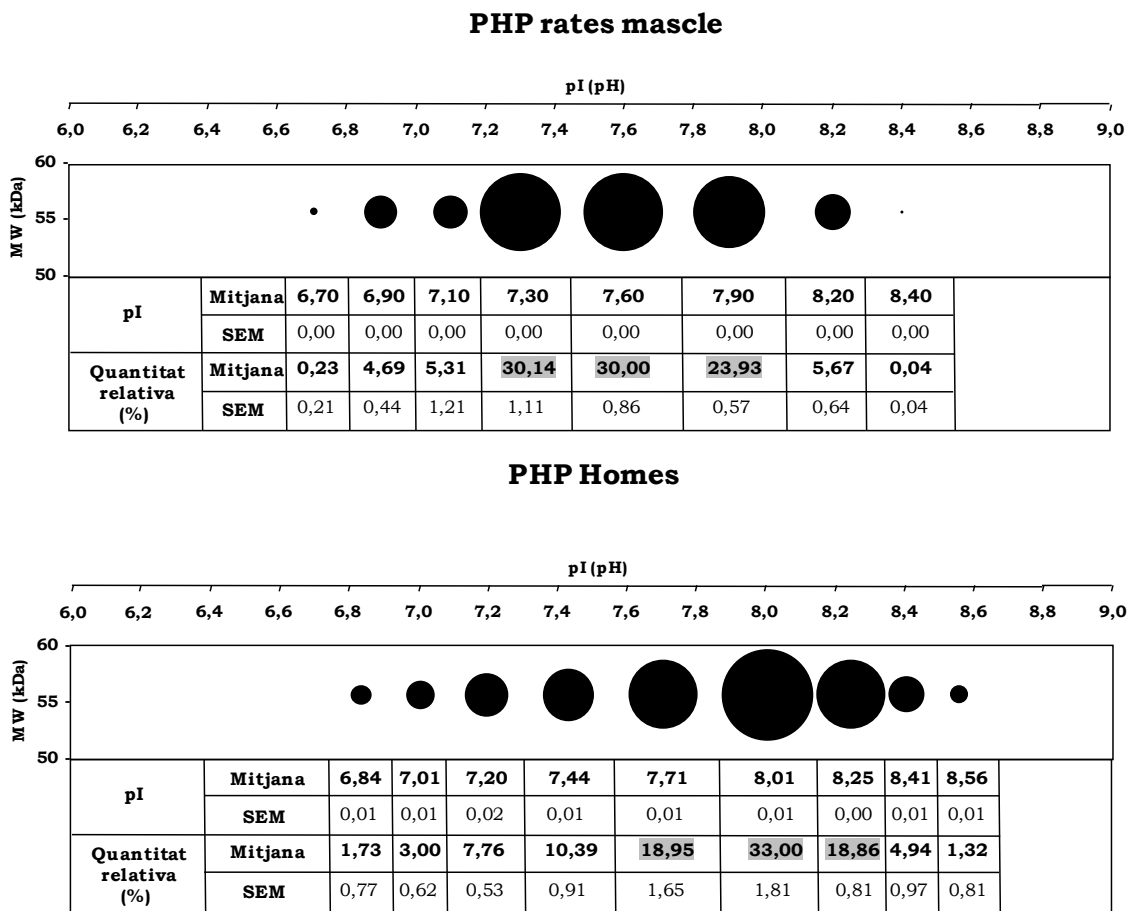


Figura 73. Comparativa del pI i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el plasma post-heparínic de rates mascle (A) i homes (B). Patró d'isoformes de l'LPL del (A) PHP de la Figura 47. (A) i del (B) PHP de la Figura 27.. La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 8 isoformes; B, total 9 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb el seu pI i el seu MW. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques del PHP de rates mascle i de 4 rèpliques biològiques del PHP d'homes. MW = Pes molecular aparent.

Segons un article recent [296], l'activitat LPL trobada en el PHP d'un mateix gènere varia entre diferents espècies (ratolí, rata i conill). En aquest treball, el valor obtingut d'activitat LPL del PHP d'humans ha estat de 111 mU/mL i la de rates 21 mU/mL. Aquest resultat està en consonància amb la variació trobada en el treball mencionat. De manera que les diferències d'activitat LPL observades en diferents espècies podrien estar relacionades amb les diferències que hem descrit en la distribució de les isoformes de pI de l'LPL del PHP d'humans i de rates. La diferència observada entre les dues espècies, podria indicar una lleugera divergència de les isoformes d'aquesta proteïna a nivell d'espècie. Per contrastar aquesta hipòtesi, caldria un estudi comparatiu de la distribució tissular de les isoformes de pI de l'LPL entre les dues espècies.

Com hem descrit abans, un altre aspecte a explorar relacionat amb l'existència de les isoformes, era la seva **caracterització funcional**. Actualment, no disposem de cap eina metodològica que ens permeti estudiar les isoformes de forma individual i, per tant, tampoc la seva funció individual. Per avançar en l'estudi de possibles diferències funcionals entre les isoformes de pI de l'LPL, vàrem realitzar aproximacions indirectes estudiant situacions fisiològiques o patològiques, en humans, en les quals l'LPL està regulada i té un rol clau a nivell funcional. Està descrit que l'expressió i l'activitat LPL depenen del teixit i de la situació fisiològica en la que es trobi l'animal [13], de manera que les isoformes també en podrien dependre.

La primera de les aproximacions estudiades en aquest treball, va ser la **situació fisiològica de l'alletament**. Vam escollir aquesta situació perquè està descrit que l'LPL és un enzim clau en la distribució dels TAG circulants cap a la glàndula mamària alletant per a la síntesi de llet [87]. Per a realitzar aquesta aproximació funcional en l'alletament era necessari comparar els patrons d'isoformes de pI de l'LPL en un teixit i dos fluids implicats en el procés d'alletament: la llet, la glàndula mamària alletant i el PHP. S'ha descrit una elevada activitat LPL tant en la llet humana [88] com en la de rata [89], ara bé, també s'ha descrit que l'enzim sembla que no té cap funció en la llet i que només és un excedent procedent de la glàndula mamària alletant [90, 91]. Amb la voluntat d'estudiar la distribució de les isoformes de pI de l'LPL en diversos tipus de mostres humanes, vàrem iniciar aquesta aproximació analitzant les possibles isoformes de l'LPL en la **llet materna humana**. Hem descrit fins a vuit isoformes de pI de l'LPL en la llet de quatre donants amb un rang de pH d'entre 6,75 i 8,25, trobant-se les isoformes amb una major quantitat relativa en la zona neutra de pH. Els patrons d'isoformes de cada donant són molt similars entre ells, la qual cosa suggereix que el patró de les isoformes de pI de l'LPL de la llet humana està altament conservat. A més, hem avançat una mica més en l'**origen de les isoformes de pI de l'LPL**. En la tesi de Pere Carulla [181], es va descriure que un sol cor de rata presentava més de dues isoformes de pI, indicant això, que les isoformes no són degudes a variants al·lèliques ni tenen un origen multi-orgànic. Per tant, que el seu origen és degut, molt possiblement i de manera exclusiva, a modificacions

post-traduccionals (PTM). Ara, corroborem aquest resultat en humans, ja que en cada mostra de llet (provinent d'un únic teixit) d'una sola donant existeixen més de dues isoformes. Així doncs, en el nostre grup de recerca, hem estudiat els possibles orígens de les heterogeneïtats d'aquestes isoformes de l'LPL conclouent que: no corresponen a formes intermèdies de maduració intracel·lular, no són degudes a variacions al·lèliques, no tenen un origen multi-orgànic i l'origen no es pot atribuir a fosforilacions de la proteïna però, en part, sí que es pot explicar per diferents graus de glicosilacions [180, 181].

La naturalesa glicoproteica de l'LPL suggereix que la diversitat de les estructures glicosilades adjuntes podria explicar l'heterogeneïtat de pI observat. No obstant, la deglicosilació només redueix parcialment el nombre d'isoformes de pI de l'LPL en la rata [180] i en macaco [181], indicant que hi ha altres PTM involucrades. Hem de remarcar que l'LPL humana i de rata tenen 2 i 3 llocs de glicosilació predits, respectivament (utilitzant NetNGlyc 1.0, Centre for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Dinamarca), exclouent un lloc potencial, present en ambdues espècies, amb la seqüència Asn-Pro-Ser que és rarament glicosilada en eucariotes [13]. Segons això, esperariem un major nombre d'isoformes en rata que no pas en humans. En canvi, el nombre d'isoformes que es troben en ambdues espècies és molt similar, indicant que altres PTM (diferents a la glicosilació) contribueixen a l'heterogeneïtat de pI observada. La fosforilació proteica és una PTM que s'ha associat prèviament a isoformes de pI d'altres proteïnes [297]. En el nostre grup d'investigació vàrem demostrar que la fosforilació no contribueix a l'heterogeneïtat de pI de l'LPL en rata [180] ni en macaco [181]. En un altre estudi realitzat pel nostre grup, vàrem identificar residus nitrats de tirosina en l'LPL de rata en resposta a una estimulació amb LPS [82], demostrant que l'LPL pot estar sotmesa a altres PTM *in vivo*.

Per tant, la nitració de tirosines o l'acció d'altres PTM encara no identificades poden contribuir potencialment a l'heterogeneïtat de pI de l'LPL. Calen més estudis per elucidar les diferències moleculars entre les diferents isoformes de pI de l'LPL. Com que les PTM poden induir un canvi de pI, la diferència de pI entre les isoformes de l'LPL podria proporcionar la primera pista sobre el possible **origen molecular** d'aquesta heterogeneïtat.

No podíem continuar l'estudi de caracterització funcional de les isoformes en l'al·letament en humans perquè, per raons òbvies, era impossible obtenir glàndula mamària al·letant humana. Per obtenir-la, haguéssim hagut de recórrer a mastectomies però aquestes segurament estarien indicades per algun tipus de càncer de mama. Ja hem comentat, en la introducció d'aquesta tesi, que l'LPL pot tenir alguna influència en la leucèmia limfocítica crònica [168] i, també en té en el càncer de mama i el liposarcoma [298, 299], així, que no haguéssim pogut considerar aquestes mostres com controls del nostre estudi. És per aquest motiu, que vàrem traslladar aquest estudi d'aproximació funcional a la rata. L'anàlisi de les isoformes de l'LPL en la **llet de rata** ens va dur a un descobriment inesperat. En la llet de rata hem observat, a part d'isoformes de pI, **isoformes de MW aparent**. De manera, que hem descrit un primer conjunt

de cinc isoformes de pI amb un MW aparent de 56,2 kDa (el MW aparent esperat per l'LPL) i un segon conjunt de, també, cinc isoformes de pI amb un MW aparent de 62,5 kDa (MW aparent aproximadament un 10% superior a l'esperat). Pensem que aquestes isoformes de MW aparent, en part poden tenir el seu origen en la glicosilació. A més, de la mateixa manera que la lipasa sensible a sals biliars present en la llet humana presenta isoformes de MW aparent amb diferent grau de glicosilació, implicant això una preservació de les formes actives de l'enzim [255], en rata, les isoformes de MW aparent de l'LPL (probablement degudes a un alt grau de glicosilació) podrien tenir una implicació funcional similar.

Vàrem continuar l'estudi d'aproximació funcional analitzant l'LPL de la **glàndula mamària alletant de rata**. Hem descrit fins a cinc isoformes de pI de l'LPL en la glàndula mamària alletant que es troben en un rang de pH d'entre 6,90 i 7,90. Tenint present que en treballs anteriors, s'ha especulat que l'LPL trobada a la llet materna és un excedent de la que presenta la glàndula mamària alletant o bé, hi és deguda a filtracions procedents de la glàndula, haguéssim esperat trobar un patró similar d'isoformes en la llet i en la glàndula mamària alletant, ja que el de la llet hauria d'incloure part, o totes, de les isoformes presents en la glàndula mamària alletant. Hem descrit, però, dos patrons que no són coincidents: la glàndula mamària alletant no presenta isoformes de MW aparent de l'LPL i les isoformes amb una major quantitat relativa en la llet es troben en la zona bàsica de pH i en la glàndula mamària alletant en la zona neutra. Tot això, ens suggereix que l'LPL de la llet pateix alguna o algunes PTM (una d'elles molt probablement la glicosilació) en la transició de la glàndula mamària a la llet o bé, en la mateixa llet. Plantegem doncs que existeix una possible regulació post-traducciona de les isoformes de l'LPL en la situació fisiològica de l'alletament.

Existeix una transdiferenciació (diferenciació d'un tipus cel·lular a un altre, de manera directa o amb divisions cel·lulars, que difereix de la diferenciació de cèl·lules progenitores), d'adipòcits a cèl·lules epitelials secretores, reversible i fisiològica del WAT mamari a glàndula mamària alletant en l'adult [256]. En aquest context, proposariem futurs experiments per estudiar la **diferenciació** del WAT mamari de rata verge a glàndula mamària de rata alletant (passem d'unes poques cèl·lules epitelials disperses a que siguin les majoritàries en el teixit [223]), per determinar si canvia el patró d'isoformes de l'LPL en aquest procés de diferenciació.

Per finalitzar l'estudi d'aproximació per a la caracterització funcional de les isoformes utilitzant la situació fisiològica de l'alletament, hem descrit la presència de tres grups d'isoformes de diferent MW aparent (56,2; 58,5 i 64,2 kDa), amb diverses isoformes de pI cadascun, en el **PHP de les rates alletants**. Era necessari estudiar el patró de les isoformes de l'LPL en el PHP de les rates alletants perquè l'LPL que es sintetitza a les cèl·lules epitelials de la glàndula mamària alletant és secretada a la llet o dirigida a les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis de la mateixa glàndula [45]. A més, aquest fluid podria tenir molta presència de les isoformes de la glàndula mamària, molt abundant i representativa en la femella alletant.

Només hem trobat coincidència, en pI i MW aparent, entre dues isoformes de la glàndula mamària alletant i dues isoformes del PHP de les alletants. Aquest fet suggereix que és molt complicat realitzar una associació directa entre les isoformes presents al PHP i el seu teixit d'origen.

Per ampliar aquesta aproximació funcional, hem descrit, en el **PHP de rates femella verges**, la presència de fins a vuit isoformes de pI de l'LPL, situades en un rang de pH d'entre 6,40 i 8,10 i amb un MW aparent de 56,2 kDa, i dues isoformes a la banda més àcida del rang de pH amb un MW aparent de 62,5 kDa. Aquesta caracterització ens ha servit per comparar el patró de les seves isoformes amb el patró generat per les isoformes de l'LPL del PHP de les rates alletants. Hem comprovat diferències entre ambdós patrons degudes, possiblement, a la presència de les isoformes de l'LPL procedents de la glàndula mamària alletant en el PHP de les alletants. A més, suggerim que l'existència d'isoformes de MW aparent de l'LPL al PHP de les rates alletants i verges és deguda a PTM, possiblement a diferents graus de glicosilació, que ha patit la proteïna en el seu teixit de procedència. I encara més, la major complexitat observada en el patró de les isoformes de l'LPL del PHP de les alletants comparada amb la de les verges, suggereix que existeix una regulació específica de teixit de l'enzim en l'alletament.

La segona de les aproximacions estudiades, en aquest treball, va ser la **situació patològica de l'obesitat**. Està àmpliament descrit que l'LPL és d'una importància cabdal en l'obesitat [12] i que la seva activitat enzimàtica, tant en humans com en rates, està augmentada en els individus que presenten aquesta patologia [13]. En aquest sentit, la comparació entre individus normopès i obesos mòrbids, de les possibles isoformes de pI de l'LPL del WAT ens permetria avançar de manera indirecta en la caracterització funcional de les mateixes. A més, amb l'estudi de les isoformes de l'LPL al WAT avançaríem en la descripció de la distribució tissular de les isoformes en humans.

El WAT relacionat directament amb la síndrome metabòlica, és el WAT visceral (vWAT) [188, 189]. Degut a la impossibilitat d'obtenir aquest tipus d'adipòs en els individus controls, vàrem utilitzar l'adipòs subcutani (scWAT). També hem de remarcar que encara que, a priori, pensàvem realitzar l'estudi en ambdós gèneres, home i dona, durant el temps destinat a la recollida de mostres humanes no vàrem obtenir cap mostra d'scWAT d'home voluntari normopès. De manera que l'estudi s'ha realitzat en l'scWAT de dones.

Hem descrit l'existència d'un mínim de cinc isoformes de pI de l'LPL en l'**scWAT de dones** normopès amb un rang de pH d'entre 7,20 i 8,35, tenint la isoforma majoritària un pI neutre. En l'scWAT de dones obeses hem descrit dues isoformes de pI de l'LPL amb un pI de 8,15 i 8,35. Hem tingut dificultats per a enfocar per 2DE les isoformes de l'LPL provinents de les mostres d'scWAT d'humanes, sobretot les provinents de mostres d'obeses. Està descrit que l'activitat LPL en l'scWAT de dones és inferior a la d'altres tipus d'adipòs [281]. La baixa activitat LPL trobada en els homogenats d'ambdues mostres, sobretot en el cas de les mostres

d'obeses, està en consonància amb aquests resultats previs. Suggerim que la baixa activitat LPL, en aquest teixit, és la causa dels problemes que hem tingut en l'enfocament de les isoformes, sobretot en el cas de les obeses. Tot i que el tipus de WAT no era el més adequat per l'estudi d'aquesta patologia i les dificultat per enfocar per 2DE les isoformes de l'LPL, hem proposat que en l'obesitat mòrbida en humans les isoformes de pI de l'LPL tendeixen augmentar la seva quantitat relativa al rang bàsic de pH.

Degut a la impossibilitat d'obtenir el vWAT en els individus humans control, vàrem ampliar l'estudi d'aproximació funcional de les isoformes en l'obesitat a dos models experimentals d'obesitat en rata: rates Wistar amb inducció a l'obesitat per dieta de cafeteria i rates Zucker amb inducció a l'obesitat per modificació en el gen del receptor de la leptina. El WAT utilitzat en ambdós models murins d'obesitat va ser el retroperitoneal (rWAT). Abans de descriure i discutir els resultats trobats, hem d'esmentar un problema metodològic que, com acabem d'explicar, vàrem tenir sobretot en el cas del WAT de les dones obeses: el problema d'enfocament per 2DE de les isoformes en mostres amb baixa activitat LPL. En les mostres de WAT de les rates Wistar obeses induïdes a l'obesitat per dieta de cafeteria, vàrem observar el mateix problema, no així en les rates Wistar control. En canvi, en cap de les rates del model d'obesitat per modificació genètica (Zucker *fafa* i *lean*) vàrem tenir problemes d'enfocament. En resum, en les mostres de WAT amb una activitat LPL per gram de teixit inferior a 30 mU/g tx (dones obeses i rates obeses per dieta de cafeteria) no ha estat possible enfocar per 2DE les isoformes de l'LPL. Vam solucionar aquest inconvenient amb la posada al punt de la **coprecipitació** del nostre *pool* d'LPL amb albúmina sèrica bovina lliure d'àcids grassos.

Vàrem realitzar l'estudi d'aproximació funcional de les isoformes utilitzant el model murí d'**inducció a l'obesitat per dieta de cafeteria** en rates Wistar femelles. En l'rWAT de les femelles controls, hem descrit fins a nou isoformes de pI de l'LPL amb un rang de pH d'entre 6,60 i 8,35 i un MW aparent de 56,2 kDa. A més, també hem descrit quatre isoformes amb un MW aparent de 62,5 kDa i uns pI situats en els extrems del rang de pH (6,60 i 6,75; 8,17 i 8,35). En el cas de l'rWAT de les rates femella obeses per dieta de cafeteria, hem descrit un altre cop nou isoformes de pI de l'LPL amb el mateix rang de pH i el mateix MW aparent que en les control. A més, també hem descrit cinc isoformes amb un MW aparent de 62,5 kDa i uns pI gairebé idèntics als de les rates control (la cinquena isoforma extra amb un pI de 7,90). La diferència entre els conjunts d'isoformes de MW aparent és de 6,3 kDa, un 10% aproximadament. Suggerim que aquesta diferència és deguda a la glicosilació de la proteïna però caldria comprovar-ho mitjançant la deglicosilació de la proteïna. La comparació dels patrons de les isoformes de l'LPL entre les rates controls i les obeses ens mostra que no hi ha diferència quant a nombre d'isoformes ni en la distribució per pI o per MW aparent. Ara bé, hem descrit canvis en la quantitat relativa de les isoformes entre els grups estudiats. En les rates control les isoformes es troben en una major quantitat relativa en la zona de pH àcid-neutre, mentre que en les obeses per dieta de cafeteria tenen una tendència a desplaçar-se cap a la zona bàsica de pH. Aquest resultat està en consonància amb l'obtingut per les mostres d'scWAT de dones obeses.

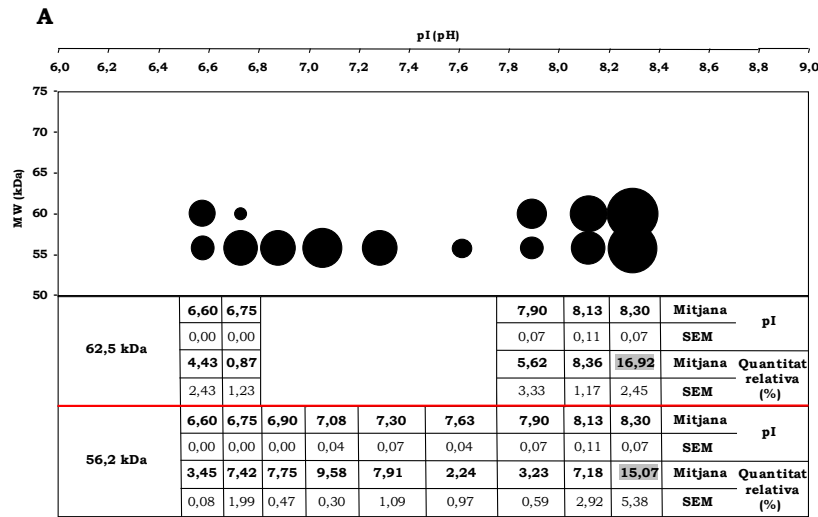
L'estudi indirecte per la caracterització funcional de les isoformes de l'LPL pel model murí d'**inducció a l'obesitat per modificació genètica** el vam realitzar amb rates mascle Zucker. Hem descrit en l'rWAT d'ambdós grups d'estudi (lean i fafa) un mínim de vuit isoformes de pI amb un rang de pH d'entre 6,80 i 8,30 i amb un MW aparent de 56,2 kDa. A més, també hem descrit, en ambdós grups, dues isoformes amb pI bàsic i MW aparent de 62,5 kDa. De la mateixa manera que en la comparativa entre els patrons d'isoformes d'LPL de rates control i obesas del model d'obesitat per dieta de cafeteria no vam observar diferències en el nombre d'isoformes ni en els seus pI o els seus MW aparents, en el model de les rates Zucker induïdes a l'obesitat per modificació genètica tampoc les hem observat. I, a més, la quantitat relativa de les isoformes torna a tenir una major representació en la zona bàsica de pH en l'obesitat.

Aquesta tendència a augmentar la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL amb pI bàsic en l'obesitat, reproduït en els tres models d'obesitat estudiats (model humà d'obesitat mòrbida, model murí d'inducció a l'obesitat per dieta de cafeteria i model murí d'inducció a l'obesitat per modificació genètica) com mostra la Figura 74., ens suggereix, de manera indirecta, que existeix una **diversitat funcional** de les isoformes de l'LPL en l'obesitat.

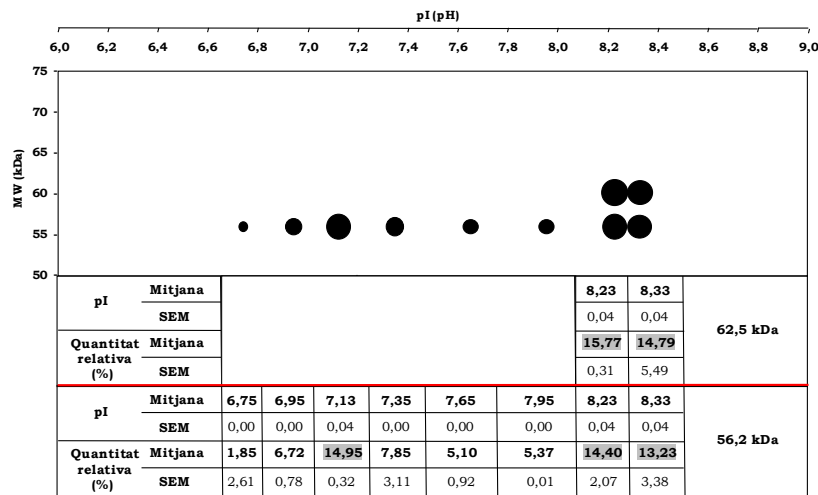
En la literatura podem trobar exemples d'altres proteïnes les isoformes de les quals són diferents en relació a l'obesitat. Per exemple, la lipasa sensible a hormones té dues isoformes de MW aparent (130 i 85 kDa) en l'esperma d'homes normopès [300]. Ara bé, en individus obesos no trobem la isoforma de 130 kDa. Els autors, expliquen que la falta d'aquesta isoforma en obesos comporta una baixa hidròlisi d'èsters de colesterol afavorint la seva acumulació en el citoplasma dels espermatozous que podria contribuir a una lipotoxicitat i a la infertilitat. Un altre exemple, en aquest cas d'isoformes de pI, el trobem en la proteïna DJ-1 en ratolins, el patró d'isoformes de la qual es veu modificat quan els animals segueixen una alimentació rica en greixos [301]. Amb aquesta dieta augmenta la quantitat relativa d'una de les isoformes de la DJ-1 i a més, s'ha descrit, en cervell i altres teixits perifèrics, que les isoformes de pI de la DJ-1 tendeixen a ser més àcides. Aquest canvi en el pI de les isoformes s'explica per dues PTM en un mateix residu, l'oxidació d'una cisteïna i la modificació d'un grup succinil.

Tots aquests exemples suggereixen que la variació observada en el patró de les isoformes de l'LPL (l'augment de la quantitat relativa d'isoformes amb pI bàsic en el cas dels subjectes obesos), com podem observar en la Figura 74., ha de tenir alguna implicació funcional, així com s'ha suggerit en diferents situacions fisiològiques (dejuni i fred) en la tesi d'en Pere Carulla [181].

rWAT rata femella obesa per dieta de cafeteria



B rWAT fafa



scWAT humanes obeses

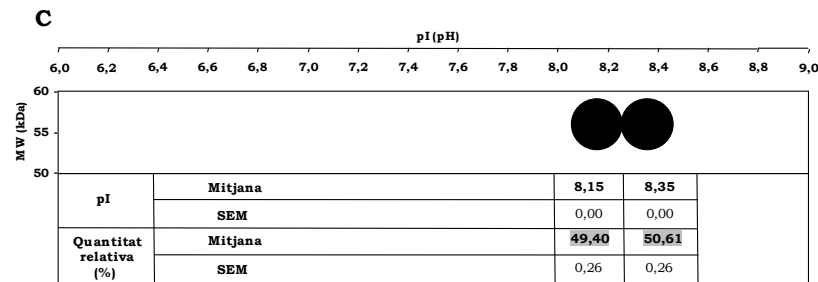


Figura 74. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rates femella obeses per dieta de cafeteria (A), rates mascle obeses per modificació genètica (B) i dones obeses mòrbides (C). Patró d'isoformes de l'LPL de (A) l'rWAT de la Figura 62. (B), de (B) l'rWAT de la Figura 72. (B) i de (C) l'scWAT de la Figura 58. (B). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 14 isoformes; B, total 10 isoformes; C, total 2 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correlaciona amb el seu pI i el seu MW. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 2 rèpliques tècniques de l'rWAT de rata obesa per dieta de cafeteria, de 2 rèpliques tècniques de l'rWAT de les fafa i de 2 rèpliques tècniques de l'scWAT de dones obeses. MW = Pes molecular aparent.

És conegut que l'activitat LPL de l'scWAT d'obesos mòrbids es restaura a nivells de normopès un any després d'haver-se sotmès a cirurgia bariàtrica i haver perdut pes [162]. Per tant, seria molt interessant poder realitzar un seguiment de l'evolució de les isoformes de l'LPL, en rates i en humans. Analitzar, primer, quin és el patró d'isoformes de l'LPL en el WAT d'individus o rates obeses i, un temps després d'haver estat operats per cirurgia bariàtrica i haver perdut pes, repetir l'anàlisi en els mateixos individus o rates. A priori, esperariem que la tendència que observem en una situació d'obesitat (un augment de la quantitat relativa de les isoformes bàsiques), es revertís i el patró de les isoformes fos més similar al trobat en una situació normopès.

Dins del context de la caracterització funcional de les isoformes i per avançar en el seu coneixement, en el nostre grup vam estudiar algunes de les **característiques funcionals** més rellevants de l'LPL, com ara l'activitat lipolítica i l'afinitat per heparina, en les seves isoformes. En la present tesi, hem estudiat l'activitat lipolítica de les isoformes de pI de l'LPL presents en el WAT de l'espècie humana i de les rates Zucker.

Per estudiar l'**activitat lipolítica** de cadascuna de les isoformes de l'LPL vàrem adaptar el mètode del substrat suïcida (SS) al nostre enzim. Convé destacar que amb l'adaptació del mètode de l'SS hem aconseguit l'eina que ens permet estudiar l'activitat de les isoformes de manera individual. Des de fa uns anys ens trobem en l'era de les "òmiques" (proteòmica, genòmica, lipidòmica, etc.) i estem bastant avesats a tenir un conjunt de dades proporcionades per totes les eines precises i sofisticades que tenim al nostre abast, però cal abordar també una interpretació funcional d'aquests resultats. Amb les isoformes de l'LPL ens trobem en aquest inici de donar resposta al perquè de cada isoforma, d'estudiar si la seva funció canvia en un estat fisiològic o patològic concret, o bé, si hi ha alguna relació amb la regulació específica de teixit de l'LPL. El mètode de l'SS ens ha obert doncs noves possibilitats per seguir estudiant l'LPL a nivell funcional.

Hem comprovat que totes les isoformes de pI de l'LPL del WAT que observem en el WB són funcionalment actives ja que són les mateixes que visualitzem amb el mètode de l'SS. Aquest fet, confirma la relació d'activitat LPL total, obtinguda després de la cromatografia d'afinitat a HS, amb la massa total de proteïna LPL [282].

El fet de que totes les isoformes de pI de l'LPL siguin actives corrobora la resolució i utilitat de la metodologia emprada per purificar parcialment l'LPL, la cromatografia d'afinitat a HS, entenent que totes les isoformes de pI que s'han alliberat a 1,50 M de NaCl són actives i dimèriques. Enguany, però, Beigneux *et al.* [302] han posat en dubte el paradigma de la dimerització de l'LPL com a requisit per a que la proteïna sigui estable i enzimàticament activa. De fet, en el seu estudi proposen que les formes monomèriques de l'LPL també són actives. Es basen en la demostració, per ultracentrifugació en gradient de densitat, que en la unió de l'LPL a la *glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein binding protein 1* (GPIHBP1) l'enzim té un MW aparent esperat per un

monòmer, aproximadament uns 55 kDa. A més, proposen una nova funció pel factor madurador de lipases 1 (LMF1), la de facilitar la secreció de l'LPL assegurant un correcte empaquetament dels seus monòmers. Aquests autors també reformulen la funció de regulació sobre l'LPL de la proteïna semblant a les angiopoïetines 4 (Angptl4), de forma que aquesta inactivaria l'enzim promovent el desempaquetament dels monòmers actius. Caldrien futures revisions sobre aquest estudi ja que la biologia cel·lular de l'LPL assumida fins ara canviaria substancialment.

Fins ara, determinats autors [13, 14, 37, 38] parlen d'homodimers d'LPL i mai d'heterodimers atès que fins fa relativament pocs anys es pensava que l'LPL era una única proteïna. Com ja hem comentat, els estudis realitzats pel nostre grup, van revelar que l'LPL presenta un conjunt d'isoformes de pI diferent amb un mateix MW aparent [180]. Aleshores, es planteja el dubte de si aquests dímers són tots homodimers (la mateixa isoforma de pI forma el dímer) o heterodimers (diferents isoformes de pI formen el dímer) o bé, si són una combinació d'homodimers i heterodimers.

En el grup de recerca, ens vam proposar també estudiar si les isoformes presentaven diferent **afinitat a l'heparina** per tal de poder-les separar durant la cromatografia d'afinitat a HS utilitzant gradients de NaCl que haguessin alliberat, de manera progressiva i gradual, les isoformes. Finalment, però, la hipòtesi d'aquest estudi funcional sobre la diferent afinitat a l'heparina de les isoformes de l'LPL no va resultar del tot certa tal i com apuntaven els resultats obtinguts en el treball experimental del Màster previ a l'inici d'aquesta tesi doctoral i com s'ha corroborat en la Tesi de Pere Carulla [181], en la qual s'ha demostrat que les isoformes del vWAT de macaco presenten una afinitat similar (que no idèntica) per heparina. A més, s'ha vist que la forma dimèrica i activa de l'LPL té fins a 6000 vegades més afinitat per l'heparina o els HSPG que les formes monomèriques i inactives, i aquest fet implica que la dimerització no només comporta major activitat sinó també una major unió a la superfície luminal de l'endoteli [33]. Per tant, fisiològicament parlant, tindria sentit que algunes isoformes de pI perdessin part de la seva afinitat ja que, a part de perdre activitat, també perdrien força d'interacció amb l'heparina o els HSPG implicant una desestabilització del dímer de la proteïna.

Aquesta particularitat, però, ens hagués permès treballar de manera individual amb les isoformes de pI aconseguint per exemple: una major cobertura a nivell de seqüència per cada isoforma de pI, conèixer de manera més acurada el valor del seu pI, conèixer si els dímers són homo o heterodimers o conèixer si totes les isoformes eren actives o si algunes ho eren més que d'altres aplicant el mètode radioquímic per cadascuna d'elles.

En aquesta tesi, hem trobat, de manera fortuïta i sorprenent, com les isoformes de l'LPL d'un mateix fluid i teixit varien entre **gèneres**. Per corroborar aquesta troballa hem estudiat i comparat el PHP i l'rWAT (PHP Figura 47. i rWAT Figura 63.) de rates mascle i femella.

Hem descrit que existeixen diferències en el patró de les isoformes de l'LPL del PHP de rates mascle i femella (veure Figura 47.). En el PHP de rates mascle trobem un conjunt de, com a mínim, 8 isoformes de pI en un rang de pH que va de l'àcid-neutre al bàsic (de pH 6,70 a 8,40) i amb un MW aparent de 56,2 kDa. En canvi, en el PHP de les femelles trobem, com a mínim, 10 isoformes de pI distribuïdes en dos MW aparents diferents. Les isoformes de pI trobades al MW aparent de 56,2 kDa estan distribuïdes en un rang de pH similar (6,40 a 8,10) al dels mascles, ara bé, les dues isoformes de pI amb un MW aparent de 62,5 kDa es troben en la part més àcida del rang (6,40 i 6,55).

També, hem descrit que existeixen diferències en el patró de les isoformes de l'LPL de l'rWAT de rates mascle i femella (veure Figura 63.). El rang de pH en el qual es troben les isoformes d'ambdós gèneres és similar però la distribució segons l'abundància relativa de cada isoforma divergeix. De manera que en les femelles les isoformes es distribueixen de manera similar en tot el rang de pH, en canvi, en els mascles hi ha una representació superior de les isoformes en la zona bàsica. A més, les isoformes de pI amb un MW aparent de 62,5 kDa en els mascles només es troben en la zona bàsica de pH, en canvi, en les femelles es troben en la zona bàsica i, també, en l'àcida.

En humans, fa anys que s'ha demostrat que existeix una diferència d'activitat LPL en el PHP d'homes i dones (superior en dones) [303]. També, s'ha demostrat que existeix un biaix en l'activitat LPL en el PHP d'individus amb deficiència gènica d'LPL heterozigots segons si es tracta d'homes o de dones, s'ha vist que el gènere femení té una menor activitat LPL [304]. Altres estudis demostren que existeix una diferència d'activitat LPL en sèrum segons gènere (menor activitat en homes) en pacients amb proteïnúria i anèmia falciforme [305]. A més, s'ha descrit que el gènere femení té una activitat LPL major que el masculí comparant diferents tipus de WAT (subcutani i visceral) [281].

En el nostre grup d'investigació, ja va quedar palès, en estudis realitzats fa 25 anys, que en rates Wistar existeix una diferència d'activitat LPL segons gènere en diversos teixits de l'organisme (teixit adipós blanc i marró, cor i cervell) en una situació basal [306]. Aquestes diferències s'especulava eren degudes a les hormones sexuals. Així, es referenciaven, diferències entre mascles i femelles degudes a diferències hormonals, com per exemple el fet de que en femelles la sensibilitat que tenen els adipòcits per estimular el metabolisme de la glucosa mitjançant insulina és major que en mascles. Convé ressaltar que aquestes diferències d'activitat LPL segons el gènere no van ser trobades en la soca de rates Sprague-Dawley. Un estudi d'enguany, confirma aquest últim resultat i, fins i tot, l'amplia a altres espècies (ratolí i conill) [296]. En efecte, les diferències d'activitat LPL segons gènere no s'observen doncs en totes les espècies i/o soques.

Existeixen altres enzims que també divergeixen en el seus nivells d'activitat segons gènere. Un article publicat el 1991 [307], demostrava en rata com l'enzim hepàtic sulfotransferasa conjugat amb androsterona (androsterone-sulfating sulfotransferase, AD-ST) és un oligòmer format per diverses subunitats i aquestes poden tenir diferents pI però totes tenen el mateix MW aparent. L'activitat d'aquest enzim en l'etapa adulta dels animals és més alt en les femelles que en els mascles [308]. Els mateixos autors, van demostrar que l'abundància relativa del pI d'aquestes isoformes varia en el desenvolupament de cries a adults en rates femella [308, 309]. Així, l'abundància relativa de les isoformes bàsiques es mantenia constant a mesura que els animals passaven de cries a adultes i, en canvi, la quantitat relativa de les isoformes àcides augmentava en l'edat adulta. Sugerien que aquestes isoformes de pI eren degudes a alguna PTM però no ho van arribar a demostrar.

Postulem que, de la mateixa manera que hi ha diferències d'activitat LPL en el PHP d'homes i dones [303], el WAT d'homes i dones [281] i en diversos teixits (teixit adipós blanc i marró, cor i cervell) de rates mascle i femella [306], també podria haver diferències segons gènere en el patró de les seves isoformes tant en l'especie humana com en la murina.

En aquest context, proposaríem futurs estudis per comparar els patrons d'isoformes d'LPL de més teixits de rates mascle i femella i, també, incloure l'especie humana en la comparativa de gènere.

De la mateixa manera que vam fer una comparativa entre patrons d'isoformes d'LPL entre gèneres vam decidir que, aprofitant els resultats que teníem, també la fariem entre **tipus de WAT** i entre **soques de rata**. D'aquesta manera, avançaríem en l'estudi de la distribució de les isoformes a nivell tissular i, a més, en la distribució de les isoformes en un mateix teixit entre soques.

Estudis previs, en el nostre grup de recerca, mostren diferències d'activitat LPL entre el teixit adipós blanc epididimal (eWAT) i l'rWAT procedent de rates mascle adultes control [84]. Concretament, mostraven que l'activitat LPL per gram de teixit de l'eWAT era el doble que la de l'rWAT. En aquesta tesi hem obtingut uns valors d'activitat LPL de 578 mU/g tx en el cas de l'eWAT i de 249 mU/g tx en l'rWAT. Per tant, hem corroborat que en l'eWAT hi ha el doble d'activitat LPL per gram de teixit que en l'rWAT. Per aquest motiu, no és sorprenent que si comparem el patró d'isoformes d'ambdós teixits aquest variï. Com observem a la Figura 75. encara que els dos WAT tenen, com a mínim, deu isoformes de pI de l'LPL aquestes no coincideixen en pI ni en la distribució de la seva quantitat relativa.

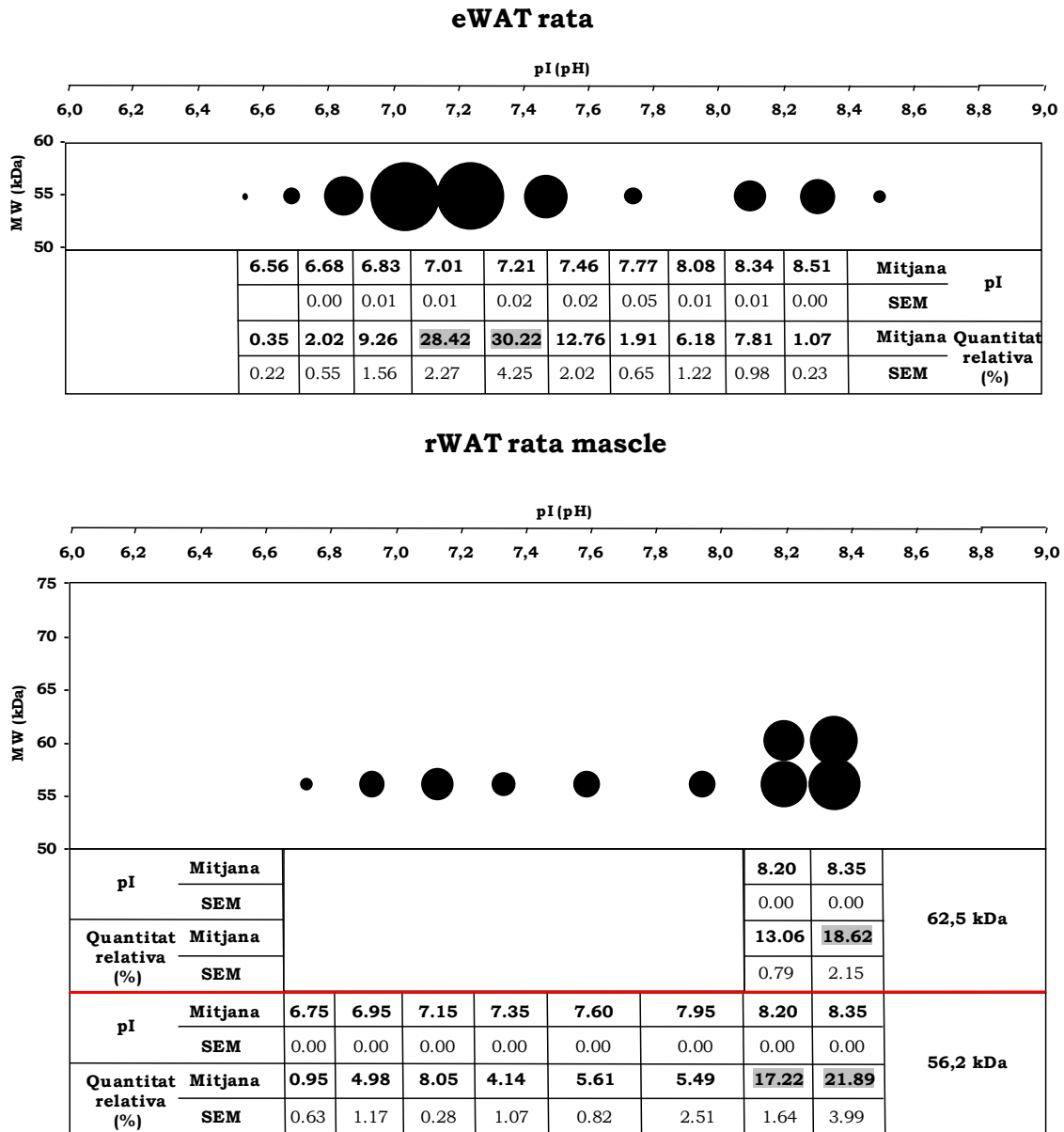


Figura 75. Comparativa del pI, pes molecular i quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc epididimal (A) i en el retroperitoneal (B) de rata mascle. (A) Patró d'isoformes de pI de l'LPL de l'eWAT, adaptat de la Figura 16 de la Tesi de Pere Carulla [181] i (B) patró d'isoformes de l'LPL de l'rWAT de la Figura 63. (A). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 10 isoformes; B, total 10 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb el seu pI i el seu MW. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 3 rèpliques tècniques de l'eWAT de mascles i de 3 rèpliques tècniques de l'rWAT de mascles. MW = Pes molecular aparent.

En efecte, en l'eWAT les isoformes més abundants es troben de manera majoritària en el rang neutre de pH (al voltant de 7,00), en canvi, en l'rWAT es troben en el rang bàsic (superior a 8,00). A més, en l'rWAT trobem isoformes de MW aparent en la zona bàsica que no observem en l'eWAT. Tractant-se de rates control, aquesta diferència en el patró de les isoformes

podria ser deguda a diferències en el microambient de cada teixit. De manera que, per exemple, diferències hormonals en ambdós teixits podrien provocar un canvi de pI de les isoformes de l'LPL. Aleshores, estariem parlant no només d'una regulació específica de teixit per part de l'LPL sinó també d'una **regulació específica de subtipus de teixit**.

Recolzant aquesta troballa, un estudi previ mostra com diferents isoformes de pI i/o de MW de diferents proteïnes trobades a quatre tipus de WAT (retroperitoneal, mesentèric, epididimal i inguinal) de ratolins són diferents significativament entre elles segons el WAT en que es trobin [310]. Per exemple, l'anhidrasa carbònica 3 està formada per 4 isoformes de MW aparent que no es mostren en la mateixa quantitat relativa en els diferents WAT. Un altre exemple és l'apolipoproteïna A1, la qual està formada per tres isoformes de pI que no es troben tampoc en la mateixa quantitat relativa en els diferents WAT. El mateix passa amb les isoformes de la proteïna HSP β 1, la peroxiredoxina-2, l'actina, la subunitat β 1 de l'hemoglobina i la proteïna 14-3-3 γ . Un treball en humans, que també dona suport a la nostra troballa, mostra la comparativa de proteomes de diferents localitzacions de l'scWAT en l'organisme [311]. Aquesta comparativa, posa de manifest que fins i tot existeixen diferències en la quantitat relativa d'isoformes de vàries proteïnes en un mateix tipus de teixit adipós blanc només variant la localització del mateix en l'organisme.

Vam comparar les isoformes de l'LPL d'un mateix teixit, l'rWAT, trobades a dues **soques diferents** de rata controls, Wistar i Zucker. En la Figura 76. podem observar que ambdós patrons d'isoformes són molt similars, de fet, trobem el mateix nombre d'isoformes, aquestes tenen els mateixos pI i les seves abundàncies relatives respecte el total d'isoformes en cada cas són molt similars. Ambdues soques són no consanguínies, és a dir, no tenen una uniformitat fenotípica degut a que no tenen una igualtat genètica i la seva estabilitat gènica és molt baixa [312]. Aquesta marcada coincidència en els patrons de les isoformes de l'LPL en el mateix teixit en l'espècie *rattus*, ens suggereix que les isoformes estan altament conservades tot i ser soques no consanguínies.

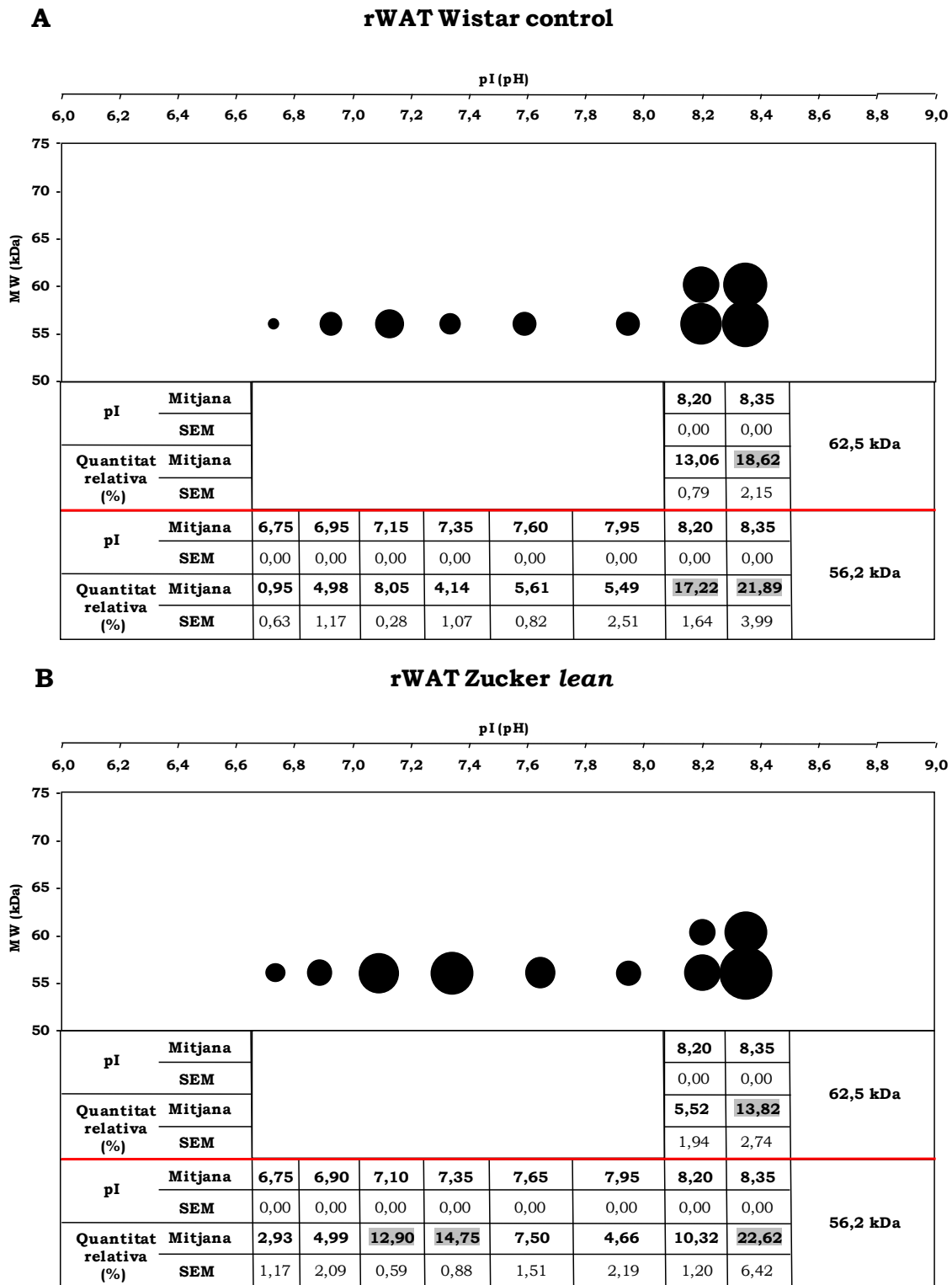


Figura 76. Comparativa del pI, el pes molecular i la quantitat relativa de les isoformes de l'LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal de rates mascle de la soca Wistar control (A) i de la soca Zucker lean (B). Patró d'isoformes de l'LPL del (A) rWAT de la Figura 63. (A) i del (B) rWAT de la Figura 72. (B). La mida dels cercles representa la quantitat relativa de cada isoforma (A, total 10 isoformes; B, total 10 isoformes). A les taules s'indiquen aquestes quantitats respecte al 100 % total (ombrejades en gris les quantitats relatives majoritàries). La localització de les taques es correspon amb el seu pI i el seu MW. Mitjana i SEM (error estàndard de la mitjana) de 3 rèpliques tècniques de l'rWAT de les Wistar i de 2 rèpliques tècniques de l'rWAT de les Zucker. MW = Pes molecular aparent.

Recapitulant, els nostres resultats revelen l'existència d'isoformes de pI de l'LPL en humans obrint una nova dimensió en la biologia molecular de l'LPL. A més, apunten que l'origen molecular de les isoformes està relativament conservat entre l'espècie humana i la murina i no és degut a variacions al·lèliques. Degut a la impossibilitat, amb les eines metodològiques actuals, de poder estudiar la funció de cada isoforma per separat, hem avançat en la seva caracterització funcional de manera indirecta utilitzant dues situacions en les quals l'LPL és clau, l'alletament i l'obesitat. A més, com a part de l'estudi de la caracterització funcional, els nostres resultats demostren que totes les isoformes de l'LPL són enzimàticament actives.

En aquesta tesi, doncs, hem demostrat que l'LPL és d'una complexitat superior a la descrita anteriorment, ja que també hem observat en alguns teixits de rata altres isoformes de diferent MW aparent. Per tant, en el futur caldrà emprar noves aproximacions, tant a nivell molecular com funcional, per comprendre el sentit biològic de les isoformes de l'LPL i les seves característiques moleculars.

VI. CONCLUSIONS

- 1. En HUMANS, així com en rata i macaco, l'LPL també presenta isoformes de pI.** Hem trobat isoformes de pI de l'LPL en PHP, llet i WAT subcutani d'humans.
- 2. Totes les isoformes de l'LPL, tant de pI com de MW aparent, són enzimàticament actives un cop purificades parcialment mitjançant cromatografia d'afinitat a HS.** Atès que hem aconseguit la posada al punt de la tècnica del substrat suïcida aplicada a l'LPL, hem pogut comprovar que totes les isoformes de l'LPL són funcionalment actives després de la purificació parcial de l'enzim.
- 3. L'origen molecular de les isoformes de l'LPL està relativament conservat entre espècies i no és degut a variacions al·lèliques ni té un origen multi-orgànic.** El patró de les isoformes de l'LPL en un mateix teixit és similar entre les dues espècies estudiades, la rata i la humana, tanmateix, no és idèntic. A més, hem comprovat la presència de més de dues isoformes de pI de l'LPL en una única mostra de llet humana (provinent d'una única glàndula mamària alletant) d'una sola donant.
- 4. En alguns teixits de RATA coexisteixen, juntament amb les isoformes de pI de l'LPL, altres isoformes de diferent MW aparent. Postulem que probablement part de l'origen molecular d'aquestes isoformes s'explica per una modificació post-traducciona concreta, la glicosilació.** Hem trobat isoformes de diferent MW aparent en rata en els següents fluids i teixits: llet, PHP de femella (verge i alletant) i rWAT d'ambdós gèneres en controls i en obesos (per dieta de cafeteria i per modificació genètica). La diferència de MW aparent, en kDa, entre els conjunts d'isoformes de pI és compatible amb una modificació post-traducciona per glicosilació.
- 5. En RATA, el patró d'isoformes de l'LPL varia entre gèneres i entre diferents tipus d'un mateix teixit.** Hem observat, en rata, que les isoformes de l'LPL tenen un patró diferent entre mascles i femelles i, també, entre dos tipus de WAT, el retroperitoneal i l'epididimal. Aquest resultat suggereix una regulació diferent d'aquest enzim i les seves isoformes d'acord amb la localització del WAT i/o l'entorn hormonal predominant.
- 6. En RATA, en els teixits implicats en l'alletament existeix probablement una important regulació post-traducciona de les isoformes de l'LPL.** Donada (i) la presència d'isoformes de diferent MW aparent de l'LPL en la llet i no en el seu teixit d'origen, la glàndula mamària alletant, i (ii) la diferència observada entre els seus patrons d'isoformes de l'LPL, postulem que en l'alletament hi ha una regulació post-traducciona de les isoformes. A més, el patró d'isoformes obtingut en un mateix tipus de mostra, com el PHP, és diferent entre la condició alletant *vs.* la no alletant. Aquest resultat suggereix una possible diversitat funcional de les isoformes de l'enzim, que podria determinar la regulació del patró segons el context fisiològic.

- 7. En HUMANS, l'LPL de la llet materna té una activitat específica tan elevada que es pot detectar per WB sense purificar parcialment.** L'elevada activitat LPL respecte a la poca quantitat de proteïna total trobada a la llet humana, és a dir, l'elevada activitat específica de l'LPL en aquest fluid, possiblement facilita la detecció de la proteïna, mitjançant la tècnica de WB, de manera directa i sense necessitat de purificar-la parcialment mitjançant cromatografia d'afinitat a HS. En la llet de rata no s'ha trobat aquest comportament.

- 8. En l'obesitat (RATA i HUMANS) existeix una tendència cap a una major quantitat relativa d'isoformes de l'LPL de pI bàsic.** Hem comprovat en WAT, i en els tres models d'obesitat estudiats, que les isoformes de l'LPL en aquesta situació patològica tendeixen a tenir una major representació, en quant a la seva quantitat relativa, en la zona bàsica de pH en les quals es troben. La implicació funcional es desconeix, però podria influir en l'augment de les reserves lipídiques en els obesos.

- 9. En l'obesitat (RATA), el WAT retroperitoneal no presenta diferències en el nombre, el pI i el MW aparent de les isoformes de l'LPL amb la condició control.**

VII. APÈNDIX



Lipoprotein lipase isoelectric point isoforms in humans



Míriam Badia-Villanueva^a, Pere Carulla^a, Montserrat Carrascal^b, Joaquín Abián^b, Miquel Llobera^{a,*}, Albert Casanovas^c, M. Dolores López-Tejero^a

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b CSIC/UAB Proteomics Laboratory, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2014

Available online 13 February 2014

Keywords:

2DE

Heparin-Sepharose affinity chromatography

LPL

Mass spectrometry

pI isoforms

Proteomics

ABSTRACT

Lipoprotein lipase (LPL) hydrolyzes circulating triacylglycerols (TAG) into free fatty acids and glycerol. It is present in almost all tissues and its tissue-specific regulation directs the flow of circulating TAG in the body. We demonstrated in a previous study that, in rat heart and post-heparin plasma (PHP), LPL consists of a pattern of more than 8 forms of the same apparent molecular weight, but different isoelectric point (pI). In the present study we describe, for the first time, the existence of at least nine LPL pI isoforms in human PHP, with apparent pI between 6.8 and 8.6. Separation and characterization of these forms was carried out by 2DE combined with Western blotting and mass spectrometry (MALDI-TOF/MS and LC-MS/MS). Further studies are needed to discover their molecular origin, the pattern of pI isoforms in human tissues, their possible physiological functions and possible modifications of their pattern in different pathologies.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Lipoprotein lipase (LPL EC.3.1.1.34) is a glycoprotein enzyme with a central role in lipid metabolism [1,2] that hydrolyzes circulating triacylglycerols (TAG) from chylomicra and VLDL into free fatty acids and monoacylglycerol. LPL is present in almost all extra-hepatic tissues (the highest activities are found in adipose tissue, heart and mammary gland) and its tissue-specific regulation, which remains incompletely understood, channels the flow of circulating TAG in the body [2]. LPL is synthesized and secreted by the parenchymal cells of each tissue and is transported across the endothelium to the vessel lumen by glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) [3,4], but the cellular mechanisms of this transport remain unclear [4,5]. On the luminal surface of the endothelium, LPL is present in its mature and active form as a dimer bound to endothelial heparan and dermatan sulphate chains through electrostatic interactions [1]. After a short half life [6], LPL is inacti-

vated and released by a poorly characterized process from the endothelium to the bloodstream, through which it travels before being taken up and degraded by the liver [7]. Our previous results suggest that the release of LPL to the bloodstream may constitute a post-translational mechanism for tissue-specific LPL activity regulation in physiological conditions like stress [8,9].

Despite progress in our understanding of LPL regulation [4], the multiple aspects of LPL biology that remain unclear indicate that we are still left with an incomplete characterization of the enzyme. In recent years, the use of proteomic tools (i.e., two-dimensional electrophoresis (2DE) and mass spectrometry (MS)) in LPL research (i) revealed the existence of more than 8 LPL isoforms of the same apparent molecular weight but different pI in the rat heart [10] uncovering a level of diversity previously unknown, (ii) enabled the identification of a novel post-translational modification of the enzyme [11], and (iii) yielded the first (partial) sequence to be described from direct study of rat LPL protein [10].

In humans, the central role of LPL in the homeostasis of blood lipids is evidenced by the disease outcomes of LPL dysfunction [12], featured by hypertriglyceridemia, and an increased risk of pancreatitis [13], and associated to pathological conditions like atherosclerosis, obesity, Alzheimer's disease and diabetes [1]. Over 100 mutations in the LPL gene resulting in total or partial loss of LPL function have been described in humans [13]. Likewise, the deficiency in LPL activity can also be derived from mutations in

Abbreviations: GPIHBP1, glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1; HL, hepatic lipase; LPL, lipoprotein lipase; PHP, post-heparin plasma; TAG, triacylglycerol.

* Corresponding author. Address: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 402 15 59.

E-mail address: millobera@ub.edu (M. Llobera).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.028>

0006-291X/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

proteins that interact with LPL, such as the activating cofactor apolipoprotein C-II or GPIHBP1 [14]. Heparin administration induces the release of mature LPL from the endothelium to the bloodstream and LPL activity in post-heparin plasma (PHP) is determined in the diagnostic of LPL deficiency [12]. The recent development of gene therapy to treat LPL deficiency in patients with familial chylomicronemia underscores the efforts directed to combat LPL-related disorders [14–16].

Given the importance of LPL in human health and disease, we aimed to explore the existence of LPL isoforms in humans. Remarkably, most of the information about the LPL sequence is derived from the LPL gene or transcript while studies on the human LPL protein are scarce and based on LPL derived from milk [17,18], whose function remains an open question [19]. Here, we analyzed LPL in PHP from human healthy volunteers. Due to the complexity and dynamic range of protein concentrations in human plasma [20], we combined affinity-based purification strategies, 2DE and MS to uncover the presence of LPL pI isoforms in humans.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

PHP was obtained from four healthy adult (between 20 and 30 years) men volunteers, with a body mass index between 18.5 and 25, through the Centre for Drug Research (CIM), Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain. The study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the Sant Pau-CIM and the “Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios” (EUDRA CT2007-007194-23). Informed consent was obtained from all individuals.

2.2. PHP samples

After overnight fasting, post-heparin blood (240 mL) was obtained 15 min after an intravenous injection of 50 U/kg heparin (5% w/v sodium heparin, Rovi). Blood samples were kept on ice until centrifugation (1620g, 10 min, 4 °C). The separated plasma was immediately frozen and stored at –80 °C until analyzed. This method has been widely used for over 50 years [21–23].

2.3. Heparin-Sepharose affinity chromatography

LPL was partially purified using heparin-Sepharose affinity chromatography as described elsewhere [10,24]. Partially purified LPL was precipitated using trichloroacetic acid followed by acetone washing [25].

2.4. LPL activity assay

The assay of LPL activity has been described in detail elsewhere [24,26]. One unit of lipase activity corresponds to the release of 1 μmol of oleate per minute at pH 8.5 and 25 °C. As hepatic lipase in plasma cross-reacts with LPL lipolytic assay, PHP samples were incubated 1:1 v/v with anti-HL serum for 120 min at 4 °C prior to the assay. LPL activity was also determined in fractions of the heparin-Sepharose chromatography. In this case, the incubation with anti-hepatic lipase (HL) serum was omitted because HL and LPL elute separately on the heparin-Sepharose chromatography [27,28].

2.5. IgG depletion

Partially purified LPL from human PHP contained IgG that was depleted from the sample using a column packed with 1 mL of

Protein G Sepharose (HiTrap Protein G HP, GE Healthcare) before 2DE. 7 mL of partially purified LPL from PHP were loaded to the column at a flow rate of 0.7 mL/min. The IgG was retained in the column and the flow through was collected.

2.6. One-dimensional electrophoresis

Chromatographic fractions of PHP were mixed with sample buffer (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 40% v/v glycerol, 8% w/v SDS, 600 mM DTT and bromophenol blue) 3:1 v/v, boiled for 10 min and applied to a 9% w/v polyacrylamide gel.

2.7. Two-dimensional electrophoresis

The sample, before or after IgG depletion, was processed as we described elsewhere [10] and applied to rehydrated IPG strips. Isoelectrofocusing was performed at 20 °C on IPGphor (GE Healthcare) according to the following schedule: linear ramp to 500 V in 1 h, linear ramp to 1000 V in 1 h, linear ramp to 5000 V in 1 h and 5000 V up to 25 KVh. After that IPG strips were cut at 7.5 cm from anode (pH 6) and processed as we described before [10]. SDS-PAGE was performed using 9% w/v polyacrylamide gel, the equilibrated strips were loaded and sealed using a solution containing 0.5% w/v agarose, 15 mM Tris, 0.1% w/v SDS, 192 mM glycine and bromophenol blue using the Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). The second dimension was carried out at 50 V for 30 min and at 150 V until the end of electrophoresis.

2.8. Silver staining of proteins in gel

Proteins were silver-stained using a staining procedure compatible with mass spectrometry, as previously described [10].

2.9. LPL Western blot assay and quantification

We followed the method described by Casanovas et al. [10,29] using monoclonal antibody 5D2 (1:2000 v/v, the kind gift of Dr. J.D. Brunzell, University of Washington, Seattle, WA, USA).

The quantification was done on images of LPL 2DE Western blot. To this end, the density of all spots in each film was measured by densitometry (Multi Gauge Fujifilm). The relative abundance of each spot/isoform was calculated relative to the total LPL content in the sample. For each individual, three measurements from three different membranes were averaged. In turn, each measurement was calculated as the average of at least three different exposition times (data not shown). In addition, we calculated the apparent pI of each spot. Based on the linear pH gradient of the IPG strips, the pI of each spot was inferred from the distance between the spot and the anodic (pH 6) edge of the gel.

2.10. In-gel digestion

The spots of interest were excised from silver-stained gels and subjected to in-gel digestion with trypsin (Promega), using a Digest ProMS (Intavis Bioanalytical Instruments AG) and following standard procedures [30,31]. The process includes washes with ammonium bicarbonate pH 7.8, reduction with DTT, alkylation with IAA and enzyme digestion with trypsin (37 °C, 8 h). Tryptic peptides were extracted with ACN/water (1/1, v/v) and 0.25% v/v TFA. Extracts were dried in a Speed-Vac and redissolved in 5 μL of ACN/water (1/1, v/v) containing 0.1% v/v TFA.

2.11. Mass spectrometric protein identification

Proteins were identified with a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (AB Sciex 4800) by peptide mass fingerprinting (PMF), as we

described elsewhere [10]. MASCOT engine was used for searches. All identifications were manually validated. The database used for identification was UniprotKB/SwissProt restricted to human proteins. The parameters used for the searches were trypsin digestion, 2 missed cleavages, carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine and 25 ppm maximum error tolerance.

Some spots were also analysed by LC-MS/MS, using an LTQ-Orbitrap high resolution mass spectrometer (ThermoFisher, San Jose, CA). The instrument was set to perform a high resolution (60,000 FWHM) MS scan in the range of m/z 400–1800 followed by an MS/MS scan on each of the 8 most intense signals detected on the MS scan. Proteome Discoverer 1.3 software was used for protein identification.

3. Results

LPL activity in plasma after heparin administration (PHP) was similar in all individuals (111 ± 11.2 mU/mL) and dramatically higher than before heparin administration (0.7 ± 0.5 mU/mL). Despite the increased levels of LPL activity in PHP, the enzyme was not detected by Western blot in crude samples (Fig. 1C). For this reason, we partially purified LPL from human PHP by heparin-Sepharose affinity chromatography. The result of a representative purification is shown in Fig. 1A. Fractions collected upon elution with 1.5 M NaCl have high levels of LPL activity and a low amount of total protein. The peak of lipolytic activity observed upon elution

with 0.75 M NaCl corresponds to HL activity, which has lower affinity for heparin than LPL [27,28]. Importantly, the partial purification enabled LPL detection by Western blot, which further substantiated the presence of the enzyme exclusively in the 1.5 M NaCl eluate (Fig. 1C). The fractions collected at this peak of 1.5 M NaCl were pooled and used as the source of LPL to analyze the possible presence of pI isoforms in human PHP.

The analysis of partially purified LPL by 2DE Western blot (Fig. 2) revealed the existence of nine isoforms with an apparent pI between 6.8 and 8.6. The pattern of LPL pI isoforms was remarkably similar between the four individuals studied. We speculate that the stain observed on the left in Fig. 2 (individual 1) may be LPL not focused due to the high amount of sample loaded to facilitate the detection of minor spots.

Despite the presumed high specificity of the antibody used in the Western blot (5D2) [32], the nonspecificity of other antibodies against LPL detected in previous studies [29] prompted us to identify the spots detected in the Western blot analysis using MS. To this end, proteins were separated by 2DE and silver-stained, and the spots of interest were excised for protein identification by PMF (Fig. 3A). IgG was initially identified in all spots (Table S1). Notably, IgG is one of the most abundant proteins in human plasma [33] and, despite partial LPL purification with heparin-Sepharose affinity chromatography, IgG was present in the 1.5 M NaCl eluate fractions. The heavy chain of this immunoglobulin has a similar molecular weight [34] and pI to that of LPL [33]. For this

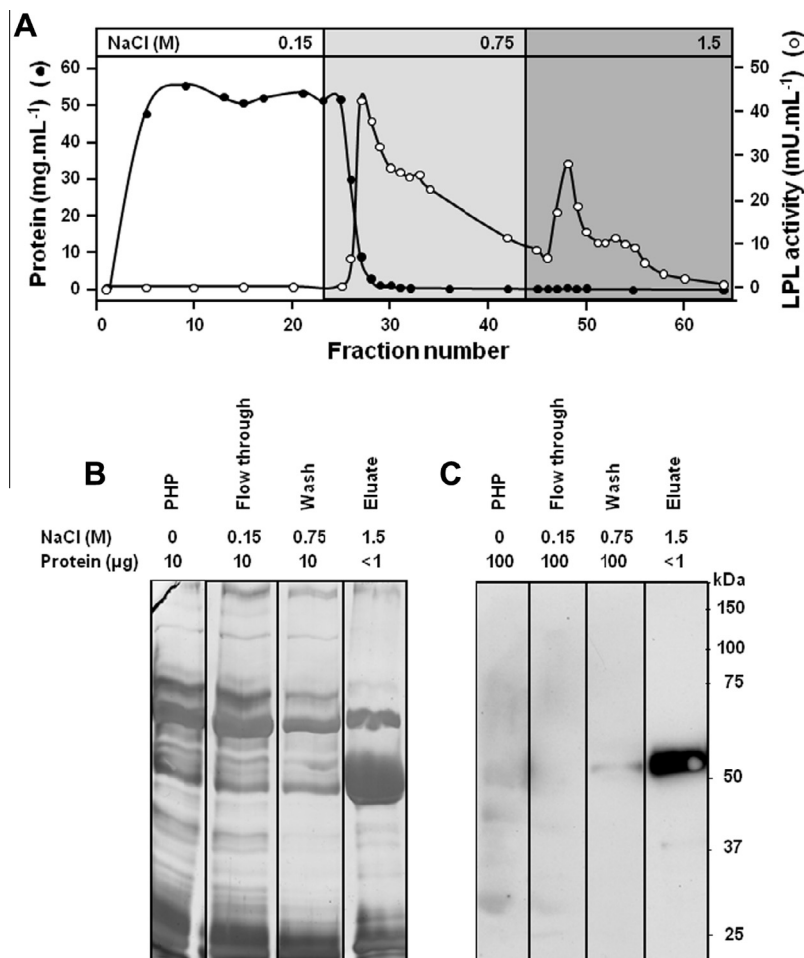


Fig. 1. Partial LPL purification from human PHP using heparin-Sepharose affinity chromatography. (A) Fractions were collected after a stepwise increase in NaCl concentration, as indicated at the top. Total protein content (filled circles) and LPL activity (open circles) in fractions are given. SDS-PAGE and silver staining (B) and Western blot against LPL (C) of fractions at different steps of the purification process are shown. The step and the amount of sample loaded are indicated above each lane.

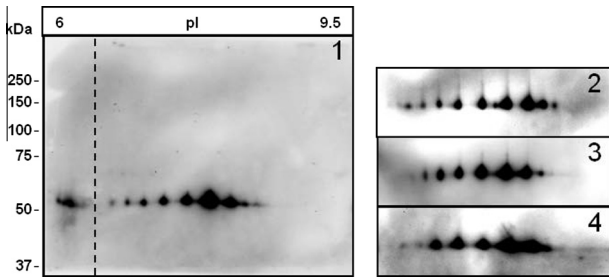


Fig. 2. LPL pI isoforms in human PHP. 2DE Western blot against LPL of partially purified LPL from human PHP. 2DE was performed using pH 6–11, 11 cm IPG strips in the first dimension. Western blots belong to the four individuals studied (1–4).

reason, both proteins overlap in the gel and the high abundance of IgG hampers the identification of low-abundance underlying proteins, including LPL. Therefore, prior to 2DE analysis, we depleted the samples of this IgG by using HiTrap Protein G HP (Fig. 3B), which enabled the identification of LPL isoforms by PMF and MS/MS (Table S2 and Table S3).

Finally, to compare the pattern of LPL pI isoforms found in the four individuals studied, we quantified the density of each spot in each 2DE Western blot (Fig. 4). The variability found between individuals (SEM in Fig. 4) was of the same order of magnitude as in the three technical replicates from each individual (data not shown), indicating that the variability observed between subjects can mainly be attributed to the methodology used. Therefore, the pattern of LPL isoforms (pI and relative amount) found in the four individuals studied is very similar. The most abundant isoform (33% of total LPL content) has an alkaline pI (8.01) whereas the next two most abundant isoforms have neighbouring pIs (7.71 and 8.31). The theoretical pI calculated for mature human LPL

based on the amino acid sequence (http://web.expasy.org/compute_pi/) is within this range (8.23).

4. Discussion

In the present study we describe for the first time the existence of at least nine LPL pI isoforms in human PHP, with apparent pI between 6.8 and 8.6. The pattern of LPL isoforms (number and distribution) is consistent across the individuals studied and similar to that observed in other mammals [10], which suggests conserved features in the molecular origin of this heterogeneity likely related to the potential specific function and/or regulation of individual isoforms.

The origin of LPL isoforms in humans is unknown. Human LPL is encoded by a single gene [35]. In general terms, protein diversity derived from a single gene can be originated at the DNA, RNA, or protein level, due to allelic variations, alternative mRNA splicing or differential PTMs, respectively [36]. The multiple number of human LPL isoforms observed in single individuals rules out the possibility that such heterogeneity is only due to allelic variants and the conserved pattern between all individuals points towards an alternative origin of these differences. Two LPL mRNA of different sizes have been described in humans due to the alternative use of 2 possible polyadenylation sites [35]. These 2 transcripts differ in their translational efficiency but not in the final protein sequence encoded [37]. This scenario points towards the PTMs as the most likely origin of LPL pI isoforms.

The glycoprotein nature of LPL suggests that the diversity of the attached glycan structures may account for the pI heterogeneity observed. However, deglycosylation only partially reduced the number of LPL pI isoforms in the rat [10] indicating that other PTM may also be involved. Notably, human and rat LPL have 2 and 3 predicted

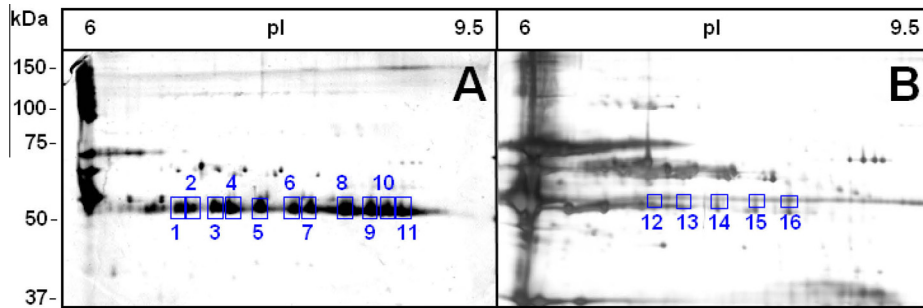


Fig. 3. IgG depletion enables the identification of LPL isoforms using MS. Two-dimensional analysis and silver staining of partially purified LPL from human PHP before (A) and after (B) IgG depletion. 2DE was performed using pH 6–11, 11 cm IPG strips in the first dimension. Spots excised and identified as LPL by PMF or LC–MS/MS are numbered (Tables S1, S2 and S3 in Supplementary data).

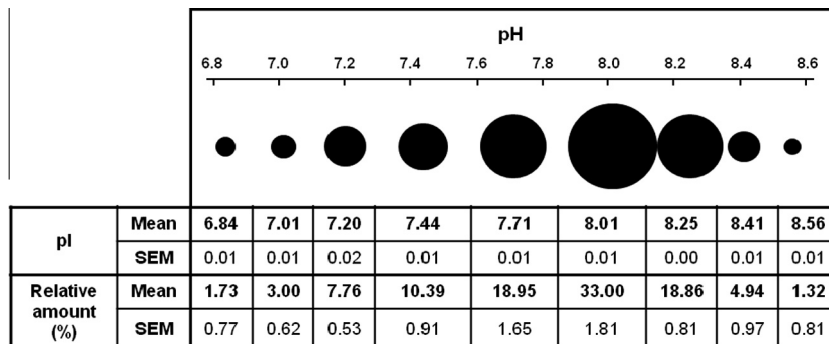


Fig. 4. pI and relative abundance of the nine LPL isoforms found in human PHP. The bubble size represents the amount of each isoform relative to the total LPL content. The location is according to their pI. SEM, standard error of the mean of n = 4.

glycosylation sites, respectively (predicted using NetNGlyc 1.0, Centre for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark), excluding a potential site, present in both species, with the Asn-Pro-Ser sequence that is rarely glycosylated in eukaryotes [1]. Hence, an increased number of LPL pl isoforms could be expected in the rat as the result of the higher number of combinations of glycan structures. By contrast, the number of LPL isoforms in human PHP is similar to that of rat heart LPL and higher than that of rat PHP, supporting the notion that other PTMs may contribute to LPL pl heterogeneity. Protein phosphorylation is a PTM previously associated to pl isoforms of other proteins [38]. However, we demonstrated that phosphorylation does not contribute to LPL pl heterogeneity in the rat [10]. In a recent study, we identified nitrated tyrosine residues in rat LPL in response to LPS challenge [11], demonstrating that LPL can undergo other PTMs *in vivo*. Hence, tyrosine nitration or other not yet identified PTMs can potentially contribute to LPL pl heterogeneity, although further research will be required to elucidate the molecular differences between LPL isoforms. Since PTMs induce a pl shift, the pl difference between LPL isoforms can provide the first small clue about the possible molecular origin of this heterogeneity. Finally, the presence of LPL isoforms in a single tissue in the rat [10] suggests that the multi-organ origin of LPL in PHP is not the source of LPL pl heterogeneity observed in human PHP.

At the current time, the potential functional and/or regulatory differences between LPL isoforms remain unexplored. However, since LPL in PHP is derived from the massive release to the bloodstream of mature LPL anchored to the endothelial lumen [7,39], the presence of LPL pl isoforms in PHP indicates that a population of mature LPL molecules with different net charges coexists at certain pH. Importantly, the molecular binding between LPL and the heparan sulfates in the endothelium is mediated by electrostatic interactions [40], between basic residues in the LPL molecule and the negative charge of sulfate groups in the proteoglycans. Hence, the differential net charge between LPL isoforms may impinge their heparin-binding affinity and play a role in the poorly understood release of LPL from its binding site at the endothelium. Notably, the release of LPL from the endothelium has been proposed as a physiological mechanism of tissue-specific LPL regulation [8,9] underscoring the need to advance our understanding of this process.

In conclusion, our results reveal the existence of LPL isoforms in humans raising a new dimension in LPL biology. In light of these results, elucidating the molecular nature and function of LPL pl isoforms emerges as a formidable task for future research with the potential to contribute to our understanding of aspects of LPL biology in physiological or pathological situations.

Acknowledgments

The authors thank J.D. Brunzell (University of Washington, Seattle, WA, USA) for providing 5D2 antibody, Rosa M^a Antonijoan (Centre for Drug Research (CIM), Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain) for research support, and the Language Advisory Service of the University of Barcelona for editorial help. This study was funded by Spanish Ministry of Education and Science (BFU2007-65247/BMC). Miriam Badia-Villanueva was the recipient of a fellowship from the University of Barcelona (APIF). The Proteomics Laboratory CSIC/UAB is a member of ProteoRed, is funded by Genoma Spain and follows the quality criteria set up by ProteoRed standards.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.028>.

References

- [1] J.R. Mead, S.A. Irvine, D.P. Ramji, Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease, *J. Mol. Med. (Berl)* 80 (2002) 753–769.
- [2] H. Wang, R.H. Eckel, Lipoprotein lipase: from gene to obesity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297 (2009) E271–E288.
- [3] B.S. Davies, A.P. Beigneux, R.H. Barnes 2nd, Y. Tu, P. Gin, M.M. Weinstein, C. Nobumori, R. Nyren, I. Goldberg, G. Olivecrona, A. Bensadoun, S.G. Young, L.G. Fong, GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries, *Cell Metab.* 12 (2010) 42–52.
- [4] B.S. Davies, A.P. Beigneux, L.G. Fong, S.G. Young, New wrinkles in lipoprotein lipase biology, *Curr. Opin. Lipidol.* 23 (2011) 35–42.
- [5] B.S. Davies, C.N. Goulbourne, R.H. Barnes 2nd, K.A. Turlo, P. Gin, S. Vaughan, D.J. Vaux, A. Bensadoun, A.P. Beigneux, L.G. Fong, S.G. Young, Assessing mechanisms of GPIHBP1 and lipoprotein lipase movement across endothelial cells, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 2690–2697.
- [6] T. Olivecrona, S.S. Chernick, G. Bengtsson-Olivecrona, M. Garrison, R.O. Scow, Synthesis and secretion of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. Demonstration of inactive forms of lipase in cells, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10748–10759.
- [7] S. Vilaro, M. Llobera, G. Bengtsson-Olivecrona, T. Olivecrona, Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role, *Am. J. Physiol.* 254 (1988) G711–G722.
- [8] D. Ricart-Jane, P. Cejudo-Martin, J. Peinado-Onsurbe, M.D. Lopez-Tejero, M. Llobera, Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress, *J. Appl. Physiol.* 99 (2005) 1343–1351.
- [9] A. Casanovas, N. Parramon, F. de la Cruz, O. Andres, J. Terencio, M.D. Lopez-Tejero, M. Llobera, Retroperitoneal white adipose tissue lipoprotein lipase activity is rapidly down-regulated in response to acute stress, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 863–868.
- [10] A. Casanovas, M. Carrascal, J. Abian, M.D. Lopez-Tejero, M. Llobera, Discovery of lipoprotein lipase pl isoforms and contributions to their characterization, *J. Proteomics* 72 (2009) 1031–1039.
- [11] A. Casanovas, M. Carrascal, J. Abian, M.D. Lopez-Tejero, M. Llobera, Lipoprotein lipase is nitrated *in vivo* after lipopolysaccharide challenge, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 1553–1560.
- [12] J.D. Brunzell, Familial Lipoprotein Lipase Deficiency, University of Washington, Seattle, 1993.
- [13] M.C. Nierman, J. Rip, J. Twisk, J.J. Meulenber, J.J. Kastelein, E.S. Stroes, J.A. Kuivenhoven, Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice, *Neth. J. Med.* 63 (2005) 14–19.
- [14] D. Gaudet, J. Method, J. Kastelein, Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency, *Curr. Opin. Lipidol.* 23 (2012) 310–320.
- [15] A.S. Wierzbicki, A. Viljoen, Alipogene tiparvovec: gene therapy for lipoprotein lipase deficiency, *Expert Opin. Biol. Ther.* 13 (2012) 7–10.
- [16] A.C. Carpentier, F. Frisch, S.M. Labbe, R. Gagnon, J. de Wal, S. Greentree, H. Petty, J. Twisk, D. Brisson, D. Gaudet, Effect of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) 1635–1644.
- [17] R. Zechner, Rapid and simple isolation procedure for lipoprotein lipase from human milk, *Biochim. Biophys. Acta* 1044 (1990) 20–25.
- [18] G. Picariello, P. Ferranti, G. Mamone, P. Roepstorff, F. Addeo, Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry, *Proteomics* 8 (2008) 3833–3847.
- [19] E. Bertino, M. Giribaldi, V. Baro, M. Giancotti, C. Pazzi, P. Peila, S. Tonetto, G.E. Arslanoglu, L. Moro, D. Gastaldi, Gastaldi, Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 56 (2013) 390–396.
- [20] N.L. Anderson, N.G. Anderson, The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects, *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 845–867.
- [21] R.M. Krauss, R.I. Levy, D.S. Fredrickson, Selective measurement of two lipase activities in postheparin plasma from normal subjects and patients with hyperlipoproteinemia, *J. Clin. Invest.* 54 (1974) 1107–1124.
- [22] L. Rovamo, E.A. Nikkila, M.R. Taskinen, K.O. Raivio, Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipases in preterm neonates, *Pediatr. Res.* 18 (1984) 1104–1107.
- [23] P. Hahn, Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin, *Science* (1943) 19–20.
- [24] I. Ramirez, A.J. Kryski, O. Ben-Zeev, M.C. Schotz, D.L. Severson, Characterization of triacylglycerol hydrolase activities in isolated myocardial cells from rat heart, *Biochem. J.* 232 (1985) 229–236.
- [25] C. Quero, N. Colome, M.R. Prieto, M. Carrascal, M. Posada, E. Gelpi, J. Abian, Determination of protein markers in human serum: analysis of protein expression in toxic oil syndrome studies, *Proteomics* 4 (2004) 303–315.
- [26] J. Julve, M.Q. Robert, M. Llobera, J. Peinado-Onsurbe, Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes, *Mol. Cell. Endocrinol.* 116 (1996) 97–104.
- [27] C.S. Wang, H.B. Bass, D. Downs, R.K. Whitmer, Modified heparin-Sepharose procedure for determination of plasma lipolytic activities of normolipidemic and hyperlipidemic subjects after injection of heparin, *Clin. Chem.* 27 (1981) 663–668.
- [28] J. Augustin, H. Freeze, P. Tejada, W.V. Brown, A comparison of molecular properties of hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase from human post-heparin plasma, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 2912–2920.

- [29] A. Casanovas, M. Carrascal, J. Abian, M.D. Lopez-Tejero, M. Llobera, Application of proteomic tools to detect the nonspecificity of a polyclonal antibody against lipoprotein lipase, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 4173–4177.
- [30] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850–858.
- [31] M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, M. Mann, Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry, *Nature* 379 (1996) 466–469.
- [32] S.F. Chang, B. Reich, J.D. Brunzell, H. Will, Detailed characterization of the binding site of the lipoprotein lipase-specific monoclonal antibody 5D2, *J. Lipid Res.* 39 (1998) 2350–2359.
- [33] L. Urbas, P. Brne, B. Gabor, M. Barut, M. Strlic, T.C. Petric, A. Strancar, Depletion of high-abundance proteins from human plasma using a combination of an affinity and pseudo-affinity column, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2689–2694.
- [34] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, C. Chumsae, A. Newby-Kew, Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE, *Biotechnol. Lett.* 29 (2007) 1611–1622.
- [35] K.L. Wion, T.G. Kirchgessner, A.J. Lusic, M.C. Scholtz, R.M. Lawn, Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence, *Science* 235 (1987) 1638–1641.
- [36] L.M. Smith, N.L. Kelleher, Proteoform: a single term describing protein complexity, *Nat. Methods* 10 (2013) 186–187.
- [37] G. Ranganathan, J.M. Ong, A. Yukht, M. Saghizadeh, R.B. Simsolo, A. Pauer, P.A. Kern, Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase. Effect of the 3'-untranslated region on translation, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7149–7155.
- [38] J.W. Holland, H.C. Deeth, P.F. Alewood, Resolution and characterisation of multiple isoforms of bovine kappa-casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy, *Proteomics* 6 (2006) 3087–3095.
- [39] S.P. Williams, E.A. Johnson, Release of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in rats by heparin and other sulphated polysaccharides, *Thromb. Res.* 55 (1989) 361–368.
- [40] J.E. Braun, D.L. Severson, Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase, *Biochem. J.* 287 (Pt 2) (1992) 337–347.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abdelaal, M., C.W. le Roux and N.G. Docherty, *Morbidity and mortality associated with obesity*. Ann Transl Med, 2017. 5(7): p. 161.
2. Hahn, P.F., *Abolishment of Alimentary Lipemia Following Injection of Heparin*. Science, 1943. 98(2531): p. 19-20.
3. Anderson, N.G. and B. Fawcett, *An antichylomicronemic substance produced by heparin injection*. Proc Soc Exp Biol Med, 1950. 74(4): p. 768-71.
4. Anfinsen, C.B., E. Boyle and R.K. Brown, *The Role of Heparin in Lipoprotein Metabolism*. Science, 1952. 115(2996): p. 583-6.
5. Korn, E.D., *Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart*. J Biol Chem, 1955. 215(1): p. 1-14.
6. He, P.P., T. Jiang, X.P. OuYang, Y.Q. Liang, J.Q. Zou, Y. Wang, Q.Q. Shen, L. Liao and X.L. Zheng, *Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases*. Clin Chim Acta, 2018. 480: p. 126-137.
7. Geldenhuys, W.J., L. Lin, A.S. Darvesh and P. Sadana, *Emerging strategies of targeting lipoprotein lipase for metabolic and cardiovascular diseases*. Drug Discov Today, 2017. 22(2): p. 352-365.
8. Beigneux, A.P., M.M. Weinstein, B.S. Davies, P. Gin, A. Bensadoun, L.G. Fong and S.G. Young, *GPIHBP1 and lipolysis: an update*. Curr Opin Lipidol, 2009. 20(3): p. 211-6.
9. Pedersen, M.E., M. Cohen and M.C. Schotz, *Immunocytochemical localization of the functional fraction of lipoprotein lipase in the perfused heart*. J Lipid Res, 1983. 24(5): p. 512-21.
10. Mahley, R.W., T.L. Innerarity, S.C. Rall, Jr. and K.H. Weisgraber, *Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function*. J Lipid Res, 1984. 25(12): p. 1277-94.
11. Bengtsson-Olivecrona, G. and T. Olivecrona, *Phospholipase activity of milk lipoprotein lipase*. Methods Enzymol, 1991. 197: p. 345-56.
12. Wang, H. and R.H. Eckel, *Lipoprotein lipase: from gene to obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. 297(2): p. E271-88.
13. Mead, J.R., S.A. Irvine and D.P. Ramji, *Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease*. J Mol Med (Berl), 2002. 80(12): p. 753-69.
14. Li, Y., P.P. He, D.W. Zhang, X.L. Zheng, F.S. Cayabyab, W.D. Yin and C.K. Tang, *Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2014. 237(2): p. 597-608.
15. Deeb, S.S. and R.L. Peng, *Structure of the human lipoprotein lipase gene*. Biochemistry, 1989. 28(10): p. 4131-5.
16. Kirchgessner, T.G., J.C. Chuat, C. Heinzmann, J. Etienne, S. Guilhot, K. Svenson, D. Ameis, C. Pilon, L. d'Auriol, A. Andalibi and et al., *Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(24): p. 9647-51.

17. Wion, K.L., T.G. Kirchgessner, A.J. Lusis, M.C. Schotz and R.M. Lawn, *Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence*. Science, 1987. 235(4796): p. 1638-41.
18. Ranganathan, G., J.M. Ong, A. Yukht, M. Saghizadeh, R.B. Simsolo, A. Pauer and P.A. Kern, *Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase. Effect of the 3'-untranslated region on translation*. J Biol Chem, 1995. 270(13): p. 7149-55.
19. Raisonnier, A., J. Etienne, F. Arnault, D. Brault, L. Noe, J.C. Chuat and F. Galibert, *Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995. 111(3): p. 385-98.
20. Holmes, R.S., J.L. Vandenberg and L.A. Cox, *Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: a key enzyme of very low density lipoprotein metabolism*. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2011. 6(2): p. 224-34.
21. Bensadoun, A., *Lipoprotein lipase*. Annu Rev Nutr, 1991. 11: p. 217-37.
22. Wang, Z., S. Li, L. Sun, J. Fan and Z. Liu, *Comparative analyses of lipoprotein lipase, hepatic lipase, and endothelial lipase, and their binding properties with known inhibitors*. PLoS One, 2013. 8(8): p. e72146.
23. Wong, H. and M.C. Schotz, *The lipase gene family*. J Lipid Res, 2002. 43(7): p. 993-9.
24. van Tilbeurgh, H., A. Roussel, J.M. Lalouel and C. Cambillau, *Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis*. J Biol Chem, 1994. 269(6): p. 4626-33.
25. Hayne, C.K., H. Yumerefendi, L. Cao, J.W. Gauer, M.J. Lafferty, B. Kuhlman, D.A. Erie and S.B. Neher, *We FRET so You Don't Have To: New Models of the Lipoprotein Lipase Dimer*. Biochemistry, 2018. 57(2): p. 241-254.
26. Kobayashi, Y., T. Nakajima and I. Inoue, *Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain*. Eur J Biochem, 2002. 269(18): p. 4701-10.
27. Dugi, K.A., H.L. Dichek, G.D. Talley, H.B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo, *Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates*. J Biol Chem, 1992. 267(35): p. 25086-91.
28. Hata, A., D.N. Ridinger, S. Sutherland, M. Emi, Z. Shuhua, R.L. Myers, K. Ren, T. Cheng, I. Inoue, D.E. Wilson and et al., *Binding of lipoprotein lipase to heparin. Identification of five critical residues in two distinct segments of the amino-terminal domain*. J Biol Chem, 1993. 268(12): p. 8447-57.
29. McIlhargey, T.L., Y. Yang, H. Wong and J.S. Hill, *Identification of a lipoprotein lipase cofactor-binding site by chemical cross-linking and transfer of apolipoprotein C-II-responsive lipolysis from lipoprotein lipase to hepatic lipase*. J Biol Chem, 2003. 278(25): p. 23027-35.
30. Emmerich, J., O.U. Beg, J. Peterson, L. Previato, J.D. Brunzell, H.B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo, *Human lipoprotein lipase. Analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis of Ser-132, Asp-156, and His-241*. J Biol Chem, 1992. 267(6): p. 4161-5.

31. Braun, J.E. and D.L. Severson, *Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase*. *Biochem J*, 1992. 287 (Pt 2): p. 337-47.
32. Pillarisetti, S., L. Paka, A. Sasaki, T. Vanni-Reyes, B. Yin, N. Parthasarathy, W.D. Wagner and I.J. Goldberg, *Endothelial cell heparanase modulation of lipoprotein lipase activity. Evidence that heparan sulfate oligosaccharide is an extracellular chaperone*. *J Biol Chem*, 1997. 272(25): p. 15753-9.
33. Lookene, A., O. Chevreuil, P. Ostergaard and G. Olivecrona, *Interaction of lipoprotein lipase with heparin fragments and with heparan sulfate: stoichiometry, stabilization, and kinetics*. *Biochemistry*, 1996. 35(37): p. 12155-63.
34. Yang, C.Y., Z.W. Gu, H.X. Yang, M.F. Rohde, A.M. Gotto, Jr. and H.J. Pownall, *Structure of bovine milk lipoprotein lipase*. *J Biol Chem*, 1989. 264(28): p. 16822-7.
35. Dugi, K.A., H.L. Dichek and S. Santamarina-Fojo, *Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity*. *J Biol Chem*, 1995. 270(43): p. 25396-401.
36. Santamarina-Fojo, S. and K.A. Dugi, *Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 1994. 5(2): p. 117-25.
37. Keiper, T., J.G. Schneider and K.A. Dugi, *Novel site in lipoprotein lipase (LPL415;-438) essential for substrate interaction and dimer stability*. *J Lipid Res*, 2001. 42(8): p. 1180-6.
38. Wong, H., D. Yang, J.S. Hill, R.C. Davis, J. Nikazy and M.C. Schotz, *A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(11): p. 5594-8.
39. Osborne, J.C., Jr., G. Bengtsson-Olivecrona, N.S. Lee and T. Olivecrona, *Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation*. *Biochemistry*, 1985. 24(20): p. 5606-11.
40. Hata, A., D.N. Ridinger, S.D. Sutherland, M. Emi, L.K. Kwong, J. Shuhua, A. Lubbers, B. Guy-Grand, A. Basdevant, P.H. Iverius and et al., *Missense mutations in exon 5 of the human lipoprotein lipase gene. Inactivation correlates with loss of dimerization*. *J Biol Chem*, 1992. 267(28): p. 20132-9.
41. Wong, H., R.C. Davis, T. Thuren, J.W. Goers, J. Nikazy, M. Waite and M.C. Schotz, *Lipoprotein lipase domain function*. *J Biol Chem*, 1994. 269(14): p. 10319-23.
42. Lookene, A., N.B. Groot, J.J. Kastelein, G. Olivecrona and T. Bruin, *Mutation of tryptophan residues in lipoprotein lipase. Effects on stability, immunoreactivity, and catalytic properties*. *J Biol Chem*, 1997. 272(2): p. 766-72.
43. Nykjaer, A., M. Nielsen, A. Lookene, N. Meyer, H. Roigaard, M. Etzerodt, U. Beisiegel, G. Olivecrona and J. Gliemann, *A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells*. *J Biol Chem*, 1994. 269(50): p. 31747-55.
44. Williams, S.E., I. Inoue, H. Tran, G.L. Fry, M.W. Pladet, P.H. Iverius, J.M. Lalouel, D.A. Chappell and D.K. Strickland, *The carboxyl-terminal domain of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related*

- protein/alpha 2-macroglobulin receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP.* J Biol Chem, 1994. 269(12): p. 8653-8.
45. Camps, L., M. Reina, M. Llobera, S. Vilaro and T. Olivecrona, *Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution.* Am J Physiol, 1990. 258(4 Pt 1): p. C673-81.
46. Ben-Zeev, O., M.H. Doolittle, R.C. Davis, J. Elovson and M.C. Schotz, *Maturation of lipoprotein lipase. Expression of full catalytic activity requires glucose trimming but not translocation to the cis-Golgi compartment.* J Biol Chem, 1992. 267(9): p. 6219-27.
47. Ben-Zeev, O., H.Z. Mao and M.H. Doolittle, *Maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. Concurrent formation of functional dimers and inactive aggregates.* J Biol Chem, 2002. 277(12): p. 10727-38.
48. Doolittle, M.H., N. Ehrhardt and M. Peterfy, *Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly.* Curr Opin Lipidol, 2010. 21(3): p. 198-203.
49. Sun, S., G. Shi, X. Han, A.B. Francisco, Y. Ji, N. Mendonca, X. Liu, J.W. Locasale, K.W. Simpson, G.E. Duhamel, S. Kersten, J.R. Yates, 3rd, Q. Long and L. Qi, *Sel1L is indispensable for mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation, endoplasmic reticulum homeostasis, and survival.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(5): p. E582-91.
50. Sha, H., S. Sun, A.B. Francisco, N. Ehrhardt, Z. Xue, L. Liu, P. Lawrence, F. Mattijssen, R.D. Guber, M.S. Panhwar, J.T. Brenna, H. Shi, B. Xue, S. Kersten, A. Bensadoun, M. Peterfy, Q. Long and L. Qi, *The ER-associated degradation adaptor protein Sel1L regulates LPL secretion and lipid metabolism.* Cell Metab, 2014. 20(3): p. 458-70.
51. Helenius, A. and M. Aebi, *Intracellular functions of N-linked glycans.* Science, 2001. 291(5512): p. 2364-9.
52. Park, J.W., M.S. Oh, J.Y. Yang, B.H. Park, H.W. Rho, S.N. Lim, E.C. Jhee and H.R. Kim, *Glycosylation, dimerization, and heparin affinity of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes.* Biochim Biophys Acta, 1995. 1254(1): p. 45-50.
53. Klinger, S.C., S. Glerup, M.K. Raarup, M.C. Mari, M. Nyegaard, G. Koster, T. Prabakaran, S.K. Nilsson, M.M. Kjaergaard, O. Bakke, A. Nykjaer, G. Olivecrona, C.M. Petersen and M.S. Nielsen, *SorLA regulates the activity of lipoprotein lipase by intracellular trafficking.* J Cell Sci, 2011. 124(Pt 7): p. 1095-105.
54. Spillmann, D., A. Lookene and G. Olivecrona, *Isolation and characterization of low sulfated heparan sulfate sequences with affinity for lipoprotein lipase.* J Biol Chem, 2006. 281(33): p. 23405-13.
55. Cisar, L.A., A.J. Hoogewerf, M. Cupp, C.A. Rapport and A. Bensadoun, *Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation.* J Biol Chem, 1989. 264(3): p. 1767-74.
56. Saxena, U., M.G. Klein and I.J. Goldberg, *Metabolism of endothelial cell-bound lipoprotein lipase. Evidence for heparan sulfate proteoglycan-mediated internalization and recycling.* J Biol Chem, 1990. 265(22): p. 12880-6.

57. Obunike, J.C., E.P. Lutz, Z. Li, L. Paka, T. Katopodis, D.K. Strickland, K.F. Kozarsky, S. Pillarisetti and I.J. Goldberg, *Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor*. J Biol Chem, 2001. 276(12): p. 8934-41.
58. Davies, B.S., A.P. Beigneux, R.H. Barnes, 2nd, Y. Tu, P. Gin, M.M. Weinstein, C. Nobumori, R. Nyren, I. Goldberg, G. Olivecrona, A. Bensadoun, S.G. Young and L.G. Fong, *GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries*. Cell Metab, 2010. 12(1): p. 42-52.
59. Voss, C.V., B.S. Davies, S. Tat, P. Gin, L.G. Fong, C. Pelletier, C.D. Mottler, A. Bensadoun, A.P. Beigneux and S.G. Young, *Mutations in lipoprotein lipase that block binding to the endothelial cell transporter GPIHBP1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(19): p. 7980-4.
60. Beigneux, A.P., B.S. Davies, P. Gin, M.M. Weinstein, E. Farber, X. Qiao, F. Peale, S. Bunting, R.L. Walzem, J.S. Wong, W.S. Blaner, Z.M. Ding, K. Melford, N. Wongsiriroj, X. Shu, F. de Sauvage, R.O. Ryan, L.G. Fong, A. Bensadoun and S.G. Young, *Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons*. Cell Metab, 2007. 5(4): p. 279-91.
61. Dallinga-Thie, G.M., R. Franssen, H.L. Mooij, M.E. Visser, H.C. Hassing, F. Peelman, J.J. Kastelein, M. Peterfy and M. Nieuwdorp, *The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight*. Atherosclerosis, 2010. 211(1): p. 1-8.
62. Semb, H. and T. Olivecrona, *Mechanisms for turnover of lipoprotein lipase in guinea pig adipocytes*. Biochim Biophys Acta, 1987. 921(1): p. 104-15.
63. Vilella, E., J. Joven, M. Fernandez, S. Vilaro, J.D. Brunzell, T. Olivecrona and G. Bengtsson-Olivecrona, *Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins*. J Lipid Res, 1993. 34(9): p. 1555-64.
64. Vilaro, S., M. Llobera, G. Bengtsson-Olivecrona and T. Olivecrona, *Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role*. Am J Physiol, 1988. 254(5 Pt 1): p. G711-22.
65. Davies, B.S., C.N. Goulbourne, R.H. Barnes, 2nd, K.A. Turlo, P. Gin, S. Vaughan, D.J. Vaux, A. Bensadoun, A.P. Beigneux, L.G. Fong and S.G. Young, *Assessing mechanisms of GPIHBP1 and lipoprotein lipase movement across endothelial cells*. J Lipid Res, 2012. 53(12): p. 2690-7.
66. Nielsen, M.S., C. Jacobsen, G. Olivecrona, J. Gliemann and C.M. Petersen, *Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase*. J Biol Chem, 1999. 274(13): p. 8832-6.
67. Preiss-Landl, K., R. Zimmermann, G. Hammerle and R. Zechner, *Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2002. 13(5): p. 471-81.
68. Sabugal, R., M.Q. Robert, J. Julve, J. Auwerx, M. Llobera and J. Peinado-Onsurbe, *Hepatic regeneration induces changes in lipoprotein lipase activity in several tissues and its re-expression in the liver*. Biochem J, 1996. 318 (Pt 2): p. 597-602.

69. Vilaro, S., M. Llobera, G. Bengtsson-Olivecrona and T. Olivecrona, *Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization of the enzyme by immunofluorescence*. *Biochem J*, 1988. 249(2): p. 549-56.
70. Giralt, M., I. Martin, S. Vilaro, F. Villarroya, T. Mampel, R. Iglesias and O. Vinas, *Lipoprotein lipase mRNA expression in brown adipose tissue: translational and/or posttranslational events are involved in the modulation of enzyme activity*. *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1048(2-3): p. 270-3.
71. Doolittle, M.H., O. Ben-Zeev, J. Elovson, D. Martin and T.G. Kirchgessner, *The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation*. *J Biol Chem*, 1990. 265(8): p. 4570-7.
72. Ruge, T., M. Svensson, J.W. Eriksson and G. Olivecrona, *Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase in humans: effects of fasting*. *Eur J Clin Invest*, 2005. 35(3): p. 194-200.
73. Bergo, M., G. Wu, T. Ruge and T. Olivecrona, *Down-regulation of adipose tissue lipoprotein lipase during fasting requires that a gene, separate from the lipase gene, is switched on*. *J Biol Chem*, 2002. 277(14): p. 11927-32.
74. Kersten, S., *Physiological regulation of lipoprotein lipase*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1841(7): p. 919-33.
75. Seip, R., T.J. Angelopoulos and C.F. Semenkovich, *Exercise induces human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue*. *Am J Physiol*, 1995. 268(2): p. 229-236.
76. Kawakami, M., T. Murase, H. Ogawa, S. Ishibashi, N. Mori, F. Takaku and S. Shibata, *Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells*. *J Biochem*, 1987. 101(2): p. 331-8.
77. Semb, H., J. Peterson, J. Tavernier and T. Olivecrona, *Multiple effects of tumor necrosis factor on lipoprotein lipase in vivo*. *J Biol Chem*, 1987. 262(17): p. 8390-4.
78. Uchida, Y., F. Tsukahara, K. Ohba, A. Ogawa, K. Irie, E. Fujii, T. Yoshimoto, T. Yoshioka and T. Muraki, *Nitric oxide mediates down regulation of lipoprotein lipase activity induced by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes*. *Eur J Pharmacol*, 1997. 335(2-3): p. 235-43.
79. Ricart-Jane, D., A. Casanovas, N. Jane, M.A. Gonzalez, I. Buirra-Morell, J. Ribera, M. Llobera and M.D. Lopez-Tejero, *Nitric oxide and the release of lipoprotein lipase from white adipose tissue*. *Cell Physiol Biochem*, 2008. 22(5-6): p. 525-30.
80. Picard, F., S. Kapur, M. Perreault, A. Marette and Y. Deshaies, *Nitric oxide mediates endotoxin-induced hypertriglyceridemia through its action on skeletal muscle lipoprotein lipase*. *FASEB J*, 2001. 15(10): p. 1828-30.
81. Hulsmann, W.C., M.L. Dubelaar, L.E. De Wit and N.L. Persoon, *Cardiac lipoprotein lipase: effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor*. *Mol Cell Biochem*, 1988. 79(2): p. 137-45.
82. Casanovas, A., M. Carrascal, J. Abian, M.D. Lopez-Tejero and M. Llobera, *Lipoprotein lipase is nitrated in vivo after lipopolysaccharide challenge*. *Free Radic Biol Med*, 2009. 47(11): p. 1553-60.

83. Ballart, X., M. Siches, J. Peinado-Onsurbe, D. Lopez-Tejero, M. Llobera, I. Ramirez and M.Q. Robert, *Isoproterenol increases active lipoprotein lipase in adipocyte medium and in rat plasma*. *Biochimie*, 2003. 85(10): p. 971-82.
84. Ricart-Jane, D., P. Cejudo-Martin, J. Peinado-Onsurbe, M.D. Lopez-Tejero and M. Llobera, *Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress*. *J Appl Physiol* (1985), 2005. 99(4): p. 1343-51.
85. Casanovas, A., N. Parramon, F. de la Cruz, O. Andres, J. Terencio, M.D. Lopez-Tejero and M. Llobera, *Retroperitoneal white adipose tissue lipoprotein lipase activity is rapidly down-regulated in response to acute stress*. *J Lipid Res*, 2007. 48(4): p. 863-8.
86. Ramirez, I., M. Llobera and E. Herrera, *Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity*. *Metabolism*, 1983. 32(4): p. 333-41.
87. Williamson, D.H., *Integration of metabolism in tissues of the lactating rat*. *FEBS Lett*, 1980. 117 Suppl: p. K93-105.
88. Neville, M.C., L.J. Waxman, D. Jensen and R.H. Eckel, *Lipoprotein lipase in human milk: compartmentalization and effect of fasting, insulin, and glucose*. *J Lipid Res*, 1991. 32(2): p. 251-7.
89. Jensen, D.R., S. Gavigan, V. Sawicki, D.L. Witsell, R.H. Eckel and M.C. Neville, *Regulation of lipoprotein lipase activity and mRNA in the mammary gland of the lactating mouse*. *Biochem J*, 1994. 298 (Pt 2): p. 321-7.
90. Hernell, O. and T. Olivecrona, *Human milk lipases. I. Serum-stimulated lipase*. *J Lipid Res*, 1974. 15(4): p. 367-74.
91. Olivecrona, T. and O. Hernell, *Human milk lipases and their possible role in fat digestion*. *Pediatr Padol*, 1976. 11(4): p. 600-4.
92. Wang, Y., J. Tong, S. Li, R. Zhang, L. Chen, M. Zheng, M. Wang, G. Liu, Y. Dai, Y. Zhao and N. Li, *Over-expression of human lipoprotein lipase in mouse mammary glands leads to reduction of milk triglyceride and delayed growth of suckling pups*. *PLoS One*, 2011. 6(6): p. e20895.
93. Pedersen, S.B., J.F. Bak, P. Holck, O. Schmitz and B. Richelsen, *Epinephrine stimulates human muscle lipoprotein lipase activity in vivo*. *Metabolism*, 1999. 48(4): p. 461-4.
94. Fried, S.K., C.D. Russell, N.L. Grauso and R.E. Brolin, *Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men*. *J Clin Invest*, 1993. 92(5): p. 2191-8.
95. Ling, C., L. Svensson, B. Oden, B. Weijdegard, B. Eden, S. Eden and H. Billig, *Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(4): p. 1804-8.
96. Fugier, C., J.J. Tousaint, X. Prieur, M. Plateroti, J. Samarut and P. Delerive, *The lipoprotein lipase inhibitor ANGPTL3 is negatively regulated by thyroid hormone*. *J Biol Chem*, 2006. 281(17): p. 11553-9.
97. Kern, P.A., G. Ranganathan, A. Yukht, J.M. Ong and R.C. Davis, *Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor*

- that interacts with the 3' untranslated region. *J Lipid Res*, 1996. 37(11): p. 2332-40.
98. Saffari, B., J.M. Ong and P.A. Kern, *Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase gene expression by thyroid hormone in rats*. *J Lipid Res*, 1992. 33(2): p. 241-9.
99. Homma, H., H. Kurachi, Y. Nishio, T. Takeda, T. Yamamoto, K. Adachi, K. Morishige, M. Ohmichi, Y. Matsuzawa and Y. Murata, *Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter*. *J Biol Chem*, 2000. 275(15): p. 11404-11.
100. Xie, W., L. Li, M. Zhang, H.P. Cheng, D. Gong, Y.C. Lv, F. Yao, P.P. He, X.P. Ouyang, G. Lan, D. Liu, Z.W. Zhao, Y.L. Tan, X.L. Zheng, W.D. Yin and C.K. Tang, *MicroRNA-27 Prevents Atherosclerosis by Suppressing Lipoprotein Lipase-Induced Lipid Accumulation and Inflammatory Response in Apolipoprotein E Knockout Mice*. *PLoS One*, 2016. 11(6): p. e0157085.
101. Tian, G.P., Y.Y. Tang, P.P. He, Y.C. Lv, X.P. Ouyang, G.J. Zhao, S.L. Tang, J.F. Wu, J.L. Wang, J. Peng, M. Zhang, Y. Li, F.S. Cayabyab, X.L. Zheng, D.W. Zhang, W.D. Yin and C.K. Tang, *The effects of miR-467b on lipoprotein lipase (LPL) expression, pro-inflammatory cytokine, lipid levels and atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 443(2): p. 428-34.
102. Chen, T., Z. Li, J. Tu, W. Zhu, J. Ge, X. Zheng, L. Yang, X. Pan, H. Yan and J. Zhu, *MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells*. *FEBS Lett*, 2011. 585(4): p. 657-63.
103. Bouvy-Liivrand, M., M. Heinaniemi, E. John, J.G. Schneider, T. Sauter and L. Sinkkonen, *Combinatorial regulation of lipoprotein lipase by microRNAs during mouse adipogenesis*. *RNA Biol*, 2014. 11(1): p. 76-91.
104. Ahn, J., H. Lee, C.H. Chung and T. Ha, *High fat diet induced downregulation of microRNA-467b increased lipoprotein lipase in hepatic steatosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 414(4): p. 664-9.
105. Peterfy, M., O. Ben-Zeev, H.Z. Mao, D. Weissglas-Volkov, B.E. Aouizerat, C.R. Pullinger, P.H. Frost, J.P. Kane, M.J. Malloy, K. Reue, P. Pajukanta and M.H. Doolittle, *Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia*. *Nat Genet*, 2007. 39(12): p. 1483-7.
106. Vallerie, S.N. and K.E. Bornfeldt, *GPIHBP1: two get tangled*. *Circ Res*, 2015. 116(4): p. 560-2.
107. Mysling, S., K.K. Kristensen, M. Larsson, A.P. Beigneux, H. Gardsvoll, L.G. Fong, A. Bensadoun, T.J. Jorgensen, S.G. Young and M. Ploug, *The acidic domain of the endothelial membrane protein GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase activity by preventing unfolding of its catalytic domain*. *Elife*, 2016. 5: p. e12095.
108. Gin, P., C.N. Goulbourne, O. Adeyo, A.P. Beigneux, B.S. Davies, S. Tat, C.V. Voss, A. Bensadoun, L.G. Fong and S.G. Young, *Chylomicronemia mutations yield new insights into interactions between lipoprotein lipase and GPIHBP1*. *Hum Mol Genet*, 2012. 21(13): p. 2961-72.

109. Birrane, G., A.P. Beigneux, B. Dwyer, B. Strack-Logue, K.K. Kristensen, O.L. Francone, L.G. Fong, H.D.T. Mertens, C.Q. Pan, M. Ploug, S.G. Young and M. Meiyappan, *Structure of the lipoprotein lipase-GPIHBP1 complex that mediates plasma triglyceride hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018.
110. Sonnenburg, W.K., D. Yu, E.C. Lee, W. Xiong, G. Gololobov, B. Key, J. Gay, N. Wilganowski, Y. Hu, S. Zhao, M. Schneider, Z.M. Ding, B.P. Zambrowicz, G. Landes, D.R. Powell and U. Desai, *GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4*. J Lipid Res, 2009. 50(12): p. 2421-9.
111. Llinas, P., M.H. Le Du, H. Gardsvoll, K. Dano, M. Ploug, B. Gilquin, E.A. Stura and A. Menez, *Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide*. EMBO J, 2005. 24(9): p. 1655-63.
112. LaRosa, J.C., R.I. Levy, P. Herbert, S.E. Lux and D.S. Fredrickson, *A specific apolipoprotein activator for lipoprotein lipase*. Biochem Biophys Res Commun, 1970. 41(1): p. 57-62.
113. Bengtsson, G. and T. Olivecrona, *Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein CII. Demonstration of an effect of the activator on the binding of the enzyme to milk-fat globules*. FEBS Lett, 1982. 147(2): p. 183-7.
114. Zdunek, J., G.V. Martinez, J. Schleucher, P.O. Lycksell, Y. Yin, S. Nilsson, Y. Shen, G. Olivecrona and S. Wijmenga, *Global structure and dynamics of human apolipoprotein CII in complex with micelles: evidence for increased mobility of the helix involved in the activation of lipoprotein lipase*. Biochemistry, 2003. 42(7): p. 1872-89.
115. Meyers, N.L., M. Larsson, G. Olivecrona and D.M. Small, *A Pressure-dependent Model for the Regulation of Lipoprotein Lipase by Apolipoprotein C-II*. J Biol Chem, 2015. 290(29): p. 18029-44.
116. Baggio, G., E. Manzato, C. Gabelli, R. Fellin, S. Martini, G.B. Enzi, F. Verlato, M.R. Baiocchi, D.L. Sprecher, M.L. Kashyap and et al., *Apolipoprotein C-II deficiency syndrome. Clinical features, lipoprotein characterization, lipase activity, and correction of hypertriglyceridemia after apolipoprotein C-II administration in two affected patients*. J Clin Invest, 1986. 77(2): p. 520-7.
117. Shachter, N.S., T. Hayek, T. Leff, J.D. Smith, D.W. Rosenberg, A. Walsh, R. Ramakrishnan, I.J. Goldberg, H.N. Ginsberg and J.L. Breslow, *Overexpression of apolipoprotein CII causes hypertriglyceridemia in transgenic mice*. J Clin Invest, 1994. 93(4): p. 1683-90.
118. Kei, A.A., T.D. Filippatos, V. Tsimihodimos and M.S. Elisaf, *A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease*. Metabolism, 2012. 61(7): p. 906-21.
119. Amar, M.J., T. Sakurai, A. Sakurai-Ikuta, D. Sviridov, L. Freeman, L. Ahsan and A.T. Remaley, *A novel apolipoprotein C-II mimetic peptide that activates lipoprotein lipase and decreases serum triglycerides in apolipoprotein E-knockout mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. 352(2): p. 227-35.
120. Merkel, M. and J. Heeren, *Give me A5 for lipoprotein hydrolysis!* J Clin Invest, 2005. 115(10): p. 2694-6.
121. Merkel, M., B. Loeffler, M. Kluger, N. Fabig, G. Geppert, L.A. Pennacchio, A. Laatsch and J. Heeren, *Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of*

- triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase.* J Biol Chem, 2005. 280(22): p. 21553-60.
122. Nilsson, S.K., J. Heeren, G. Olivecrona and M. Merkel, *Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer.* Atherosclerosis, 2011. 219(1): p. 15-21.
123. Vaessen, S.F., G.M. Dallinga-Thie, C.J. Ross, L.J. Splint, L.W. Castellani, P.C. Rensen, M.R. Hayden, F.G. Schaap and J.A. Kuivenhoven, *Plasma apolipoprotein AV levels in mice are positively associated with plasma triglyceride levels.* J Lipid Res, 2009. 50(5): p. 880-4.
124. Mendoza-Barbera, E., J. Julve, S.K. Nilsson, A. Lookene, J.M. Martin-Campos, R. Roig, A.M. Lechuga-Sancho, J.H. Sloan, P. Fuentes-Prior and F. Blanco-Vaca, *Structural and functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia.* J Lipid Res, 2013. 54(3): p. 649-61.
125. Huang, Y.J., Y.L. Lin, C.I. Chiang, C.T. Yen, S.W. Lin and J.T. Kao, *Functional importance of apolipoprotein A5 185G in the activation of lipoprotein lipase.* Clin Chim Acta, 2012. 413(1-2): p. 246-50.
126. Westerterp, M., W. de Haan, J.F. Berbee, L.M. Havekes and P.C. Rensen, *Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL.* J Lipid Res, 2006. 47(6): p. 1203-11.
127. Larsson, M., E. Vorrso, P. Talmud, A. Lookene and G. Olivecrona, *Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets.* J Biol Chem, 2013. 288(47): p. 33997-4008.
128. Cyr, Y., H. Wassef, S. Bissonnette, V. Lamantia, J. Davignon and M. Faraj, *WAT apoC-I secretion: role in delayed chylomicron clearance in vivo and ex vivo in WAT in obese subjects.* J Lipid Res, 2016. 57(6): p. 1074-85.
129. Lambert, D.A., L.C. Smith, H. Pownall, J.T. Sparrow, J.P. Nicolas and A.M. Gotto, Jr., *Hydrolysis of phospholipids by purified milk lipoprotein lipase. Effect of apoprotein CII, CIII, A and E, and synthetic fragments.* Clin Chim Acta, 2000. 291(1): p. 19-33.
130. Taskinen, M.R. and J. Boren, *Why Is Apolipoprotein CIII Emerging as a Novel Therapeutic Target to Reduce the Burden of Cardiovascular Disease?* Curr Atheroscler Rep, 2016. 18(10): p. 59.
131. Staels, B., N. Vu-Dac, V.A. Kosykh, R. Saladin, J.C. Fruchart, J. Dallongeville and J. Auwerx, *Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates.* J Clin Invest, 1995. 95(2): p. 705-12.
132. Larsson, M., C.M. Allan, R.S. Jung, P.J. Heizer, A.P. Beigneux, S.G. Young and L.G. Fong, *Apolipoprotein C-III inhibits triglyceride hydrolysis by GPIIIBP1-bound LPL.* J Lipid Res, 2017. 58(9): p. 1893-1902.
133. Rensen, P.C. and T.J. van Berkel, *Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo.* J Biol Chem, 1996. 271(25): p. 14791-9.
134. Mensenkamp, A.R., M.C. Jong, H. van Goor, M.J. van Luyn, V. Bloks, R. Havinga, P.J. Voshol, M.H. Hofker, K.W. van Dijk, L.M. Havekes and F. Kuipers, *Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density*

- lipoprotein-triglyceride secretion by the liver*. J Biol Chem, 1999. 274(50): p. 35711-8.
135. Tikka, A. and M. Jauhiainen, *The role of ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism*. Endocrine, 2016. 52(2): p. 187-93.
136. Liu, J., H. Afroza, D.J. Rader and W. Jin, *Angiopietin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases*. J Biol Chem, 2010. 285(36): p. 27561-70.
137. Gusarova, V., C.A. Alexa, Y. Wang, A. Rafique, J.H. Kim, D. Buckler, I.J. Mintah, L.M. Shihanian, J.C. Cohen, H.H. Hobbs, Y. Xin, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, G.D. Yancopoulos and J. Gromada, *ANGPTL3 blockade with a human monoclonal antibody reduces plasma lipids in dyslipidemic mice and monkeys*. J Lipid Res, 2015. 56(7): p. 1308-17.
138. Quagliarini, F., Y. Wang, J. Kozlitina, N.V. Grishin, R. Hyde, E. Boerwinkle, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, J.C. Cohen and H.H. Hobbs, *Atypical angiopietin-like protein that regulates ANGPTL3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(48): p. 19751-6.
139. Yoshida, K., T. Shimizugawa, M. Ono and H. Furukawa, *Angiopietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase*. J Lipid Res, 2002. 43(11): p. 1770-2.
140. Yau, M.H., Y. Wang, K.S. Lam, J. Zhang, D. Wu and A. Xu, *A highly conserved motif within the NH2-terminal coiled-coil domain of angiopietin-like protein 4 confers its inhibitory effects on lipoprotein lipase by disrupting the enzyme dimerization*. J Biol Chem, 2009. 284(18): p. 11942-52.
141. Sukonina, V., A. Lookene, T. Olivecrona and G. Olivecrona, *Angiopietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(46): p. 17450-5.
142. Chi, X., S.K. Shetty, H.W. Shows, A.J. Hjelmaas, E.K. Malcolm and B.S. Davies, *Angiopietin-like 4 Modifies the Interactions between Lipoprotein Lipase and Its Endothelial Cell Transporter GPIHBP1*. J Biol Chem, 2015. 290(19): p. 11865-77.
143. Dijk, W., A.P. Beigneux, M. Larsson, A. Bensadoun, S.G. Young and S. Kersten, *Angiopietin-like 4 promotes intracellular degradation of lipoprotein lipase in adipocytes*. J Lipid Res, 2016. 57(9): p. 1670-83.
144. Dijk, W., P.M.M. Ruppert, L.J. Oost and S. Kersten, *Angiopietin-like 4 promotes the intracellular cleavage of lipoprotein lipase by PCSK3/furin in adipocytes*. J Biol Chem, 2018. 293(36): p. 14134-14145.
145. Lan, G., W. Xie, L. Li, M. Zhang, D. Liu, Y.L. Tan, H.P. Cheng, D. Gong, C. Huang, X.L. Zheng, W.D. Yin and C.K. Tang, *MicroRNA-134 activates lipoprotein lipase-mediated lipid accumulation and inflammatory response by targeting angiopietin-like 4 in THP-1 macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. 472(3): p. 410-7.
146. Puthanveetil, P., A. Wan and B. Rodrigues, *Lipoprotein lipase and angiopietin-like 4 - Cardiomyocyte secretory proteins that regulate metabolism during diabetic heart disease*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2015. 52(3): p. 138-49.

147. Lafferty, M.J., K.C. Bradford, D.A. Erie and S.B. Neher, *Angiopoietin-like protein 4 inhibition of lipoprotein lipase: evidence for reversible complex formation*. J Biol Chem, 2013. 288(40): p. 28524-34.
148. Kroupa, O., E. Vorrsjo, R. Stienstra, F. Mattijssen, S.K. Nilsson, V. Sukonina, S. Kersten, G. Olivecrona and T. Olivecrona, *Linking nutritional regulation of Angptl4, Gpihbp1, and Lmf1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue*. BMC Physiol, 2012. 12: p. 13.
149. Catoire, M., S. Alex, N. Paraskevopoulos, F. Mattijssen, I. Evers-van Gogh, G. Schaart, J. Jeppesen, A. Kneppers, M. Mensink, P.J. Voshol, G. Olivecrona, N.S. Tan, M.K. Hesselink, J.F. Berbee, P.C. Rensen, E. Kalkhoven, P. Schrauwen and S. Kersten, *Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(11): p. E1043-52.
150. Dijk, W., M. Heine, L. Vergnes, M.R. Boon, G. Schaart, M.K. Hesselink, K. Reue, W.D. van Marken Lichtenbelt, G. Olivecrona, P.C. Rensen, J. Heeren and S. Kersten, *ANGPTL4 mediates shuttling of lipid fuel to brown adipose tissue during sustained cold exposure*. Elife, 2015. 4.
151. Dijk, W., S. Schutte, E.O. Aarts, I.M.C. Janssen, L. Afman and S. Kersten, *Regulation of angiopoietin-like 4 and lipoprotein lipase in human adipose tissue*. J Clin Lipidol, 2018. 12(3): p. 773-783.
152. Dijk, W. and S. Kersten, *Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins*. Curr Opin Lipidol, 2016. 27(3): p. 249-56.
153. Haller, J.F., I.J. Mintah, L.M. Shihanian, P. Stevis, D. Buckler, C.A. Alexa-Braun, S. Kleiner, S. Banfi, J.C. Cohen, H.H. Hobbs, G.D. Yancopoulos, A.J. Murphy, V. Gusarova and J. Gromada, *ANGPTL8 requires ANGPTL3 to inhibit lipoprotein lipase and plasma triglyceride clearance*. J Lipid Res, 2017. 58(6): p. 1166-1173.
154. Gaudet, D., J. Methot and J. Kastelein, *Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency*. Curr Opin Lipidol, 2012. 23(4): p. 310-20.
155. Nierman, M.C., J. Rip, J. Twisk, J.J. Meulenberg, J.J. Kastelein, E.S. Stroes and J.A. Kuivenhoven, *Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice*. Neth J Med, 2005. 63(1): p. 14-9.
156. Semenkovich, C.F., A.C. Goldberg and I.J. Goldberg, *Disorders of lipid metabolism*. Del llibre: Williams textbook of endocrinology (13^a Ed.). 2015. Chapter 37: p. 1660-1700.
157. Wierzbicki, A.S. and A. Viljoen, *Alipogene tiparvovec: gene therapy for lipoprotein lipase deficiency*. Expert Opin Biol Ther, 2013. 13(1): p. 7-10.
158. Vilaro, S., R. Buscá, T. Olivecrona and M. Reina, *Bases genéticas, moleculares y celulares de la quilomicronemia*. Del llibre: Patología molecular. Masson, Barcelona, Espanya., 2003. Editors: González Sastre, F. Guinovart, J.: p. 181-218.
159. Heck, A.M., J.A. Yanovski and K.A. Calis, *Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity*. Pharmacotherapy, 2000. 20(3): p. 270-9.
160. Reiner, Z., *Triglyceride-Rich Lipoproteins and Novel Targets for Anti-atherosclerotic Therapy*. Korean Circ J, 2018. 48(12): p. 1097-1119.

161. Olivecrona, G., *Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2016. 27(3): p. 233-41.
162. Pardina, E., A. Lecube, R. Llamas, R. Catalan, R. Galard, J.M. Fort, H. Allende, V. Vargas, J.A. Baena-Fustegueras and J. Peinado-Onsurbe, *Lipoprotein lipase but not hormone-sensitive lipase activities achieve normality after surgically induced weight loss in morbidly obese patients*. *Obes Surg*, 2009. 19(8): p. 1150-8.
163. Pardina, E., J.A. Baena-Fustegueras, R. Llamas, R. Catalan, R. Galard, A. Lecube, J.M. Fort, M. Llobera, H. Allende, V. Vargas and J. Peinado-Onsurbe, *Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis*. *Obes Surg*, 2009. 19(5): p. 608-16.
164. Kern, P.A., *Potential role of TNFalpha and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity*. *J Nutr*, 1997. 127(9): p. 1917S-1922S.
165. Wang, H. and R.H. Eckel, *Lipoprotein lipase in the brain and nervous system*. *Annu Rev Nutr*, 2012. 32: p. 147-60.
166. Gong, H., W. Dong, S.W. Rostad, S.M. Marcovina, J.J. Albers, J.D. Brunzell and S. Vuletic, *Lipoprotein lipase (LPL) is associated with neurite pathology and its levels are markedly reduced in the dentate gyrus of Alzheimer's disease brains*. *J Histochem Cytochem*, 2013. 61(12): p. 857-68.
167. Nishitsuji, K., T. Hosono, K. Uchimura and M. Michikawa, *Lipoprotein lipase is a novel amyloid beta (Abeta)-binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of Abeta in astrocytes*. *J Biol Chem*, 2011. 286(8): p. 6393-401.
168. Prieto, D. and P. Oppezzo, *Lipoprotein Lipase Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia: New Insights into Leukemic Progression*. *Molecules*, 2017. 22(12).
169. Bilous, N., I. Abramenko, A. Chumak, I. Dyagil and Z. Martina, *Analysis of LPL gene expression in patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Exp Oncol*, 2019. 41(1): p. 39-45.
170. Smith, L.M. and N.L. Kelleher, *Proteoform: a single term describing protein complexity*. *Nat Methods*, 2013. 10(3): p. 186-7.
171. Rodriguez-Pineiro, A.M., P. Alvarez-Chaver, V.S. Martinez-Zorzano, F.J. Rodriguez-Berrocal and M.P. de la Cadena, *Relevance of protein isoforms in proteomic studies*. *Current Proteomics*, 2007. 4(4): p. 235-252.
172. Tipton, J.D., J.C. Tran, A.D. Catherman, D.R. Ahlf, K.R. Durbin and N.L. Kelleher, *Analysis of intact protein isoforms by mass spectrometry*. *J Biol Chem*, 2011. 286(29): p. 25451-8.
173. Pascovici, D., J.X. Wu, M.J. McKay, C. Joseph, Z. Noor, K. Kamath, Y. Wu, S. Ranganathan, V. Gupta and M. Mirzaei, *Clinically Relevant Post-Translational Modification Analyses-Maturing Workflows and Bioinformatics Tools*. *Int J Mol Sci*, 2018. 20(1).
174. Pagel, O., S. Loroch, A. Sickmann and R.P. Zahedi, *Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics*. *Expert Rev Proteomics*, 2015. 12(3): p. 235-53.
175. Mann, M. and O.N. Jensen, *Proteomic analysis of post-translational modifications*. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(3): p. 255-61.

176. Batthyany, C., S. Bartesaghi, M. Mastrogiovanni, A. Lima, V. Demicheli and R. Radi, *Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects*. *Antioxid Redox Signal*, 2017. 26(7): p. 313-328.
177. Sato, K., Y. Akiba and M. Horiguchi, *Species differences between chickens and rats in chemical properties of adipose tissue lipoprotein lipase*. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 1997. 118(3): p. 855-8.
178. Augustin, J., H. Freeze, P. Tejada and W.V. Brown, *A comparison of molecular properties of hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase from human post-heparin plasma*. *J Biol Chem*, 1978. 253(9): p. 2912-20.
179. Soteriou, A. and A. Cryer, *Comparison of the purification of lipoprotein lipase from various rat tissues*. *Biochem Soc Trans*, 1993. 21(2): p. 134S.
180. Casanovas, A., M. Carrascal, J. Abian, M.D. Lopez-Tejero and M. Llobera, *Discovery of lipoprotein lipase pI isoforms and contributions to their characterization*. *J Proteomics*, 2009. 72(6): p. 1031-9.
181. Carulla i Sanmartí, P., *Isoformes de pI de la lipoproteïna lipasa: Origen, distribució i funció*. Tesis Doctoral, 2017: p. 229.
182. Okamoto, S., T. Murano, T. Suzuki, S. Uematsu, Y. Niwa, Y. Sasazawa, N. Dohmae, H. Bujo and S. Simizu, *Regulation of secretion and enzymatic activity of lipoprotein lipase by C-mannosylation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. 486(2): p. 558-563.
183. Kojima, H. and O. Numata, *Enzymatic form and cytoskeletal form of bifunctional Tetrahymena 49kDa protein is regulated by phosphorylation*. *Zoolog Sci*, 2002. 19(1): p. 37-42.
184. Andersen, C.Y., L. Leonardsen, A. Ulloa-Aguirre, J. Barrios-De-Tomasi, K.S. Kristensen and A.G. Byskov, *Effect of different FSH isoforms on cyclic-AMP production by mouse cumulus-oocyte-complexes: a time course study*. *Mol Hum Reprod*, 2001. 7(2): p. 129-35.
185. Yding Andersen, C., L. Leonardsen, A. Ulloa-Aguirre, J. Barrios-De-Tomasi, L. Moore and A.G. Byskov, *FSH-induced resumption of meiosis in mouse oocytes: effect of different isoforms*. *Mol Hum Reprod*, 1999. 5(8): p. 726-31.
186. Stulik, J., J. Osterreicher, K. Koupilova, J. Knizek, J. Bures, P. Jandik, F. Langr, K. Dedic, B.W. Schafer and C.W. Heizmann, *Differential expression of the Ca²⁺ binding S100A6 protein in normal, preneoplastic and neoplastic colon mucosa*. *Eur J Cancer*, 2000. 36(8): p. 1050-9.
187. Natale, M., D. Bonino, P. Consoli, T. Alberio, R.G. Ravid, M. Fasano and E.M. Bucci, *A meta-analysis of two-dimensional electrophoresis pattern of the Parkinson's disease-related protein DJ-1*. *Bioinformatics*, 2010. 26(7): p. 946-52.
188. Sampey, B.P., A.M. Vanhoose, H.M. Winfield, A.J. Freemerman, M.J. Muehlbauer, P.T. Fueger, C.B. Newgard and L. Makowski, *Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet*. *Obesity (Silver Spring)*, 2011. 19(6): p. 1109-17.
189. Despres, J.P., *Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?* *Ann Med*, 2006. 38(1): p. 52-63.

190. Williams, S.P. and E.A. Johnson, *Release of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in rats by heparin and other sulphated polysaccharides*. *Thromb Res*, 1989. 55(3): p. 361-8.
191. Ruge, T., A. Svensson, J.W. Eriksson, T. Olivecrona and G. Olivecrona, *Food deprivation increases post-heparin lipoprotein lipase activity in humans*. *Eur J Clin Invest*, 2001. 31(12): p. 1040-7.
192. Speakman, J., C. Hambly, S. Mitchell and E. Krol, *The contribution of animal models to the study of obesity*. *Lab Anim*, 2008. 42(4): p. 413-32.
193. Sampey, B.P., A.M. Vanhoose, H.M. Winfield, A.J. Freerman, M.J. Muehlbauer, P.T. Fueger, C.B. Newgard and L. Makowski, *Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet*. *Obesity (Silver Spring)*. 19(6): p. 1109-17.
194. Aleixandre, A. and M. Miguel, *Zucker rats as an experimental model for the study of various diseases*. *Endocrinol Nutr*, 2008. 55(5): p. 217-22.
195. Mamikutty, N., Z.C. Thent, S.R. Sapri, N.N. Sahrudin, M.R. Mohd Yusof and F. Haji Suhaimi, *The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats*. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 263897.
196. Novelli, E.L., Y.S. Diniz, C.M. Galhardi, G.M. Ebaid, H.G. Rodrigues, F. Mani, A.A. Fernandes, A.C. Cicogna and J.L. Novelli Filho, *Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats*. *Lab Anim*, 2007. 41(1): p. 111-9.
197. Rovamo, L., E.A. Nikkila, M.R. Taskinen and K.O. Raivio, *Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipases in preterm neonates*. *Pediatr Res*, 1984. 18(11): p. 1104-7.
198. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
199. Fossati, P. and L. Prencipe, *Serum Triglycerides Determined Colorimetrically with an Enzyme That Produces Hydrogen Peroxide*. *Clinical Chemistry*, 1982. 28(10): p. 2077-2080.
200. Julve, J., M.Q. Robert, M. Llobera and J. Peinado-Onsurbe, *Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes*. *Mol Cell Endocrinol*, 1996. 116(1): p. 97-104.
201. Ramirez, I., A.J. Kryski, O. Ben-Zeev, M.C. Schotz and D.L. Severson, *Characterization of triacylglycerol hydrolase activities in isolated myocardial cells from rat heart*. *Biochem J*, 1985. 232(1): p. 229-36.
202. Badia-Villanueva, M., P. Carulla, M. Carrascal, J. Abian, M. Llobera, A. Casanovas and M. Dolores Lopez-Tejero, *Lipoprotein lipase isoelectric point isoforms in humans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 445(2): p. 480-5.
203. Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm and M. Mann, *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. *Anal Chem*, 1996. 68(5): p. 850-8.
204. Heukeskoven, J. and R. Dernick, *Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining*. *Electrophoresis*, 1985. 6(3): p. 103-112.

205. Croxatto, A., G. Prod'hom and G. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev, 2011. 36(2): p. 380-407.
206. Fenn, J.B., M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong and C.M. Whitehouse, *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. 246(4926): p. 64-71.
207. Steen, H. and M. Mann, *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(9): p. 699-711.
208. Meher, A.K. and Y.C. Chen, *Electrospray Modifications for Advancing Mass Spectrometric Analysis*. Mass Spectrom (Tokyo), 2017. 6(Spec Iss): p. S0057.
209. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. 60(20): p. 2299-301.
210. Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida and T. Matsuo, *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988. 2(8): p. 151-153.
211. Chong, Y.K., C.C. Ho, S.Y. Leung, S.K.P. Lau and P.C.Y. Woo, *Clinical Mass Spectrometry in the Bioinformatics Era: A Hitchhiker's Guide*. Comput Struct Biotechnol J, 2018. 16: p. 316-334.
212. Zechner, R., *Rapid and simple isolation procedure for lipoprotein lipase from human milk*. Biochim Biophys Acta, 1990. 1044(1): p. 20-5.
213. Picariello, G., P. Ferranti, G. Mamone, P. Roepstorff and F. Addeo, *Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry*. Proteomics, 2008. 8(18): p. 3833-47.
214. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. 1(11): p. 845-67.
215. Wang, C.S., H.B. Bass, D. Downs and R.K. Whitmer, *Modified heparin-Sepharose procedure for determination of plasma lipolytic activities of normolipidemic and hyperlipidemic subjects after injection of heparin*. Clin Chem, 1981. 27(5): p. 663-8.
216. Chang, S.F., B. Reich, J.D. Brunzell and H. Will, *Detailed characterization of the binding site of the lipoprotein lipase-specific monoclonal antibody 5D2*. J Lipid Res, 1998. 39(12): p. 2350-9.
217. Casanovas, A., M. Carrascal, J. Abian, M.D. Lopez-Tejero and M. Llobera, *Application of proteomic tools to detect the nonspecificity of a polyclonal antibody against lipoprotein lipase*. J Proteome Res, 2008. 7(9): p. 4173-7.
218. Urbas, L., P. Brne, B. Gabor, M. Barut, M. Strlic, T.C. Petric and A. Strancar, *Depletion of high-abundance proteins from human plasma using a combination of an affinity and pseudo-affinity column*. J Chromatogr A, 2009. 1216(13): p. 2689-94.
219. Liu, H., G. Gaza-Bulseco, C. Chumsae and A. Newby-Kew, *Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1*

- antibodies on non-reducing SDS-PAGE*. Biotechnol Lett, 2007. 29(11): p. 1611-22.
220. Shahani, K.M., A.J. Kwan and B.A. Friend, *Role and significance of enzymes in human milk*. Am J Clin Nutr, 1980. 33(8): p. 1861-8.
221. Liao, Y., R. Alvarado, B. Phinney and B. Lonnerdal, *Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period*. J Proteome Res, 2011. 10(4): p. 1746-54.
222. Neville, M.C. and M.F. Picciano, *Regulation of milk lipid secretion and composition*. Annu Rev Nutr, 1997. 17: p. 159-83.
223. Martin-Hidalgo, A., L. Huerta, N. Alvarez, G. Alegria, M. Del Val Toledo and E. Herrera, *Expression, activity, and localization of hormone-sensitive lipase in rat mammary gland during pregnancy and lactation*. J Lipid Res, 2005. 46(4): p. 658-68.
224. Palmer, D.J., V.C. Kelly, A.M. Smit, S. Kuy, C.G. Knight and G.J. Cooper, *Human colostrum: identification of minor proteins in the aqueous phase by proteomics*. Proteomics, 2006. 6(7): p. 2208-16.
225. Li, X., S. Lindquist, M. Lowe, L. Noppa and O. Hernell, *Bile salt-stimulated lipase and pancreatic lipase-related protein 2 are the dominating lipases in neonatal fat digestion in mice and rats*. Pediatr Res, 2007. 62(5): p. 537-41.
226. Fox, P.F., *Advanced dairy chemistry : proteins*. 1st ed ed. 1995, London: Elsevier Applied Science. XI, 781 p.
227. Pfister, J.F., C.P. Cramer and E.M. Blass, *Suckling in rats extended by continuous living with dams and their preweanling litters*. Animal Behaviour, 1986. 34: p. 415-420.
228. Herrera, E., M.A. Lasuncion, D. Gomez-Coronado, P. Aranda, P. Lopez-Luna and I. Maier, *Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 1988. 158(6 Pt 2): p. 1575-83.
229. Martin-Hidalgo, A., C. Holm, P. Belfrage, M.C. Schotz and E. Herrera, *Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy*. Am J Physiol, 1994. 266(6 Pt 1): p. E930-5.
230. Fernandes, F.S., F.L. Sardinha, M. Badia-Villanueva, P. Carulla, E. Herrera and M.G. Tavares do Carmo, *Dietary lipids during early pregnancy differently influence adipose tissue metabolism and fatty acid composition in pregnant rats with repercussions on pup's development*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2012. 86(4-5): p. 167-74.
231. Alvarez, J.J., A. Montelongo, A. Iglesias, M.A. Lasuncion and E. Herrera, *Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women*. J Lipid Res, 1996. 37(2): p. 299-308.
232. Argiles, J. and E. Herrera, *Lipids and lipoproteins in maternal and fetus plasma in the rat*. Biol Neonate, 1981. 39(1-2): p. 37-44.
233. Freeman, M.E., B. Kanyicska, A. Lerant and G. Nagy, *Prolactin: structure, function, and regulation of secretion*. Physiol Rev, 2000. 80(4): p. 1523-631.

234. Zinder, O., M. Hamosh, T.R. Fleck and R.O. Scow, *Effect of prolactin on lipoprotein lipase in mammary glands and adipose tissue of rats*. Am J Physiol, 1974. 226(3): p. 742-8.
235. Robinson, G.W., R.A. McKnight, G.H. Smith and L. Hennighausen, *Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation*. Development, 1995. 121(7): p. 2079-90.
236. Monks, J., M. Dzieciatkowska, E.S. Bales, D.J. Orlicky, R.M. Wright and J.L. McManaman, *Xanthine oxidoreductase mediates membrane docking of milk-fat droplets but is not essential for apocrine lipid secretion*. J Physiol, 2016. 594(20): p. 5899-5921.
237. McManaman, J.L. and M.C. Neville, *Mammary physiology and milk secretion*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. 55(5): p. 629-41.
238. Jensen, D.R., D.H. Bessesen, J. Etienne, R.H. Eckel and M.C. Neville, *Distribution and source of lipoprotein lipase in mouse mammary gland*. J Lipid Res, 1991. 32(5): p. 733-42.
239. Ringseis, R., C. Dathe, A. Muschick, C. Brandsch and K. Eder, *Oxidized fat reduces milk triacylglycerol concentrations by inhibiting gene expression of lipoprotein lipase and fatty acid transporters in the mammary gland of rats*. J Nutr, 2007. 137(9): p. 2056-61.
240. Friedman, D.B., S. Hoving and R. Westermeier, *Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis*. Methods Enzymol, 2009. 463: p. 515-40.
241. Righetti, P.G., A. Bossi, A. Gorg, C. Obermaier and G. Boguth, *Steady-state two-dimensional maps of very alkaline proteins in an immobilized pH 10-12 gradient, as exemplified by histone types*. J Biochem Biophys Methods, 1996. 31(3-4): p. 81-91.
242. Gianazza, E. and P.G. Righetti, *Immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 2009. 30 Suppl 1: p. S112-21.
243. Righetti, P.G. and G. Candiano, *Recent advances in electrophoretic techniques for the characterization of protein biomolecules: a poker of aces*. J Chromatogr A, 2011. 1218(49): p. 8727-37.
244. Righetti, P.G., C. Simo, R. Sebastiano and A. Citterio, *Carrier ampholytes for IEF, on their fortieth anniversary (1967-2007), brought to trial in court: the verdict*. Electrophoresis, 2007. 28(21): p. 3799-810.
245. Lasne, F. and J. de Ceaurriz, *Recombinant erythropoietin in urine*. Nature, 2000. 405(6787): p. 635.
246. Chevalier, F., *Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics*. Proteome Sci, 2010. 8: p. 23.
247. Guo, C.G., Z. Shang, J. Yan, S. Li, G.Q. Li, R.Z. Liu, Y. Qing, L.Y. Fan, H. Xiao and C.X. Cao, *A tunable isoelectric focusing via moving reaction boundary for two-dimensional gel electrophoresis and proteomics*. Talanta, 2015. 137: p. 197-203.
248. Millionsi, R., C. Franchin, P. Tessari, R. Polati, D. Cecconi and G. Arrigoni, *Pros and cons of peptide isoelectric focusing in shotgun proteomics*. J Chromatogr A, 2013. 1293: p. 1-9.

249. Berkow, S.E., L.M. Freed, M. Hamosh, J. Bitman, D.L. Wood, B. Happ and P. Hamosh, *Lipases and lipids in human milk: effect of freeze-thawing and storage*. *Pediatr Res*, 1984. 18(12): p. 1257-62.
250. Benavides, A., M. Siches and M. Llobera, *Circadian rhythms of lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in intermediate metabolism of adult rat*. *Am J Physiol*, 1998. 275(3 Pt 2): p. R811-7.
251. Hassiotou, F., A.R. Hepworth, T.M. Williams, A.J. Twigger, S. Perrella, C.T. Lai, L. Filgueira, D.T. Geddes and P.E. Hartmann, *Breastmilk cell and fat contents respond similarly to removal of breastmilk by the infant*. *PLoS One*, 2013. 8(11): p. e78232.
252. Jensen, R.G., *Handbook of milk composition*. 1995, San Diego [etc.]: Academic Press. XIX, 919 p.
253. Wang, Y., G. Lu, W.P. Wong, J.F. Vliegenthart, G.J. Gerwig, K.S. Lam, G.J. Cooper and A. Xu, *Proteomic and functional characterization of endogenous adiponectin purified from fetal bovine serum*. *Proteomics*, 2004. 4(12): p. 3933-42.
254. Stromqvist, M., O. Hernell, L. Hansson, K. Lindgren, A. Skytt, L. Lundberg, A.S. Lidmer and L. Blackberg, *Naturally occurring variants of human milk bile salt-stimulated lipase*. *Arch Biochem Biophys*, 1997. 347(1): p. 30-6.
255. Froehlich, J.W., E.D. Dodds, M. Barboza, E.L. McJimpsey, R.R. Seipert, J. Francis, H.J. An, S. Freeman, J.B. German and C.B. Lebrilla, *Glycoprotein expression in human milk during lactation*. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(10): p. 6440-8.
256. Morroni, M., A. Giordano, M.C. Zingaretti, R. Boiani, R. De Matteis, B.B. Kahn, E. Nisoli, C. Tonello, C. Pisoschi, M.M. Luchetti, M. Marelli and S. Cinti, *Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(48): p. 16801-6.
257. Hollenberg, C.H., *The origin and glyceride distribution of fatty acids in rat adipose tissue*. *J Clin Invest*, 1966. 45(2): p. 205-16.
258. Johnson, P.R., L.M. Zucker, J.A. Cruce and J. Hirsch, *Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat*. *J Lipid Res*, 1971. 12(6): p. 706-14.
259. de Gasquet, P., E. Pequignot, D. Lemonnier and A. Alexiu, *Adipose-tissue lipoprotein lipase activity and cellularity in the genetically obese Zucker rat (fa/fa)*. *Biochem J*, 1973. 132(3): p. 633-5.
260. Maggio, C.A. and M.R. Greenwood, *Adipose tissue lipoprotein lipase (LPL) and triglyceride uptake in Zucker rats*. *Physiol Behav*, 1982. 29(6): p. 1147-52.
261. Dugail, I., A. Quignard-Boulangé, L. Brigant, J. Etienne, L. Noe and M. Lavau, *Increased lipoprotein lipase content in the adipose tissue of suckling and weaning obese Zucker rats*. *Biochem J*, 1988. 249(1): p. 45-9.
262. Boulangé, A., E. Planche and P. de Gasquet, *Onset of genetic obesity in the absence of hyperphagia during the first week of life in the Zucker rat (fa/fa)*. *J Lipid Res*, 1979. 20(7): p. 857-64.
263. Greenwood, M.R., *The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper*. *Int J Obes*, 1985. 9 Suppl 1: p. 67-70.

264. Birner-Gruenberger, R. and A. Hermetter, *Activity-based proteomics of lipolytic enzymes*. *Curr Drug Discov Technol*, 2007. 4(1): p. 1-11.
265. Willems, L.I., H.S. Overkleeft and S.I. van Kasteren, *Current developments in activity-based protein profiling*. *Bioconj Chem*, 2014. 25(7): p. 1181-91.
266. Birner-Gruenberger, R., H. Susani-Etzerodt, M. Waldhuber, G. Riesenhuber, H. Schmidinger, G. Rechberger, M. Kollroser, J.G. Strauss, A. Lass, R. Zimmermann, G. Haemmerle, R. Zechner and A. Hermetter, *The lipolytic proteome of mouse adipose tissue*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. 4(11): p. 1710-7.
267. Scholze, H., H. Stutz, F. Paltauf and A. Hermetter, *Fluorescent inhibitors for the qualitative and quantitative analysis of lipolytic enzymes*. *Anal Biochem*, 1999. 276(1): p. 72-80.
268. Ostrowski, K. and E.A. Barnard, *Application of isotopically labelled specific inhibitors as a method in enzyme cytochemistry*. *Exp Cell Res*, 1961. 25: p. 465-8.
269. Morak, M., H. Schmidinger, P. Krempf, G. Rechberger, M. Kollroser, R. Birner-Gruenberger and A. Hermetter, *Differential activity-based gel electrophoresis for comparative analysis of lipolytic and esterolytic activities*. *J Lipid Res*, 2009. 50(7): p. 1281-92.
270. Schicher, M., M. Kollroser and A. Hermetter, *Mapping the lipolytic proteome of adipose tissue using fluorescent suicide inhibitors*. *Methods Mol Biol*, 2009. 579: p. 497-511.
271. Llobera, M., A. Montes and E. Herrera, *Lipoprotein lipase activity in liver of the rat fetus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979. 91(1): p. 272-7.
272. Mariam, J., S. Sivakami, D.C. Kothari and P.M. Dongre, *Bioactivity of albumins bound to silver nanoparticles*. *Protein J*, 2014. 33(3): p. 258-66.
273. Goncharov, N.V., D.A. Belinskaia, A.V. Razygraev and A.I. Ukolov, *[On the Enzymatic Activity of Albumin]*. *Bioorg Khim*, 2015. 41(2): p. 131-44.
274. Kim, S.J., H.W. Rhee, H.J. Park, H.Y. Kim, H.S. Kim and J.I. Hong, *Fluorescent probes designed for detecting human serum albumin on the basis of its pseudo-esterase activity*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013. 23(7): p. 2093-7.
275. Holmes, R.S., J.L. Vandenberg and L.A. Cox, *Genomics and proteomics of vertebrate cholesterol ester lipase (LIPA) and cholesterol 25-hydroxylase (CH25H)*. *3 Biotech*, 2011. 1(2): p. 99-109.
276. Sheriff, S., H. Du and G.A. Grabowski, *Characterization of lysosomal acid lipase by site-directed mutagenesis and heterologous expression*. *J Biol Chem*, 1995. 270(46): p. 27766-72.
277. Bengtsson-Olivecrona, G. and T. Olivecrona, *Binding of active and inactive forms of lipoprotein lipase to heparin. Effects of pH*. *Biochem J*, 1985. 226(2): p. 409-13.
278. Eckel, R.H. and T.J. Yost, *Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women*. *J Clin Invest*, 1987. 80(4): p. 992-7.
279. Tchernof, A., C. Belanger, A.S. Morisset, C. Richard, J. Mailloux, P. Laberge and P. Dupont, *Regional differences in adipose tissue metabolism in women:*

- minor effect of obesity and body fat distribution*. Diabetes, 2006. 55(5): p. 1353-60.
280. Verboven, K., K. Wouters, K. Gaens, D. Hansen, M. Bijnen, S. Wetzels, C.D. Stehouwer, G.H. Goossens, C.G. Schalkwijk, E.E. Blaak and J.W. Jocken, *Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans*. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 4677.
281. Fried, S.K. and J.G. Kral, *Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients*. Int J Obes, 1987. 11(2): p. 129-40.
282. Bergo, M., G. Olivecrona and T. Olivecrona, *Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting*. Biochem J, 1996. 313 (Pt 3): p. 893-8.
283. Donahoo, W.T., D.R. Jensen, T.Y. Shepard and R.H. Eckel, *Seasonal variation in lipoprotein lipase and plasma lipids in physically active, normal weight humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(9): p. 3065-8.
284. Cambras, T., J.A. Baena-Fustegueras, E. Pardina, D. Ricart-Jane, J. Rossell, A. Diez-Noguera and J. Peinado-Onsurbe, *Seasonal variation in plasma lipids and lipases in young healthy humans*. Chronobiol Int, 2017. 34(9): p. 1248-1258.
285. Ferrara, C.M., N.A. Lynch, B.J. Nicklas, A.S. Ryan and D.M. Berman, *Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(9): p. 4166-70.
286. Llado, I., A. Pons and A. Palou, *Effects of fasting on lipoprotein lipase activity in different depots of white and brown adipose tissues in diet-induced overweight rats*. J Nutr Biochem, 1999. 10(10): p. 609-14.
287. de Gasquet, P., E. Planche and A. Boulange, *Lipoprotein lipase at onset of obesity induced in rats by a high-fat diet*. Int J Obes, 1981. 5(6): p. 701-5.
288. Cleary, M. and F. Phillips, *Metabolic comparisons of 10-week-old obese (fafa) Zucker rats with both heterozygous (FAfa) and homozygous (FAFA) lean rats*. Nutrition Research, 1996. 16(8): p. 1341-1352.
289. Phillips, F.C. and M.P. Cleary, *Metabolic measurements among homozygous (fa/fa) obese, heterozygous (Fa/fa) lean and homozygous (Fa/Fa) lean Zucker rat pups at 17 days of age*. J Nutr, 1994. 124(8): p. 1230-7.
290. Lopez-Soriano, E.J., N. Carbo and J.M. Argiles, *Lipid metabolism in the obese Zucker rat. Disposal of an oral [14C]triolein load and lipoprotein lipase activity*. Biochem J, 1991. 274 (Pt 3): p. 651-6.
291. Horwitz, B.A., T. Inokuchi, S.J. Wickler and J.S. Stern, *Lipoprotein lipase activity and cellularity in brown and white adipose tissue in Zucker obese rats*. Metabolism, 1984. 33(4): p. 354-7.
292. Wang, C.S., N. Fukuda and J.A. Ontko, *Studies on the mechanism of hypertriglyceridemia in the genetically obese Zucker rat*. J Lipid Res, 1984. 25(6): p. 571-9.
293. Greenwood, M.R., M.C. Cleary, L. Steingrimsdottir and R. Vasseli, *Adipose tissue metabolism and genetic obesity: the LPL hypothesis*. Obesity Research, 1982.

294. Peinado-Onsurbe, J., M. Blay, J. Julve, J.A. Fernandez-Lopez, X. Remesar and M. Alemany, *Lipoprotein lipase and cholesterol transfer activities of lean and obese Zucker rats*. Horm Metab Res, 2001. 33(8): p. 458-62.
295. Yu, J.E., S.Y. Han, B. Wolfson and Q. Zhou, *The role of endothelial lipase in lipid metabolism, inflammation, and cancer*. Histol Histopathol, 2018. 33(1): p. 1-10.
296. Kimura, N., A. Kikumori, D. Kawase, M. Okano, K. Fukamachi, T. Ishida, K. Nakajima and M. Shiomi, *Species differences in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities: comparative studies of animal models of lifestyle-related diseases*. Exp Anim, 2019.
297. Holland, J.W., H.C. Deeth and P.F. Alewood, *Resolution and characterisation of multiple isoforms of bovine kappa-casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy*. Proteomics, 2006. 6(10): p. 3087-95.
298. Zaidi, N., L. Lupien, N.B. Kuemmerle, W.B. Kinlaw, J.V. Swinnen and K. Smans, *Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids*. Prog Lipid Res, 2013. 52(4): p. 585-9.
299. Kuemmerle, N.B., E. Rysman, P.S. Lombardo, A.J. Flanagan, B.C. Lipe, W.A. Wells, J.R. Pettus, H.M. Froehlich, V.A. Memoli, P.M. Morganelli, J.V. Swinnen, L.A. Timmerman, L. Chaychi, C.J. Fricano, B.L. Eisenberg, W.B. Coleman and W.B. Kinlaw, *Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation*. Mol Cancer Ther, 2011. 10(3): p. 427-36.
300. Calderon, B., L. Huerta, M.E. Casado, J.M. Gonzalez-Casbas, J.I. Botella-Carretero and A. Martin-Hidalgo, *Morbid obesity-related changes in the expression of lipid receptors, transporters, and HSL in human sperm*. J Assist Reprod Genet, 2019.
301. Poschmann, G., K. Seyfarth, D. Besong Agbo, H.W. Klafki, J. Rozman, W. Wurst, J. Wiltfang, H.E. Meyer, M. Klingenspor and K. Stuhler, *High-fat diet induced isoform changes of the Parkinson's disease protein DJ-1*. J Proteome Res, 2014. 13(5): p. 2339-51.
302. Beigneux, A.P., C.M. Allan, N.P. Sandoval, G.W. Cho, P.J. Heizer, R.S. Jung, K.L. Stanhope, P.J. Havel, G. Birrane, M. Meiyappan, J.E.t. Gill, M. Murakami, K. Miyashita, K. Nakajima, M. Ploug, L.G. Fong and S.G. Young, *Lipoprotein lipase is active as a monomer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. 116(13): p. 6319-6328.
303. Henderson, A.D., W. Richmond and R.S. Elkeles, *Hepatic and lipoprotein lipases selectively assayed in postheparin plasma*. Clin Chem, 1993. 39(2): p. 218-23.
304. Murase, T., T. Ebara and M. Okubo, *Lipoprotein lipase activity in heterozygotes for lipoprotein lipase gene mutations reveals a gender bias*. Ann Clin Biochem, 2014. 51(Pt 2): p. 294-7.
305. Emokpae, M.A., O.H. Uwumarongie and H.B. Osadolor, *Sex dimorphism in serum lecithin: cholesterol acyltransferase and lipoprotein lipase activities in adult sickle cell anaemia patients with proteinuria*. Indian J Clin Biochem, 2010. 26(1): p. 57-61.
306. Galan, X., M. Llobera and I. Ramirez, *Lipoprotein lipase and hepatic lipase in Wistar and Sprague-Dawley rat tissues. Differences in the effects of gender and fasting*. Lipids, 1994. 29(5): p. 333-6.

307. Homma, H., T. Sasaki and M. Matsui, *Properties of androsterone-sulfating sulfotransferase in female rat liver*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1991. 39(6): p. 1499-503.
308. Homma, H., I. Nakagome, M. Kamakura and M. Matsui, *Immunochemical characterization of developmental changes in rat hepatic hydroxysteroid sulfotransferase*. Biochim Biophys Acta, 1992. 1121(1-2): p. 69-74.
309. Homma, H., I. Nakagome, M. Kamakura, M. Hirota, M. Takahashi and M. Matsui, *Studies on rat hepatic hydroxysteroid sulfotransferase--immunochemistry, development and pI variants*. Chem Biol Interact, 1994. 92(1-3): p. 15-24.
310. Sackmann-Sala, L., D.E. Berryman, R.D. Munn, E.R. Lubbers and J.J. Kopchick, *Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6J mice*. Obesity (Silver Spring), 2012. 20(1): p. 101-11.
311. Martos-Moreno, G.A., L. Sackmann-Sala, D.E. Berryman, D.W. Blome, J. Argente and J.J. Kopchick, *[Anatomical heterogeneity in the proteome of human subcutaneous adipose tissue]*. An Pediatr (Barc), 2013. 78(3): p. 140-8.
312. Benavides, F.J., J.-L. Guénet, Universidad de Alcalá de Henares and Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio, *Manual de genética de roedores de laboratorio : principios básicos y aplicaciones*. 2003, Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá : Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. 312 p.

