



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
I BIOLOGIA MOLECULAR

**CONTROL TRANSCRIPCIONAL I AL·LOSTÈRIC DEL GEN
CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1B (*CPT1B*)**

Joana Relat Pardo, 2006

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA
BIENNI 2000-2002

CONTROL TRANSCRIPCIONAL I AL·LOSTÈRIC DEL GEN CARNITINA
PALMITOÏLTRANSFERASA 1B (*CPT1B*)

Memòria presentada per Joana Relat Pardo per optar al títol de doctor per la Universitat de
Barcelona

Dr. Diego Haro Bautista

Joana Relat Pardo

Als meus avis, als meus pares,
a la Júlia i al Joan.

Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Has de pregar que el camí sigui llarg,
que siguin moltes les matinades
que entraràs en un port que els teus ulls ignoraven,
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben.
Tingues sempre al cor la idea d'Ítaca.
Has d'arribar-hi, és el teu destí,
però no forcis gens la travessia.
És preferible que duri molts anys,
que siguis vell quan fondegis l'illa,
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,
sense esperar que et doni més riqueses.
Ítaca t'ha donat el bell viatge,
sense ella no hauries sortit.
I si la trobes pobra, no és que Ítaca
t'hagi enganyat. Savi, com bé t'has fet,
sabràs el que volen dir les Ítaques.

(Kavafis - Carles Riba - Lluís Llach)

Aquesta tesi ha estat realitzada gràcies a la concessió d'una beca de Formació de Personal Investigador per la Generalitat de Catalunya.

AGRAÏMENTS

I...quan al final arriba el dia no saps molt bé que ha passat, agafes un full en blanc i comences a escriure sense creure-t'ho massa i quan tot sembla enllestit et poses a pensar en totes aquelles persones que més o menys estones, amb més o menys intensitat i de diferent manera han estat amb tu durant tots aquests anys. A totes elles, GRÀCIES.

En primer lloc, gràcies al Diego i al Pedro, els “grans jefes” d'aquesta tribu de la que he format part. Gràcies per donar-me l'oportunitat de treballar amb vosaltres, per ensenyar-me que fer bona ciència és possible si es tenen bones idees i ganes de treballar. Diego, gràcies per la teva paciència i per saber mantenir la calma quan sembla que res té solució, per creure en nosaltres quan a vegades no donem un duro per la nostra feina i per tenir sempre la porta del despatx oberta. Pedro, gracias por ser así, por hacernos perder los nervios en bien de la ciencia, por presionar cuando nos dormimos en los laureles y sobretodo, por hacernos saber que para cualquier cosa estás ahí.

Gràcies als companys de trifulgues:

Als que em vau iniciar i em vau ensenyar: Cris, pel teu optimisme, per tenir sempre la resposta i un moment per tothom. Àngel, per ser un gran mestre i per voler compartir amb mi part de la teva història científica...llàstima que l'ordre no fos el teu fort. Carine, per transmetre'm els teus coneixements en llevats i cinètiques; per confiar en mi quan jo començava. Àlícia, per ser el meu primer contacte amb el laboratori i una de les “culpables” que avui estigui escrivint aquestes ratlles...devien ser els ratolins amb streptozotocina el que em va decidir. I Mariajo, gracias por tu buen y mal humor, sobretodo matinal, cuando tu poyata parecía una campo de batalla aunque tu intentaras ordenarla antes de irte. Vuelve pronto de tu aventura, aquí necesitamos gente como tu.

A les que encara hi sou o fa poc que vau marxar: gràcies d'entrada a totes per ser unes companyes genials i per estar sempre a punt per donar un cop de mà. Sou un bon motiu per llevar-se cada matí i venir a treballar. Nuria, sobretot a tu, amb qui he compartit molt més que laboratori. Gràcies per tot, per les teves opinions científiques i no científiques, per escoltar-me quan ho he necessitat i per compartir amb mi molts moments diferents. No ho dubtis mai, vals la pena de totes totes. Ah... y gracias Antonio por aguantar nuestras locuras y tu paciencia de santo. Cris Mayo, gràcies per portar una mica de teatre a la meva vida, per tenir un somriure sempre a punt i per compartir amb mi els matins a primera hora quan el laboratori en silenci permetia el treball diligent. No canviïs mai i no et deixis vèncer per les circumstàncies, faràs una gran tesi. Gràcies Xisca, per aquesta visió particular de les coses. El laboratori no seria el mateix sense tu...Qui s'enduria tot el “gafe”? No desesperis, els astres no s'han girat contra teu, estic segura que al final triomfaràs, tens el que cal tenir per fer ciència,... només et falta una mica de paciència. I Laura, gràcies per les teves aportacions científiques, la música de cantautor i converses interessants. Gràcies Mar, per la teva època de treball pràctic i beca de col·laboració on, al principi amb la Miriam, em vau fer recuperar la il·lusió del que comença i ajudar a tirar endavant un munt de feina. Molta sort en la nova etapa que comences i que espero compartir amb tu força temps. Gràcies també a la Raquel i a la Rosa pel temps que vam compartir i per la feina feta que ara tant enyorem. Gràcies al Xavier pel seu positivisme contagiós i per la seva disponibilitat total en qualsevol moment.

I finalment, als que comenceu o començareu: Anna, Mariona i Jordi, moltíssima sort. Ha estat un plaer tenir-vos pel laboratori i si us quedeu amb nosaltres espero que puguem seguir treballant plegats però si les circumstàncies us porten a un altra poiata no tingueu por, us en sortireu. Mariona, moltes gràcies per les estones compartides, les mitos obtingudes i els assajos vortejats.

Gràcies també a la Carme, al Joan i al seu grup: la Marta, la Julieta, la Mabel, el Salva, la Laura i la Cris. Gràcies pels vostres suggeriments en els seminaris, per fer-nos esforçar en explicar el que fem cada setmana i per permetre'ns tenir una petita noció del gran món de les cinases. I gràcies, en general, a tota la gent del Departament, per facilitar la feina de tots i permetre que el primer pis de l'annex no s'ensorri.

Però, a part de la gent de la feina, altres persones han estat al meu costat durant aquests anys, aguantant els meus mals de cap. Gràcies a la Txell, a la Mireia, a l'Eli, a l'Eloi, al David, al Roger, al Toni, a l'Adam i al Xavi. Gràcies a tots per entendre aquesta passió meva que és la ciència. Txell, gràcies per estar sempre a prop i tenir sempre la idea que podria seguir en això d'una manera o altra. Mireia i Eli, gràcies a les dues per tants anys i tants moments i perquè sé que, faci el temps que faci, si agafo el telèfon us trobaré. Ah... les cèl·lules no les podia matar, al final els hi agafes "carinyo" i tot.. Eloi, gràcies per la teva amistat sense límits, la ciència es va perdre un bon element quan vas decidir no fer la tesi. David, gràcies per els converses inacabables que hem mantingut i per estar sempre disposat a xerrar. I, Adam, de moment no ens farem milionaris però seguiré intentant-ho.

I per últim, però no menys importants, són els agraïments a la meva família i al Joan. No sé on seria avui sense vosaltres, no m'ho puc imaginar. Diuen que la família no es tria, quina sort que vaig tenir. Gràcies a tots per haver-me fet com soc. Gràcies avi Àngel i àvia Lola per crear i tirar endavant la gran família que tinc, gràcies avi Paco i àvia Carme per fer-me sentir la persona més estimada d'aquest món. Gràcies oncles, ties, cosins i nouvinguts per omplir la meva vida; som una família a la italiana de la que val la pena formar-ne part. Moltíssimes gràcies pares. Gràcies per estar sempre aquí, passi el que passi, decideixi el que decideixi sé que puc comptar amb vosaltres. Han estat temps durs, sobretot els últims i és fruit de tots que jo avui presenti aquest treball. És difícil dir-vos tot el que vull dir-vos en dues ratlles o sigui que ho faré fàcil, us estimo moltíssim. Gràcies Júlia, per ser com ets, per fer-me veure la vida des d'una altra perspectiva, per la teva ingenuïtat, la teva il·lusió, la teva perseverança i la teva valentia. T'admiro per tot el que estàs fent i aconseguint i sé que algun dia trobaràs allò que busques.

I per últim gràcies a tu, Joan. Gràcies per moltes coses. Gràcies per introduir-me en aquest món i convèncer-me de fer la tesi i de rebot també ho agraeixo a la meva nova família, la científica, el Joan, la Maria Carme, l'Elena, el Francesc i el Roger, que em van mostrar l'altra cara de la carrera, la de la Facultat. Gràcies Joan per ser la meva realitat, per deixar-me fer estant sempre a prop, per allargar-me una mà quan la necessito i obligar-me a continuar quan sembla que tot està perdut. Gràcies per fer-me mirar sempre endavant.

Joana

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS

L'obesitat i la diabetis tipus 2 s'han convertit, en els últims anys, en dues de les grans epidèmies dels països desenvolupats. Es tracta de dues patologies que impliquen un gran nombre d'alteracions fisiopatològiques conegudes en conjunt com a Síndrome X i on s'inclouen: resistència a insulina dels teixits perifèrics, hiperinsulinèmia, intolerància a la glucosa, hiperlipidèmia, hipertensió i arteriosclerosi. Degut a la seva importància mèdico-sanitària i socio-econòmica, l'estudi de la seva etiopatogènia i l'elucidació dels mecanismes moleculars que les provoquen han esdevingut temes de gran interès científic.

Avui en dia, encara no es coneix la seqüència temporal d'aparició de la simptomatologia ni com es relacionen entre elles aquestes alteracions. Tampoc sabem perquè l'augment de massa del teixit adipós, que defineix l'obesitat, pot donar lloc a una resistència sistèmica a la insulina o com la resistència a la insulina i la diabetis tipus 2 poden afavorir el desenvolupament de l'obesitat. La paradoxa que, tant l'excés de teixit adipós com la seva absència poden causar resistència a insulina indica el grau de complexitat d'aquestes relacions. La definició del teixit adipós com un teixit hormonalment actiu, amb múltiples funcions endocrines, indica un paper important d'aquest en el desenvolupament d'aquestes patologies (revisat per Kahn et al., 2000).

Quina és la relació entre els metabolismes lipídic i glucídic? L'homeòstasi dels lípids i de la glucosa estan íntimament relacionades (McGarry et al., 1998; Roden et al., 2004). La insulina promou la captació de glucosa, alhora que regula el catabolisme dels triglicèrids per inhibició de la lipasa sensible a hormona. Alteracions lipídiques tenen fortes conseqüències en la regulació de la glucosa.

L'any 1963, Randle et al. van plantejar una hipòtesi per explicar aquesta interrelació metabòlica. Segons la seva idea, l'augment d'àcids grassos lliures, producte de la degradació de triglicèrids per manca d'insulina, o de la seva acció, produirien inhibició del metabolisme de la glucosa i increment de la β -oxidació. Existiria, segons ell, una competició de substrat on, davant una elevada concentració d'àcids grassos, el múscul preferiria oxidar aquests disminuint la captació de glucosa i la glucòlisi i incrementant la β -oxidació.

Recentment, aquesta idea ha estat desplaçada per la hipòtesi de la lipotoxicitat (Shulman, 2000). Per aquests autors, l'acumulació excessiva de triglicèrids i acils-CoA en el múscul i en el fetge pot donar lloc a resistència a insulina per fosforilació incorrecta dels substrats del receptor de l'hormona (IRS) i la no-activació de la seva cascada i del transport de glucosa. Els àcids grassos i molècules derivades acumulades (acil-CoA, diacilglicerol, ceramides,...) activarien una cascada de Ser/Thr cinases que fosforilarien IRS-1 i IRS-2, deixant-los inaccessibles a la fosforilació en Tyr i reduint la capacitat del receptor de la insulina per activar la PI3K i la via de translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica.

L'augment de triglicèrids i acils-CoA en el múscul pot donar-se en casos d'obesitat o de secreció excessiva d'insulina per mal funcionament del sistema leptina-Sistema nerviós central-pàncrees (McGarry, 1995). En aquest segon cas, una hipersecreció d'insulina provocaria: (I) una producció excessiva de VLDLs per estimulació de la biosíntesi hepàtica d'àcids grassos i reesterificació dels circulants, que amb el temps provocarien un augment de la massa adiposa i obesitat i (II) una acumulació de triglicèrids i acils-CoA en el múscul i en el pàncrees, on afectarien la captació de glucosa i la funcionalitat de les cèl·lules β pancreàtiques respectivament.

En base a tot això, i sota la hipòtesi que el control dels nivells d'àcids grassos en etapes precoces de l'obesitat i de la diabetis tipus 2 permetria reduir la hiperinsulinèmia i la resistència a insulina associades i evitar la lipotoxicitat provocada per l'acumulació de grasses en múscul, pàncrees i teixit adipós, ens vam plantejar estudiar els mecanismes de regulació del gen carnitina palmitoiltransferasa 1. Aquest enzim constitueix el principal punt de control de l'entrada d'àcids grassos de cadena llarga (LCFA) al mitocondri per la seva posterior beta-oxidació i per tant és clau en el manteniment dels nivells d'àcids grassos circulants.

Els objectius d'aquesta tesi han estat:

- 1.- Estudiar els mecanismes de control transcripcional del gen *CPT1B* humà.
- 2.- Estudiar la relació estructura/funció de l'enzim CPT1 de porc.
- 3.- Estudiar l'efecte de C75 i altres compostos de síntesi sobre el sistema CPT.

ÍNDEX

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS	3
1.- OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS	4
2.- REGULACIÓ DE L'OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS	7
2.1.- TRANSPORT DELS ÀCIDS GRASSOS	7
2.2.- ACTIVACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS	9
2.3.- ENTRADA DELS ÀCIDS GRASSOS A LA MÀTRIU MITOCONDRIAL I β -OXIDACIÓ	10
SISTEMA CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA	11
1.- CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1 (CPT1)	14
2.- CARNITINA ACILCARNITINA TRANLOCASA (CACT)	14
3.- CARNITINA PALMITOÏL TRANSFERASA 2 (CPT2)	15
SISTEMA CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA	17
1.- GENERALITATS	18
2.- ORGANITZACIÓ GÈNICA	19
3.- PATRÓ D'EXPRESSIÓ	20
4.- ACTIVITAT ENZIMÀTICA I CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES	21
4.1.- SISTEMES D'EXPRESSIÓ	21
4.2.- ACTIVITAT ENZIMÀTICA I CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES	22
4.2.1.- CPT1 de porc	23
5.- RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ	24
5.1.- TOPOLOGIA DE LA MEMBRANA	25
5.2.- DETERMINACIÓ DELS DOMINIS CATALÍTIC I REGULADOR	26
5.2.1.- DOMINI CATALÍTIC	27
5.2.2.- DOMINI REGULADOR	28
6.- REGULACIÓ DELS SISTEMA CPT1	31
6.1.- METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS EN EL PORC	32
6.2.- REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL	33

6.2.1.- CPT1A	33
6.2.2.- CPT1B	34
6.3.- REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA	37
6.3.1.- REGULACIÓ DELS NIVELLS DE MALONIL-CoA	37
6.3.2.- CANVIS EN LA SENSIBILITAT A MALONIL-CoA	38
FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN LA REGULACIÓ GÈNICA	41
1.- RECEPTORS NUCLEARS	41
1.1.- RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS DE PEROXISOMES (PPAR)	44
1.1.1.- PPAR ALFA	47
1.1.2.- PPAR DELTA	50
1.1.3.- PPAR GAMMA	52
2.- PGC-1 (PPAR γ COACTIVADOR-1)	55
3.- FACTORS MIOGÈNICS	57
3.1.-MRFS O FAMÍLIA MyoD	58
3.2.- FAMÍLIA MEF-2	60
4.- FAMÍLIA Sp	62
4.1.- Sp1-Sp3	63
C75	67
MATERIALS I MÈTODES	71
MATERIALS	73
1.- SOQUES BACTERIANES	73
2.- SOQUES DE LLEVAT	73
3.- LÍNIES CEL·LULARS	74
4.- VECTORS DE CLONATGE	74
4.1.- VECTORS DE CLONATGE	74
4.2.- VECTORS D'EXPRESSIÓ	75
4.3.- VECTORS REPORTERS	75
5.- OLIGONUCLEÒTIDS	76

6.- ANTICOSSOS	76
7.- MATERIAL RADIOACTIU	76
8.- REACTIUS	77
8.1.- REACTIUS UTILITZATS EN CULTIUS CEL·LULARS	77
8.2.-C75	77
8.3.- ALTRES REACTIUS	78

MÈTODES 78

1.- OBTENCIÓ DE DNA	78
1.1.- CULTIUS BACTERIANS	78
1.2.- PREPARACIÓ DE DNA PLASMÍDIC	78
1.3 PRECIPITACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE DNA	79
1.3.1.- PRECIPITACIÓ DEL DNA	79
1.3.2.- EXTRACCIÓ FENOL-CLOROFORM	79
1.3.3.- QUANTIFICACIÓ DEL DNA	79
1.4.- RESSOLUCIÓ, IDENTIFICACIÓ, I PURIFICACIÓ DE FRAGMENTNS	79
DE DNA	
1.4.1.- SEPARACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA EN GELS	79
D'AGAROSA/TAE/BROMUR D'ETIDI	
1.4.2.- PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA EN GELS D'AGAROSA	80
2.- MODIFICACIÓ ENZIMÀTICA DEL DNA	80
2.1.- DIGESTIÓ DE DNA	80
2.2.- DESFOSFORILACIÓ DEL DNA	81
2.3.- HIBRIDACIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS I FOSFORILACIÓ DEL DNA:	81
2.4.- GENERACIÓ D'EXTREMS ROMS	82
2.5.- L·LIGACIÓ DE DNA	82
2.6.- MARCATGE RADIOACTIU DE MOLÈCULES DE DNA	83
2.6.1.- MARCATGE DE FRAGMENTS 5'PROTUBERANTS	83
2.6.2.- MARCATGE PER FOSFORILACIÓ DE L'EXTREM 5'	83
3.- CONSTRUCCIÓ DE MOLÈCULES DE DNA RECOMBINANT	84
3.1.- SUBCLONATGE DE FRAGMENTS DE DNA	84
3.2.- TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES E.COLI	84
3.2.1.- PREPARACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS: MÈTODE DEL $CaCl_2$	84

3.2.2.- TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS: Xoc Tèrmic	85
3.3.- SELECCIÓ DE COLÒNIES TRANSFORMADES	85
4.- REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	85
4.1.- AMPLIFICACIÓ DE DNA	85
4.2.- PCR-prep	87
4.3.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA	87
4.3.1.- Introducció de dianes de restricció	87
4.3.2.- Introducció de mutacions puntuals amb dos oligonucleòtids	87
4.3.3.- Introducció de mutacions puntuals per <i>Overlap extension</i> PCR	87
4.3.4.- <i>QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	88
5.- SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA DE DNA	88
6.- OBTENCIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES	88
6.1.- OBTENCIÓ D'EXTRACTES NUCLEARS A PARTIR DE CÈL·LULES EN CULTIU	88
6.2.- QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES: MÈTODE DE BRADFORD	89
6.3.- SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA - SDS.	89
6.4.- ANÀLISI DE PROTEÏNES PER IMMUNOTRANSFERÈNCIA: WESTERN- BLOT	90
6.5.- TRANSCRIPCIÓ I TRADUCCIÓ IN VITRO	91
6.6.- EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ	91
7.- ASSAIGS DE RETARDACIÓ DE LA MOBILITAT ELECTROFORÈTICA (EMSA)	92
7.1.- MARCATGE DEL FRAGMENT DE DNA	93
7.2.- PREPARACIÓ DEL GEL DE POLIACRILAMIDA	93
7.3.- REACCIÓ D'UNIÓ DE LA PROTEÏNA AL DNA MARCAT	93
7.4.- ELECTROFORESI DE LES MOSTRES	94
7.5.- EXPERIMENTS DE SUPER-RETARDACIÓ	94
8.- ASSAIGS DE GST PULL-DOWN	94
8.1.- REACCIÓ D'UNIÓ	94
8.2.- RECUPERACIÓ DELS COMPLEXES PROTEÏNA GST-PROTEÏNA I DETECCIÓ DE LA INTERACCIÓ	95
8.3.- FLUOROGRAFIA	95
9.- CULTIUS CEL·LULARS I TRANSFECCIONS	95
9.1.- CONDICIONS DE CULTIU DE LES LÍNIES CEL·LULARS	96

9.2.- DIFERENCIACIÓ DE CÈL·LULES C2C12	97
9.3.- TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA	97
9.3.1.- MÈTODE DEL FOSFAT CÀLCIC	97
9.3.1.1.- Preparació dels precipitats DNA-fosfat càlcic	97
9.3.1.2.- Transfecció de les cèl·lules	98
9.3.2.- TRANSFECCIÓ AMB REACTIUS LIPÍDICS COMERCIALS	98
9.3.2.1.- Preparació dels complexos DNA--FuGENE 6	98
9.3.2.2.- Diferenciació de les cèl·lules transfectades	99
9.3.2.3.- Transfecció de cèl·lules diferenciades o en medi de diferenciació	99
9.4.- OBTENCIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS I ASSAIG D'ACTIVITAT LUCIFERASA	99
10.- CULTIU DE LLEVATS I TRANSFORMACIÓ DE <i>Pichia pastoris</i>	100
10.1.- PREPARACIÓ DE CÈL·LULES ELECTROCOMPETENTS	100
10.2.- PREPARACIÓ DEL DNA	100
10.3.- ELECTROPORACIÓ	100
10.4.- SELECCIÓ DE TRANSFORMANTS	101
11.- OBTENCIÓ DE MITOCONDRIIS DE <i>Pichia pastoris</i>	101
12.- ASSAIG D'ACTIVITAT CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA	102
12.1.- IC ₅₀ PER MALONIL-CoA	102
12.2.- K _m I V _{max} PER PALMITOÏL-CoA	102
12.3.- K _m I V _{max} PER CARNITINA	103
13.- MICROINJECCIÓ D'OÒCITS DE <i>Xenopus laevis</i>	103
13.1.- OBTENCIÓ DE DNA DE CADENA SIMPLE. M13K07 HELPER PHAGE	103
13.2.- MICROINJECCIÓ D'OÒCITS DE <i>Xenopus laevis</i>	103
RESULTATS	105
REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN <i>CPT1B</i>	107
1.- INTERACCIÓ FUNCIONAL ENTRE PPAR α I MEF-2C EN L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE LA CPT1B HUMANA (ARTICLE-1-)	109
2.- EFECTE DE PPAR δ I Sp1 SOBRE EL PROMOTOR DE LA CPT1B	119
2.1.- PPAR α I PPAR δ ACTIVEN LA TRANSCRIPCIÓ DE CPT1B EN CÈL·LULES DIFERENCIADES I NO DIFERENCIADES.	119

2.2.- CONTROL DE L'EXPRESSION GÈNICA DE <i>CPT1B</i> PER Sp1	121
2.2.1.- L'ELEMENT G/C ÉS IMPORTANT PER L'ACTIVITAT BASAL DE <i>CPT1B</i> I PER L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN PER PPAR α , PERÒ NO PER PPAR δ .	122
2.2.2- PPAR α i PPAR δ INTERACCIONEN AMB AFINITATS DIFERENTS AMB Sp1	123
2.2.2.1.- PPAR α INTERACCIONA AMB MÉS AFINITAT QUE PPAR δ AMB EL TnT DE Sp1	123
2.2.2.2.- EXTRACTES NUCLEARS DE C2C12 MOSTREN UNA DIFERENT INTERACCIÓ DE PPAR α i PPAR δ AMB Sp1 SEGONS L'ESTAT DE DIFERENCIACIÓ	124
3.- CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE <i>CPT1B</i> EN OÒCITS DE <i>Xenopus laevis</i>	127
REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA CPT	129
1.- CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1A DE PORC. ESTUDIS AMB CONSTRUCCIONS QUIMÈRIQUES. (ARTICLE-2-)	131
2.- CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1B DE PORC AMB UNA BAIXA K _m PER LA CARNITINA I UNA BAIXA SENSIBILITAT A LA INHIBICIÓ PER MALONIL-CoA TÉ CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES SIMILARS A LA CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1A DE RATA. (ARTICLE-3-)	139
3.-C75 ACTIVA ELS COMPONENTS SENSIBLES I INSENSIBLES A MALONIL-CoA DEL SISTEMA CPT. (ARTICLE-4-)	147
DISCUSSIÓ	155
CONTROL TRANSCRIPCIONAL DEL GEN <i>Cpt1B</i>	157
1.- INTERACCIÓ FUNCIONAL ENTRE PPAR α I MEF-2C EN L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN <i>Cpt1B</i> HUMÀ	157
2.- L'ELEMENT G/C DEL PROMOTOR DE LA <i>CPT1B</i> ÉS IMPORTANT EN L'ACTIVITAT BASAL DEL GEN I EN LA RESPOSTA A PPAR α PERÒ NO EN LA DE PPAR δ	160
2.1.- EFECTE DE PPAR δ SOBRE EL PRMOTOR DE LA <i>CPT1B</i>	160
2.2.- L'ELEMENT G/C DEL PROMOTOR DE LA <i>CPT1B</i> . EFECTE SOBRE L'ACTIVITAT BASAL DEL PROMOTOR I SOBRE LA RESPOSTA A PPAR α I	161

PPAR δ	
2.3.- INTERACCIÓ DIFERENCIAL ENTRE Sp1 I PPAR α I PPAR δ	162
3.- MICROINJECCIÓ D'OÒCITS DE <i>Xenopus laevis</i>	163
REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA CPT	164
1.- CPT1A DE PORC. RELACIONS ESTRUCTURA-FUNCIÓ	164
1.1.- LA REGIÓ C-TERMINAL DE LA CPT1A FUNCIONA COM UN ÚNIC DOMINI	165
1.2.- EL DOMINI C-TERMINAL DETERMINA LA SENSIBILITAT A MALONIL-CoA A TRAVÉS D'INTERACCIONS AMB L'EXTREM AMINO	167
2.- CPT1B DE PORC. UN ISOTIP B AMB CARACTERÍSTIQUES DE CPT1A	168
3.- C75 I EL SISTEMA CPT	169
CONCLUSIONS	173
CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE Cpt1B	175
CONTROL DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE CPT	175
BIBLIOGRAFIA	177
APÈNDIXS	219
OLIGONUCLEÒTIDS	221
1.-OLIGONUCLEÒTIDS DE VECTORS	221
2.-OLIGONUCLEÒTIDS DEL PROMOTOR HUMÀ DE LA CPT1B	221
CONSTRUCCIONS	221
1.-PLASMIDIS REPORTERS LUCIFERASA	221
2.-PLASMIDIS D'EXPRESSIÓ	222
3.-CONSTRUCCIONS DE PROTEÏNES CPT1	223

ABREVIATURES

Aa	Aminoàcids
Ab	Anticòs
ACBP	<i>Acyl-CoA binding protein</i>
ACC	Acil-CoA carboxilasa
ACS	Acil-CoA sintetasa
ACO	Acetil-CoA oxidasa
AF1	Regió d'activació no dependent de lligant
AF2	Regió d'activació dependent de lligant
AgRP	<i>Agouti-related protein</i>
AINE	Antiinflamatoris no esteroïdals
AMPc	Adenosina monofosfat cíclic
AMPK	Cinasa dependent de AMP
AP	Fosfatasa alcalina
APS	persulfat amònic
AOX1	Alcohol oxidasa 1
atm	Atmosferes
ATP	Adenosina trifosfat
bHLH	Domini bàsic hèlix-volta-hèlix
bp	Parells de bases
BSA	Albúmina bovina sèrica
Btd	Domini <i>Buttonhead</i>
CACT	Carnitina-acilcarnitina translocasa
CaMK	Cinasa dependent de calci-calmodulina
CARM-1	<i>Co-activator-associated arginine methyltransferase-1</i>
CART	<i>Cocaine and amphetamine-related transcript</i>
CAT	Cloramfenicol acetil transferasa
CBP	Proteïna d'unió a CREB
cDNA	DNA còpia
CMV	Citomegalovirus
CIAP	Fosfatasa alcalina de vedella
CoA	Coenzim A
COT	Carnitina octanoïl transferasa
COUP-TF	Factor de transcripció del promotor de l'ovoalbúmina de pollastre (<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor</i>)
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
CPT1A	Isotip hepàtic de CPTI (també anomenat L-CPTI)
CPT1B	Isotip muscular de CPTI (també anomenat M-CPTI)
CRAT	Carnitina acetiltransferasa
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
CTE	Extensió carboxi-terminal
DAG	Diacilglicerol
dATP	Desoxiadenosina trifosfat
DBD	Domini d'unió a DNA
dCTP	Desoxicitosina trifosfat
DEPH	Di(2-etilhexil)ftalat
dGTP	Desoxiguanosina trifosfat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid

DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNA_{ds}	DNA de doble cadena
DNA_{ss}	DNA de cadena senzilla
DNSp1	Dominant negatiu de Sp1
dNTP	Desoxiribonucleòtid trifosfat
DR	Repetició directa
DR1	Repetició directa separada per 1 nucleòtid
DRIP	<i>Vitamin D Receptor-Interacting Protein</i>
dTTP	Desoxitiamina trifosfat
DTT	Ditiotreitol
D.O_λ	Densitat òptica, a la longitud d'ona subindexada (λ)
EDTA	Etilendiaminotetracetat
Egr-1	<i>Early growth response gene-1</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility assay</i>
ER	Repetició evertida
ERR	Receptor relacionat amb estrògens
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
FAS	Sintasa d'àcids grassos (<i>Fatty acid synthase</i>)
FBS	Sèrum boví fetal
FA	Àcids grassos
FADH₂	Flavina adenina dinucleòtid reduït
FAS	Sintasa d'àcids grassos
FFA	Àcids grassos lliures
FOXO	<i>Forkhead Box</i>
GAP	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GRIP-1	<i>Glucocorticoid receptor interacting protein-1</i>
GST	Glutatió-S-Transferasa
HAT	Histona acetil transferasa
HBS	Tampó de Hepes (<i>Hepes-Buffered Saline</i>)
HDAC	Histona desacetilasa
HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
HEPES	Àcid N-(2-hidroxietil)-pirenacina-N'-2-etanosulfònic
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
HMCPT1	MCPT1 humana
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzim A
HNF-4	Factor nuclear hepatocitari-4
HRE	Element de resposta a hormona
HS	Horse Serum
HSL	Lipasa sensible a hormona
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosid
IR	Repetició invertida
IRS	Substrat del receptor d'insulina
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
LB	Medi de cultiu Luria-Bertrani
LBD	Domini d'unió a lligant
LCAD	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena llarga
LCFA	Àcids grassos de cadena llarga
LCFA-CoA	Acils CoA d'àcids grassos de cadena llarga
LCPT1	Carnitina palmitoiltransferasa-1, isotip hepàtic

LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
LPL	Lipoproteïna lipasa
LTB4	Leucotriè B4
Luc	Gen de la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
MADS	domini DM1-Agamous-Deficiens-SRF
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCD	Malonil-CoA decarboxilasa
MCAD	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena mitjana
MCFA	Àcids grassos de cadena mitjana
MCTP1	Carnitina palmitoiltransferasa 1, isotip muscular
MEF	<i>Myocyte Enhancer Factor</i>
MEM	medi mínim essencial (<i>Minimum Essential Medium</i>)
MOPS	Àcid 3-(N-morfolí) propanosulfònic
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MyoD	<i>Myoblast Differentiation</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid reduït
NcoR	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
NPY	Neuropèptid Y
NR	Receptor nuclear
NRF-1	Factor respiratori nuclear-1(<i>Nuclear Respiratory Factor-1</i>)
NRRE	Element de resposta a receptors nuclears
o/n	Durant la nit
ORF	Marc obert de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PBP	<i>PPAR binding protein</i>
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDK4	Piruvat cinasa deshidrogenasa-4
PEPCK	Fosfoenol piruvat carboxicinas
PGC-1	<i>PPARγ coactivator factor-1</i>
PKA	Proteïna cinasa dependent d'AMPc
PKC	Proteïna cinasa C
PLCPT1	LCPT1 de porc
PMCPT1	MCPT1 de porc
PMRT	<i>Protein-arginine N-methyltransferase</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorur
PNK	Polinucleòtid cinasa
POCA	2-[5-(4-clorofenil)pentil]-oxirà-2-carboxilat
POMC	Propiomelanocortina
PPAR	Receptor activat per proliferadors de peroxisomes (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)
PPO	2,5-difeniloxazol
PPRE	Element de resposta a receptors activats per proliferadors de peroxisomes
PVDF	Difluorit polivinilidina
RACE	Amplificació ràpida d'extrem de cDNA
RAR	Receptor de l'àcid retinoic
RIP140	<i>Receptor interacting protein-140</i>
RLCPT1	LCPT1 de rata
RNA	Àcid ribonucleic

RNAse	Ribonucleasa
rpm	Revolucions per minut
RSV	Virus del Sarcoma de Rous. (<i>Rous Sarcoma Virus</i>)
RXR	Receptor de l'àcid 9- <i>cis</i> -retinoic (<i>Retinoid X Receptor</i>)
SCAD	Deshidrogenasa d'acil-CoA de cadena curta
SCFA	Àcids grassos de cadena curta
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS
SHARP1	<i>SMRT/HDAC1-Associated repressor protein</i>
SMRT	<i>Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors</i>
SNC	Sistema nerviós central
SNS	Sistema nerviós simpàtic
SRC1	<i>Steroid receptor coactivator-1</i>
SREBP-1C	<i>Sterol-regulatory element-binding protein-1c</i>
SSC	salí-citrat sòdic
SV40	Virus 40 de simi (<i>Simian Virus 40</i>)
T3	3,3',5-Triiodetironina (hormona tiroïdal)
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
TCA	Àcids tricarbòxílics
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TG	Triglicèrids
TG-CoA	Àcid 2-tetradecilglicídic coenzim A
TK	Timidina cinasa
T_m	<i>Melting temperature</i>
TM	Transmembrana
TNF-α	Factor de necrosi tumoral- α
TnT	Transcripció i traducció <i>in vitro</i>
TOFA	Àcid tetradeciloxifuroic
TR	Receptor de l'hormona tiroïdal
TRAP220	<i>Thyroid hormone receptor associated protein-220</i>
TRE	Element de resposta a TR
Tris	Tris-hidroximetil-aminometà
TZD	Tiazolidinediona
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
USF	<i>Upstream stimulatory factor</i>
UTR	Regió transcrita i no traduïda (<i>Untranslated Region</i>)
VDR	Receptor de la vitamina D
VLCAD	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena molt llarga
VLDL	Lipoproteïnes de molt baixa densitat
wt	<i>Wild type</i> ; salvatge
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
YND	Yeast-Non-essential aminoacids-Dextrose
YPD	Yeast-Peptone-Dextrose

INTRODUCCIÓ

METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS

Els lípids, principalment en forma de triglicèrids, constitueixen una part important de la dieta de la majoria d'animals i juguen un paper fonamental en l'aportació energètica. L'estudi del seu metabolisme i dels mecanismes que el controlen és, doncs important en el coneixement de la regulació homeostàtica.

El metabolisme lipídic s'inicia amb la hidròlisi dels TG per lipases específiques en el tub digestiu, on s'alliberen una molècula de glicerol i tres d'àcids grassos (FA). Aquests àcids grassos alliberats són, un cop dins dels enteròcits, reesterificats i empaquetats formant quilomicrons, que arriben als diferents teixits a través dels sistemes limfàtic i circulatori. A nivell tissular, i per acció de la lipoproteïna lipasa (LPL) associada a cèl·lules endotelials dels capil·lars, els àcids grassos són novament alliberats permetent la seva captació per part dels teixits. En el teixit adipós els àcids grassos lliures (FFA) seran reesterificats i emmagatzemats com a TG i en teixits com l'hepàtic o el muscular els FFA seran utilitzats com a substrat energètic.

En situacions on l'aportació exògena de TG es troba disminuïda (dejú) o en què els requeriments energètics estan augmentats (exercici físic), el teixit adipós pot alliberar àcids grassos al torrent circulatori per acció de la lipasa sensible a hormona (HSL *hormone-sensitive lipase*). En aquests casos, la lipòlisi es troba regulada per diferents molècules senyal com poden ser les catecolamines, el glucagó o la insulina, que activen o inhibeixen l'activitat de la HSL per fosforilació/desfosforilació (revisat per Holm et al., 2000, Kraemer et al., 2002), o pels propis acils-CoA, que poden activar la HSL a nivell de teixit adipós (Hu et al., 2005). Aquests àcids grassos alliberats circulen, a través del torrent sanguini, units a albúmina i en molta menor proporció lliures (FFA).

Una altra font d'àcids grassos al torrent sanguini és la síntesi de *novo* o lipogènesi. Aquest procés es dona en teixits com el fetge o el teixit adipós blanc on, per acció de l'acil-CoA carboxilasa (ACC), un acetil-CoA, resultat de l'oxidació de carbohidrats, es converteix en malonil-CoA, primer intermediari de la síntesi d'àcids grassos de cadena llarga (LCFA) com a substrat de la sintasa d'àcids grassos (FAS: *fatty-acid synthase*).

1.- OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS

Els FFA representen el major substrat metabòlic del cos humà, tenen una densitat energètica superior a la glucosa i s'acumulen en grans quantitats en forma de TG en el teixit adipós. La seva presència en el torrent sanguini pot ser fruit d'una aportació exògena, a través de la dieta, o resultat de reaccions endògenes, com la hidròlisi de TG emmagatzemats, l'alliberació de lípids de membrana o la biosíntesi *de novo* o lipogènesi.

A nivell intracel·lular, els FFA poden participar en diferents processos. Són substrat de la biosíntesi de fosfolípids, d'eicosanoids i d'altres molècules lipídiques senyal i lligants de factors de transcripció que controlen l'expressió gènica però, probablement, el seu principal destí és ser β -oxidats per produir energia.

La β -oxidació mitocondrial és el principal procés d'oxidació dels àcids grassos donant lloc a acetil-CoA i energia en forma de NADH i FADH₂ (Eaton et al., 1996). Aquest procés, seguit de l'entrada al cicle dels àcids tricarbòxilics (TCA) de l'acetil-CoA produït i de la fosforilació oxidativa, per generar ATP, representa la principal font d'energia de teixits no cetogènics com els músculs esquelètic i cardíac (Neely JR et al., 1972; Felig et al., 1975).

En teixits cetogènics com el fetge, l'acetil-CoA de la β -oxidació pot derivar-se cap a la formació de cossos cetònics (acetoacetat i β -hidroxibutirat), que seran utilitzats per teixits extra-hepàtics, principalment pel cervell, com a combustible en situacions de manca de glucosa (Figura 1). A partir de l'acetil-CoA de la β -oxidació també es poden sintetitzar hormones esteroïdals, sals biliars o vitamina D.

El procés de la β -oxidació (Figura 2) s'inicia amb l'entrada dels àcids grassos de cadena llarga (LCFA) a l'interior de la cèl·lula. Aquesta entrada és fruit del balanç entre la difusió passiva, gràcies a la gran hidrofobicitat dels LCFA, i el transport actiu mitjançant proteïnes de membrana. Un cop en el citoplasma, l'oxidació dels LCFA depèn de la formació de tioèsters amb coenzim A (CoA). Aquest procés, anomenat "activació de l'àcid gras", és dut a terme per l'enzim acil-CoA sintetasa (ACS) que genera els acils-CoA corresponents. Segons el teixit i l'estat metabòlic de l'animal, aquests acils-CoA poden derivar-se cap a l'oxidació, la cetogènesi, l'esterificació de colesterol i esfingolípids o la síntesi de TG, fosfolípids, ceramides, diacilglicerol i àcid araquidònic (McGarry et al., 1980; Zammit, 1984; Prentki et al., 1996; Faergman et al., 1997).

INTRODUCCIÓ

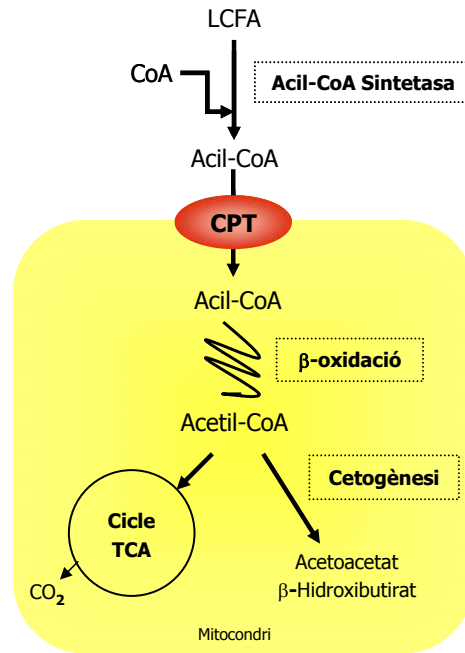


Figura 1.-Metabolisme mitocondrial dels àcids grassos. Els àcids grassos són oxidats a nivell mitocondrial per produir acetil-CoA. Aquest acetil-CoA s'incorpora, a continuació, al cicle dels àcids tricarbòxics (TCA) i a la fosforilació oxidativa, generant energia en forma d'ATP en teixits com el múscul. En teixits com el fetge, l'acetil-CoA de la β-oxidació pot utilitzar-se en la cetogènesi.

LCFA: àcids grassos de cadena llarga, cicle TCA: cicle dels àcids tricarbòxics (cicle de Krebs).

A continuació, els acils-CoA, si han de ser β-oxidats, han d'arribar a la matriu mitocondrial. En aquest punt, els acils-CoA d'àcids grassos de cadena llarga (LCFA-CoA) requereixen d'un sistema llançadora anomenat Sistema Carnitina Palmitoiltransferasa (CPT) que els porta des de la membrana mitocondrial externa fins a la matriu mitocondrial per un mecanisme dependent de carnitina.

Dins de la matriu mitocondrial, els àcids grassos inicien el procés de β-oxidació. Aquest procés consisteix en l'escissió progressiva de dos àtoms de carboni des de l'extrem carboxil de l'acil-CoA i rep aquest nom perquè és el carboni C3=β de l'àcid gras el que s'oxida, originant un cetoàcid previ al trencament de l'enllaç C2-C3 de l'acil-CoA.

La β-oxidació com a tal consta de quatre reaccions que es van repetint i que a cada cicle donen lloc a un acil-CoA dos carbonis més curt que l'anterior i a una molècula d'acetil-CoA que entra al cicle de Krebs per continuar la seva oxidació fins a CO₂. La primera de les reaccions està catalitzada per l'acil-CoA deshidrogenasa de la qual se'n coneixen quatre segons la longitud de la cadena carbonada de l'àcid gras que reconeix: de cadena molt llarga (VLCAD), de cadena llarga (LCAD), de cadena mitjana (MCAD) o de cadena curta (SCAD). Les tres reaccions restants

INTRODUCCIÓ

estan catalitzades per l'enoïl-CoA hidratasa, la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa i l'acetil-CoA aciltransferasa (β -cetotilasa).

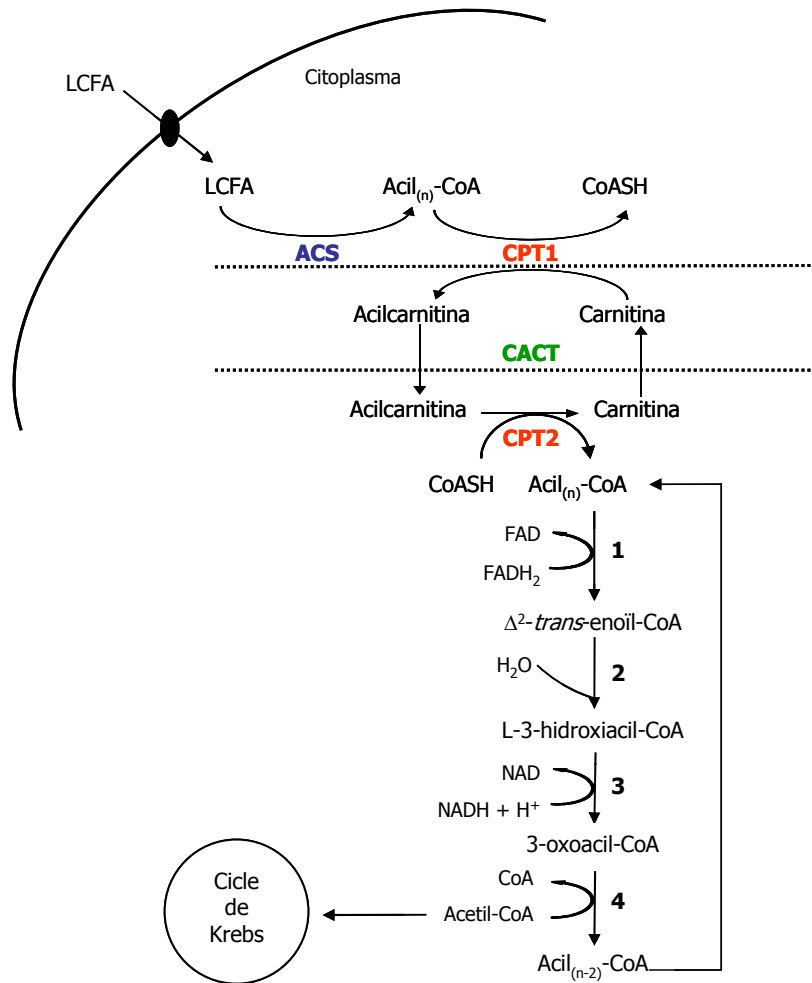


Figura 2.- β -oxidació mitocondrial: des de l'entrada dels FA a la cèl·lula fins l'entrada de l'acetil-CoA al cicle de Krebs. La β -oxidació mitocondrial s'inicia amb l'entrada dels àcids grassos de cadena llarga (LCFA) per difusió passiva o transport actiu. Un cop dins, els LCFA són activats per l'ACS i translocats a la matriu mitocondrial pel sistema Carnitina palmitoiltransferasa. Aquest sistema inclou els enzims: CPT1 (carnitina palmitoiltransferasa 1), CACT (carnitina acilcarnitina translocasa) i CPT2 (carnitina palmitoiltransferasa 2). El procés de β -oxidació consta de quatre reaccions enzimàtiques catalitzades per: 1.- Acil-CoA deshidrogenasa, 2.- Enoïl-CoA hidratasa, 3.- 3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa i 4.- Acetil-CoA aciltransferasa (β -cetotilasa). Aquestes reaccions es repeteixen cíclicament, escurçant cada vegada en dos carbonis l'acil-CoA i proporcionant una molècula d'acetil-CoA al cicle de Krebs.

En el cas dels àcids grassos amb nombre senar de carbonis l'espiral s'atura amb la formació de propionil-CoA. Es donen, a partir d'aquest moment, reaccions de carboxilació (propionil-CoA carboxilasa), epimerització (metilmalonil-CoA racemasa) i isomerització (metilmalonil-CoA mutasa), arribant a succinil-CoA que s'incorpora al cicle de Krebs. Els àcids grassos insaturats s'incorporen a la β -oxidació com a intermediaris Δ^2 -trans-enoïl-CoA o L-3- hidroxiacil-CoA, després d'una sèrie de reaccions enzimàtiques (enoïl-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA epimerasa i aconitat- Δ -isomerasa).

2.- REGULACIÓ DE L'OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS

La β -oxidació és un procés finament regulat. La seqüència d'esdeveniments, des de què els àcids grassos entren a la cèl·lula i a la matriu mitocondrial fins que són oxidats a CO_2 i H_2O presenta dos possibles punts de control: (I) l'entrada al citosol i el transport intracel·lular i (II) l'activitat del sistema carnitina palmitoiltransferasa i dels enzims propis de la β -oxidació (Rasmussen et al., 1999).

2.1.- TRANSPORT DELS ÀCIDS GRASSOS

La captació i oxidació d'àcids grassos mostra el seu primer punt crític en la disponibilitat de substrat que pot variar, segons l'estat metabòlic de l'individu. S'ha descrit que, molècules com l'adrenalina o el glucagó, augmentades en estats d'estrès (dejuni, exercici físic, trauma), incrementen els nivells de FFA circulants estimulants la HSL del teixit adipós i activant la lipòlisi. En contra, la insulina, per exemple, és capaç d'inhibir la HSL desencadenant l'efecte contrari. L'aportació exògena de TG també pot modificar el perfil lipídic i els nivells de β -oxidació d'un individu, com s'observa en rates nounades que, alimentades amb una dieta rica en grasses i pobra en carbohidrats (llet materna), desenvolupen ràpidament l'oxidació d'àcids grassos i la producció de cossos cetònics (Girard et al., 1992).

En condicions on la disponibilitat de substrat no és limitant, l'entrada dels LCFA a la cèl·lula és el primer punt de control de la β -oxidació. Existeixen dos mecanismes pels quals aquests poden travessar la membrana cel·lular: la difusió passiva per un sistema de *flip-flop* (revisat per Schaffer et al., 2002) i el transport actiu associat a proteïnes. La quantitat de LCFA entrant és fruit del balanç entre els dos processos, que coexisteixen i contribueixen de manera diferent, segons el tipus cel·lular i la relació LCFA:albúmina en el torrent sanguini.

En condicions fisiològiques, on la relació LCFA:albúmina en sang és baixa (Richieri et al., 1995), l'entrada es dona, majoritàriament, a través de proteïnes transportadores. Diferents evidències suporten aquesta idea: la inhibició de la captació de LCFA per tractaments amb proteases (Stremmel et al., 1985), l'increment en l'expressió d'algunes d'aquestes proteïnes en condicions associades a un increment en l'ús d'àcids grassos (dejú, exercici) (Turcotte et al.,

1992; Turcotte et al., 1997) o l'existència d'inhibidors específics que bloquegen la captació de LCFA (Bonen et al., 1998).

S'han descrit i clonat diverses proteïnes transportadores d'àcids grassos: FABP_{pm} (*plasma membrane fatty-acid binding protein*) (Potter et al., 1987; Stremmel et al., 1985; Stremmel, 1988), FAT/CD36 (*fatty-acid translocase*) (Abumrad et al., 1993; Harmon et al., 1993; Sfeir et al., 1997), FATP (*fatty-acid transport protein*) (Schaffer et al., 1994) i ACS1 (*long-chain acyl-CoA synthetase*) (revisades per Stahl et al., 2001; Schaffer, 2002).

La FABP_{pm} és una proteïna localitzada a la membrana plasmàtica que augmenta la seva expressió en condicions associades a un increment en l'ús d'àcids grassos com el dejú o l'exercici (Turcotte et al., 1992; Turcotte et al., 1997). El seu paper com a proteïna transportadora s'ha confirmat generant anticossos dirigits contra ella, que s'uneixen a la membrana plasmàtica impedit l'import de LCFA (Stremmel et al., 1986a/b; Turcotte et al., 2000).

La FAT/CD36 és una proteïna de membrana que pertany a la família de receptors *scavenger*. Uneix de manera reversible substrats molt diferents i s'ha suggerit que podria actuar com a proteïna concentradora, acumulant àcids grassos a la superfície cel·lular quan els nivells d'aquests són baixos. Sobre-expressada en fibroblasts incrementa la captació i utilització de LCFA, a través d'un mecanisme saturable (Ibrahimi et al., 1996) i la seva pèrdua de funció ha estat implicada en diferents estats fisiopatològics com la resistència a insulina o la hipertròfia cardíaca. Per altra banda, en presència d'insulina (Luiken et al., 2002) i durant el procés contràctil (Bonen et al., 2000) es dona un increment de la translocació a la membrana plasmàtica de FAT/CD36 i del transport d'àcids grassos a nivell muscular. Cal ressaltar que, durant la contracció muscular, la β -oxidació es troba augmentada i els nivells de glucosa i insulina també (Ibrahimi et al., 1999). En humans, l'entrenament provoca un augment muscular de FAT/CD36 associat a un increment en l'oxidació de palmitat (Holloway et al., 2006) i, ratolins deficients en FAT/CD36 presenten una disminució important de l'entrada de LCFA a cèl·lules musculars i adipòcits.

La FATP1 és una proteïna integral de membrana present en teixits que requereixen entrades importants de LCFA a les cèl·lules. Pertany a una família de proteïnes presents en diversos organismes (Hirsch et al., 1998) que, expressades en cultius cel·lulars, incrementen l'import de LCFA. El gen *Fatp1* respon a lligands de PPAR i s'ha localitzat un PPRE en el promotor murí

(Frohnert et al., 1999), suggerint un control positiu de l'expressió pels propis àcids grassos. La seva translocació a la membrana és induïda per insulina (Stahl et al., 2002) i en humans, s'han descrit varies isoformes amb patrons d'expressió tissular diferents.

La ACS1 catalitza l'esterificació de LCFAs (C14-C18) amb CoA (Watkins et al., 1997). En aquest cas, s'ha suggerit que la formació d'acils-CoA evitaria la sortida dels LCFA de la cèl·lula i alhora, disminuiria la concentració intracel·lular de FFA, creant un gradient extra-intracel·lular que afavoriria l'entrada d'aquests. Aquest paper de l'ACS1 que associa l'esterificació amb el transport corrobora els resultats de sobre-expressió en fibroblasts. En ells, l'ACS1 té un efecte sinèrgic amb la FATP en la captació de LCFA, co-localitzant ambdues proteïnes a la membrana plasmàtica (Gargiulo et al., 1999). Recentment, s'ha vist que la pròpia FATP1 té activitat ACS (Hall et al., 2003).

A l'interior cel·lular, els àcids grassos són distribuïts, principalment, per les proteïnes FABP (*fatty-acid binding protein*) (revisat per Zimmerman et al., 2002) i ACBP (*Acyl-CoA binding protein*) (revisat per Kragelund et al., 1999; Knudsen et al., 2000) tot i que, també hi poden intervenir altres proteïnes citosòliques com la proteïna transportadora d'esterols-2 (SCP-2: *sterol carrier protein-2*). Aquestes proteïnes poden induir la β -oxidació conduint els LCFA fins la membrana mitocondrial externa (Veerkamp et al., 1993) i s'ha descrit, recentment, la interacció ACBP-acil-CoA-CPT1, que facilitaria la transferència d'aquests acils-CoA a la CPT1 (Abo-Hashema et al., 2001). La distribució subcel·lular d'aquests transportadors és regulada per insulina (Chabowski et al., 2005).

2.2.- ACTIVACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS

En el citoplasma cel·lular, l'ús d'àcids grassos de cadena llarga (LCFA) requereix d'un primer pas d'activació. En una reacció catalitzada per l'acil-CoA sintetasa (ACS), els LCFA són esterificats amb CoA per generar els acils-CoA corresponents (LCFA-CoA) que constitueixen el primer substrat de la β -oxidació (Watkins et al., 1997). S'han descrit diferents ACS associades a mitocondris de mamífers, segons la longitud de la cadena carbonada de l'àcid gras que reconeixen. Així, tenim les ACS d'àcids grassos de cadena curta i de cadena mitjana, localitzades a la matriu mitocondrial i l'ACS d'àcids grassos de cadena llarga que sembla ser una

proteïna transmembrana associada a la membrana mitocondrial externa amb, com a mínim, el domini d'unió a CoA citosòlic (Eaton et al., 1996).

2.3.- ENTRADA DELS ÀCIDS GRASSOS A LA MATRIU MITOCONDRIAL I β -OXIDACIÓ.

La β -oxidació mitocondrial és un procés que té lloc a la matriu mitocondrial de manera que els àcids grassos han de travessar la membrana abans de ser oxidats. Els àcids grassos de cadena mitja (MCFA) i curta (SCFA) són capaços, per les seves característiques, de travessar la membrana mitocondrial per difusió passiva, sent activats directament a la matriu abans de la seva oxidació. Els àcids grassos de cadena llarga (LCFA) necessiten, un cop activats i convertits en acils-CoA, d'un sistema de transport que els permeti travessar la membrana mitocondrial interna que els és impermeable. El sistema transportador és un complex enzimàtic anomenat carnitina palmitoiltransferasa (CPT).

A l'interior de la matriu mitocondrial, els acils-CoA inicien les reaccions pròpies de la β -oxidació catalitzades pels enzims: acil-CoA deshidrogenasa de cadena molt llarga (VLCAD), de cadena llarga (LCAD), de cadena mitja (MCAD) o de cadena curta (SCAD), enoïl-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa i acetil-CoA aciltransferasa (β -cetotilasa). Com s'ha explicat anteriorment, aquestes reaccions es repeteixen de manera cíclica produint cada vegada acetil-CoA i un acil-CoA dos àtoms de carboni més curt que l'anterior. La primera i la tercera reaccions de la via produeixen electrons que seran utilitzats, posteriorment, per produir ATP en la fosforilació oxidativa.

Encara avui, poc es coneix sobre els mecanismes de control dels enzims implicats en la via de la β -oxidació. Se sap que l'augment mitocondrial de la relació NADH/NAD⁺ en cultius d'hepatòcits redueix la β -oxidació, que l'acetoacetil-CoA, *in vitro*, actua a nivell hepàtic com a inhibidor de l'acil-CoA deshidrogenasa i que l'acetil-CoA inhibeix l'acetil-CoA aciltransferasa a nivell cardíac. Finalment, també s'ha observat que el 3-hidroxiacil-CoA inhibeix l'enoïl-CoA hidratasa i que, hormones com la vasopressina i l'angiotensina o molècules α_1 -agonistes incrementen l'oxidació dels àcids grassos en fetges de rata (revisat per Guzmán et al., 1993).

SISTEMA CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA

El sistema carnitina palmitoïltransferasa (CPT) permet l'entrada dels àcids grassos de cadena llarga (LCFA) a l'interior del mitocondri per la seva posterior β -oxidació (revisat per McGarry et al, 1997; Ramsay et al., 2001; Bonnefont et al., 2004). Aquest transport, des del citoplasma fins la matriu mitocondrial, implica tres enzims: la carnitina palmitoïltransferasa 1 (CPT1) que catalitza la transesterificació dels acils-CoA amb carnitina, la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT) que introdueix les acilcarnitines a l'espai intermembrana i la carnitina palmitoïltransferasa 2 (CPT2) que catalitza la reacció inversa a la transesterificació alliberant l'acil-CoA a la matriu mitocondrial (Figura 3) (McGarry et al., 1997). Diferents treballs suggereixen que CPT1, CPT2 i, en menor proporció, CACT es troben físicament molt pròximes, en regions on les membranes mitocondrials externa i interna entrarien en contacte (Fraser et al., 1998; Hoppel et al., 1998; Fraser et al., 1999).

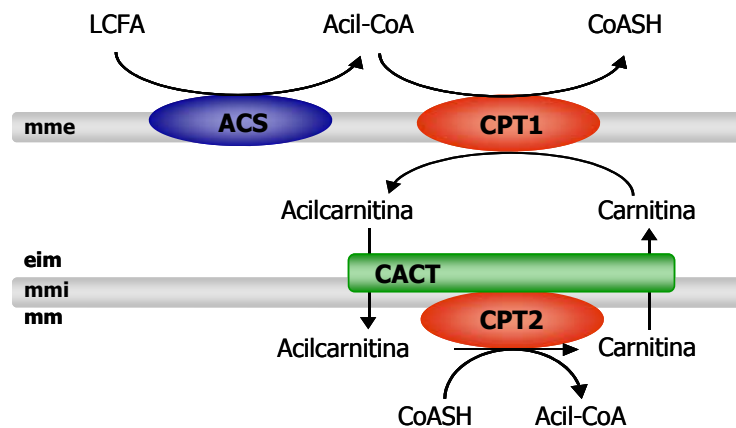


Figura 3.- Sistema carnitina palmitoïltransferasa. (McGarry et al., 1997). Els LCFA són activats per acció de l'ACS. Els acils-CoA formats són transesterificats amb carnitina per acció de la CPT1 alliberant al citosol Coenzim A. En aquest punt, la CACT transloca les acilcarnitines a l'espai intermembrana intercambiant-les per carnitina. Finalment, la CPT2 catalitza, des de la membrana mitocondrial interna, la reacció d'alliberament dels acils-CoA a la matriu mitocondrial, trencant l'enllaç tioèster entre l'acil-CoA i la carnitina.

MME: membrana mitocondrial externa; EIM: espai intermembrana; mmi: membrana mitocondrial interna; MM: matriu mitocondrial, LCFA: àcids grassos de cadena llarga.

Recentment, s'ha inclòs en el complex enzimàtic una quarta proteïna, un transportador de membrana dedicat a mantenir els nivells intracel·lulars de carnitina (Van der Leij et al., 2000). També s'ha proposat l'existència d'una porina (Kerner et al., 2000) que permeti el pas d'acilcarnitines des de la cara externa de la membrana mitocondrial externa, on es troba el centre actiu de la CPT1 (Zammit, 1999), fins a la membrana mitocondrial interna, on es localitza la CACT.

INTRODUCCIÓ

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, el sistema CPT és un punt de control important de la β -oxidació d'àcids grassos de cadena llarga i, existeixen evidències clares que atorguen a l'enzim CPT1 aquest paper regulador. Estudis amb mitocondris intactes de múscul humà correlacionen l'activitat CPT1 amb el número de mitocondris i amb el consum d'oxigen (Berthon et al., 1998). I, assaigs indirectes *in vivo* indiquen que el quocient entre les taxes d'oxidació d'àcids grassos de cadena llarga i de les d'àcids grassos de cadena mitja, que no necessiten del sistema CPT per entrar a la matriu mitocondrial, és menor en situacions on l'activitat CPT1 està disminuïda (infusió de glucosa) (Sidossis et al., 1996). La CPT1 és un enzim clau per mantenir l'homeòstasi energètica (Eaton et al., 2001), però alhora s'ha vist que pot jugar un paper important en la secreció d'insulina per part de les cèl·lules β pancreàtiques (Chen et al., 1994), permetent pensar en inhibidors de la CPT1 com a potencials antidiabètics (Foley et al., 1992; Giannessi et al., 2001).

Per quin/s mecanisme/s la CPT1 esdevé punt de control de la β -oxidació? A través del seu inhibidor fisiològic malonil-CoA (Bieber, 1988; McGarry et al., 1989) i per la seva capacitat d'alterar les seves propietats cinètiques sota situacions fisiològiques diferents.

El malonil-CoA és el producte de la reacció catalitzada per l'acetil-CoA carboxilasa (ACC) i és el primer substrat de la lipogènesi, fet que el converteix en interruptor principal de l'oxidació i síntesi d'àcids grassos (Figura 4) (Leonhardt et al., 2004). Durant el dejú, el flux glucolític es troba disminuït i per tant també els nivells de citrat. Degut a això, els nivells de malonil-CoA cauen, no hi ha inhibició de l'enzim CPT1 i s'activen la β -oxidació i, en teixits com el fetge, la cetogènesi. En la situació contrària, quan els nivells d'insulina són elevats i la relació insulina/glucagó és alta, la glucòlisi genera citrat en el cicle de Krebs. Per acció de la citrat liasa, el citrat pot donar lloc a acetil-CoA que, juntament amb l'activació de l'ACC per part de la insulina, incrementa els nivells de malonil-CoA, inhibint la CPT1 i la β -oxidació. En aquest darrer cas, els LCFA seran directament esterificats i emmagatzemats en forma de TG.

Pel que fa al segon mecanisme de control de l'activitat CPT1, sembla que alteracions en la composició lipídica de la membrana mitocondrial externa, en regions que interaccionen directament amb punts hidrofòbics de l'estructura primària de la proteïna, provoquen canvis en les característiques cinètiques de l'enzim (Zammit, 1998).

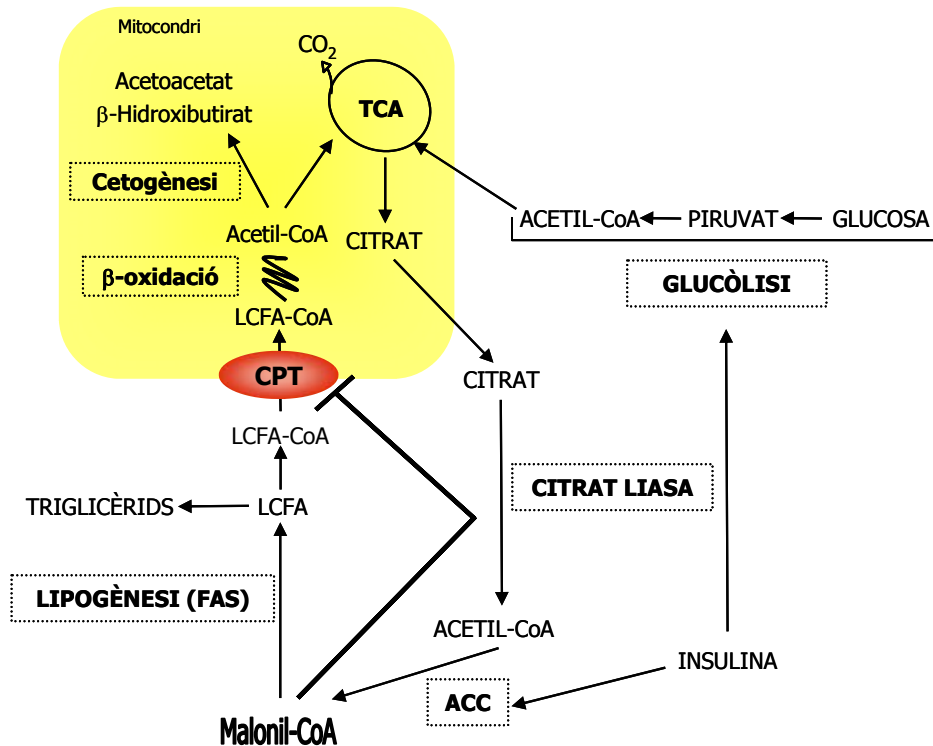


Figura 4.- Regulació del metabolisme lipídic i glucídic per malonil-CoA. El malonil-CoA és el principal regulador de l'oxidació i síntesi d'àcids grassos. Els seus nivells varien segons l'estat metabòlic de l'individu, afectant l'activitat CPT1 i mantenint l'homeòstasi energètica de diferents teixits.
 LCFA: àcids grassos de cadena llarga; LCFA-CoA: acils-CoA de cadena llarga; CPT: carnitina palmitoiltransferasa; ACC: acetil-CoA carboxilasa; FAS: Sintasa d'àcids grassos.

A nivell proteic, el complex enzimàtic inclou dues proteïnes CPT que, exceptuant l'extrem N-terminal, presenten un 50% d'identitat en les seves seqüències aminoàcides i que difereixen en el seu pes molecular per 170aa que impliquen dues regions hidrofòbiques transmembrana de l'enzim CPT1 (Kolodziej et al., 1993; Cohen et al., 1998). Estructuralment, la presència d'aquestes dues regions hidrofòbiques converteixen la CPT1 en una proteïna integral de membrana (Woeltje et al., 1990b; Cohen et al., 1998), que requereix de tractaments solubilitzants agressius per alliberar-se i que esdevé inactiva fora de l'entorn membranós (Woeltje et al., 1987; Woeltje et al., 1990a/b). I, a la CPT2 en una proteïna dèbilment associada a membrana i fàcil d'aïllar mantenint la seva activitat enzimàtica (Woeltje et al., 1990a/b).

Per altra banda, cal destacar que la CPT2 no és inhibible per malonil-CoA i que presenta la mateixa estructura en tots els teixits (Demaugre et al., 1990), a diferència de la CPT1 que és diana de malonil-CoA i presenta, fins avui descrits, tres isotips: CPT1A, CPT1B i CPT1C (Britton et al., 1995; Yamazaki et al., 1996; Price et al., 2002) amb patró d'expressió tissular, sensibilitat a malonil-CoA i característiques cinètiques diferents.

1.- CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1 (CPT1)

La carnitina palmitoïltransferasa 1 catalitza la reacció de transesterificació dels acils-CoA de cadena llarga (LCFA-CoA) amb carnitina, generant acilcarnitines de cadena llarga (Figura 5).

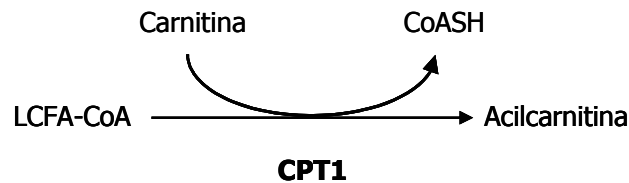


Figura 5.- Reacció catalitzada per la carnitina palmitoïltransferasa 1. LCFA-CoA: acil-CoA de cadena llarga
CoA-SH: coenzim A

Es tracta d'una proteïna integral de membrana situada a la membrana mitocondrial externa amb els extrems amino i carboxil exposats al citosol i dos dominis transmembrana en α -hèlix. La seva capacitat catalítica es perd en aïllar-la de l'entorn membranós i les seves característiques cinètiques es veuen afectades pel tractament amb detergents. És un enzim inhibible reversiblement per malonil-CoA i irreversible per molècules estructuralment relacionades com l'etomoxir-CoA o el tetradecilglicidil-CoA (TG-CoA). Actualment, hi ha descrits tres isotips de CPT1: CPT1A, CPT1B i CPT1C que s'expliquen amb detall en el capítol següent.

2.- CARNITINA-ACILCARNITINA TRANSLOCASA (CACT)

La carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT) és una proteïna integral de membrana que, situada a la membrana mitocondrial interna, catalitza la translocació de les acilcarnitines a la matriu mitocondrial intercanviant-les per carnitina (Figura 3).

El gen humà va ser clonat i mapejat en el locus cromosòmic 3p21.31 (Indiveri et al., 1990; Indiveri et al., 1997; Huinzing et al., 1997; Viggiano et al., 1997; Iacobazzi et al., 1998), caracteritzant una proteïna de 33.13KDa (301 aminoàcids). Estructuralment, presenta tres repeticions en tàndem plegades en dues α -hèlixs transmembrana i unides per regions hidròfiles a ambdós costats de la bicapa lipídica (Indiveri et al., 1997). Els extrems amino i carboxil es troben exposats a l'espai intermembrana i la proteïna madura presenta canvis a l'extrem N-terminal que suggereixen modificacions post-traduccionals (Indiveri et al., 1997).

Els estudis cinètics atorguen a la CACT una àmplia varietat de substrats que van des de la carnitina lliure fins a les acilcarnitines de cadena llarga, presentant major afinitat quan més llarga és la cadena carbonada de l'acil. Aquesta inespecificitat de substrat fa pensar en altres funcions de la translocasa com a transportadora de grups acil, capacitat que seria important per evitar l'acumulació d'acilcarnitines i acils-CoA de cadena llarga en el mitocondri que podrien afectar la seva integritat per les seves propietats detergents (Kerner et al., 2000).

Darrerament, alguns autors han publicat estudis sobre la regulació gènica de la CACT. S'ha descrit que el factor de transcripció PPAR γ indueix l'expressió de l'enzim en múscul esquelètic (Lapsys et al., 2000) i que la resistència a insulina la disminueix (Peluso et al., 2002), fet que podria portar a una acumulació de TG, DAG i acils-CoA. A nivell hepàtic, el dejú augmenta l'expressió de CACT (Sekoguchi et al., 2003).

3.- CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 2 (CPT2)

La carnitina palmitoïltransferasa 2 (CPT2) catalitza la reesterificació dels LCFA amb CoA, alliberant la carnitina a l'espai intermembrana i els acils-CoA a la matriu mitocondrial (Figura 6). Es tracta d'una proteïna sintetitzada amb un pèptid senyal de direccionament mitocondrial. Aquest pèptid és escindit un cop dins del mitocondri, donant lloc a una proteïna madura de 71KDa dèbilment associada a la membrana mitocondrial interna (McGarry et al., 1992). (Brown et al., 1991).

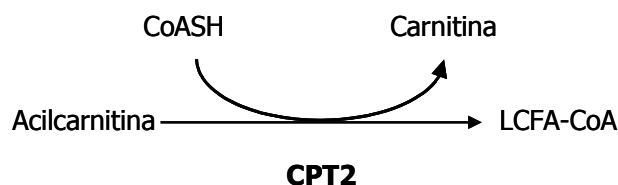


Figura 6.- Reacció catalitzada per la Carnitina palmitoïltransferasa 2. LCFA-CoA: acil-CoA de cadena llarga
CoASH:

Els cDNAs de rata i humà van ser clonats, respectivament, per Woeltje et al. (1990a) i Finocchiaro et al. (1991), predient proteïnes de 658 aminoàcids de seqüència molt similar (82% d'identitat). El cDNA humà presenta un marc obert de lectura de 1974bp (Finocchiaro et al., 1991) amb un alt grau d'homologia amb el de rata (85%). S'ha descrit un sol locus cromosòmic de CPT2 que, en humans, es localitza en el 1p32 (Gellera et al., 1994). Es tracta d'un gen

d'aproximadament 20Kb compost per 5 exons separats per 4 introns (Gelb et al., 1993; Verderio et al., 1995). A nivell de mRNA, el transcrit de rata ($\approx 2.5\text{Kb}$) és més curt que l'humà ($\approx 3\text{Kb}$).

CPT2 presenta una expressió ubiqua tant en rates com en humans (Demaugre et al., 1990; Woeltje et al., 1990a/b). A diferència de les CPT1, els nivells de mRNA, proteïna i activitat CPT2 són alts en fetge de rates fetals i es mantenen durant l'alletament, no veient-se afectats ni pel naixement ni per la dieta rica en grasses de les rates nounades (Thumelin et al., 1994; Asins et al., 1995). En el desenvolupament cardíac de les rates, els nivells de CPT2 sí que es veuen lleugerament incrementats durant les primeres setmanes de vida (Brown et al., 1995). En adults, els nivells de CPT2 són induïts per una dieta rica en grasses i pel tractament amb proliferadors de peroxisomes (DEPH o clofibrats), però no per àcids grassos de cadena llarga (Asins et al., 1994; Chatelain et al., 1996). En els teixits hepàtic i renal, el dejú provoca un augment de l'activitat CPT2 en rates i ratolins adults (Thumelin et al., 1994; Hashimoto et al., 2000).

A nivell transcripcional s'ha descrit la regulació de *CPTT2* per PPAR α . S'ha caracteritzat un element funcional de resposta a PPAR (PPRE) en el promotor del gen humà (Barrero et al., 2003). Aquests resultats confirmen l'associació entre PPAR α i l'efecte dels clofibrats i el dejú suggerida per diferents estudis on, ratolins que no expressen PPAR α (*Knock-out*) perden aquests efectes (Hashimoto et al., 2000).

Els estudis cinètics indiquen que, en el seu entorn fisiològic, l'enzim CPT2 no és inhibible per malonil-CoA (Murthy et al., 1987). La seva expressió en sistemes heteròlegs: *Saccharomyces cerevisiae* (Brown et al., 1994a), *Pichia pastoris* (De Vries et al., 1997) i baculovirus (Johnson et al., 1995) dona lloc a un enzim amb una petita sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA (De Vries et al., 1997) probablement, per interacció amb el centre actiu de l'enzim i competició amb el substrat palmitoil-CoA. Rufer et al. (2006) acaben de publicar el cristall de l'enzim CPT2 donant idea dels residus implicats en la unió i especificitat de substrat i identificant una seqüència que mitjança la localització a membrana. Les mutacions mapejades en deficiències de CPT2 impliquen punts del reconeixement de substrat i integritat estructural de la proteïna.

Igual que en el cas de la CACT, el fet que l'enzim CPT2 no sigui limitant en l'oxidació d'àcids grassos de cadena llarga pot ser important en el manteniment de la integritat mitocondrial, evitant l'acumulació d'àcils-CoA de cadena llarga i acilcarnitines (Kerner et al., 2000).

CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1

La carnitina palmitoïltransferasa 1 és l'enzim que catalitza la formació d'acilcarnitines a partir d'acils-CoA i carnitina. Es tracta d'una proteïna integrada a la membrana mitocondrial externa a través de dos dominis hidrofòbics transmembrana que deixen els extrems amino i carboxil cap al citosol. La proteïna consisteix en un únic polipèptid que conté el lloc d'unió a inhibidors i el domini catalític. Actualment, hi ha descrits tres isotips de CPT1: CPT1A, CPT1B i CPT1C amb cDNA, seqüències aminoàcides i mides molt similars, però amb diferents patrons d'expressió i característiques cinètiques (Taula 1).

	CPT1A	CPT1B	CPT1C
Sinònims	CPT1 α , L-CPT I	CPT1 β , M-CPT I	
Locus cromosòmic humà	11q13.1-2	22q13.31	19q13.33
Genbank acc. num.	AC019166	AB003286	AF357970
Massa	≈88 kDa	≈88 kDa	≈88 kDa
IC ₅₀ malonil-CoA	≈2.5 mM	≈0.03 mM	-
K _m carnitina	≈30 mM	≈500 mM	-
Expressió tissular			
Fetge	++++	-	-
Múscul	(+)	++++	-
Cor	+	+++	-
Ronyó	++++	(+)	-
Pulmó	++++	(+)	-
Melsa	++++	-	-
Intestí	++++	-	-
Pàncrees	++++	-	-
Tx adipós marró	(+)	++++	-
Tx adipós blanc	+	+++	-
Ovari	++++	(+)	+
Testicle	(+)	++++	+
Cervell	+++	-	++++
Deficiència humana	sí	no	no

Taula 1.- Característiques de les CPT1 descrites (Modificat de McGarry et al., 1997)

1.- GENERALITATS

El primer cDNA aïllat va ser el de l'isotip CPT1A de rata a partir d'una llibreria de cDNA hepàtic (Esser et al., 1993a) predient una proteïna de 773 aminoàcids (88.15 KDa). El cDNA humà va ser aïllat poc després (Britton et al., 1995), predient una proteïna d'igual pes, amb una seqüència molt similar a la de rata (82%) i un 88% d'homologia a nivell aminoàcid.

La presència d'un segon enzim CPT1 es va suggerir a partir d'assaigs amb mitocondris hepàtics i musculars de rata, on s'observaven diferències de fins a 100 vegades en la sensibilitat a malonil-CoA entre els mitocondris (McGarry et al., 1983). I es va confirmar en estudis amb inhibidors com l'etomoxir-CoA o el TG-CoA marcats radioactivament, on la unió irreversible sobre mitocondris hepàtics i musculars donava lloc a dues proteïnes CPT1 que migraven de manera diferent en un gel SDS-PAGE (Woeltje et al., 1990b; Weis et al., 1994a/b).

Finalment, el cDNA de l'isotip B va ser aïllat a partir d'una llibreria de cDNA de teixit adipós marró i d'una altra de múscul cardíac de rata (Yamazaki et al., 1995; Esser et al., 1996), predient una proteïna de 772 aminoàcids (88.23 KDa). El cDNA humà va ser clonat poc després, a partir d'una llibreria de cDNA de múscul cardíac (Yamazaki et al., 1996; Britton et al., 1997). Els cDNAs de rata i humà presenten un alt grau d'identitat (85%) i les seqüències aminoàcides comparteixen un 86% d'homologia.

Tot i la similitud entre els isotips A i B (67% en la seqüència aminoàcida) (McGarry et al., 1997) cal destacar la diferent mida dels seus transcrits, $\approx 3\text{Kb}$ per la CPT1B i $\approx 4.7\text{Kb}$ per la CPT1A, i la diferent mobilitat electroforètica en un gel SDS-PAGE, on la proteïna CPT1B migra segons un pes aparent de 82 KDa (Pes real 88.23KDa CPT1B i 88.15 KDa CPT1A). Es desconeix el perquè d'aquesta migració anòmala de CPT1B, però sí que se sap que no es deu a modificacions post-traduccionals sinó a característiques intrínseques de la seqüència proteica (Esser et al., 1996).

En el teixit cardíac i muscular de rata s'han aïllat dues isoformes més de CPT1B fruit d'un tall (*splicing*) alternatiu del mRNA (Yu et al., 1998a) que provoca deleccions internes en la regió N-terminal de la proteïna. Inicialment, es va considerar la possibilitat que aquestes proteïnes poguessin presentar un diferent ensamblatge i/o topologia de membrana i unes diferents

característiques cinètiques que afectessin l'activitat CPT1 en el desenvolupament i en la resposta a hormones o a estats metabòlics i que expliquessin la fracció de β -oxidació no inhibible per malonil-CoA (Kim et al., 2002). Finalment, s'ha demostrat que es tracta de proteïnes catalíticament inactives (Van der Leij et al., 2002).

En el cervell, el malonil-CoA ha estat implicat en el control de la sensació de gana (Loftus et al., 2000). El tractament amb inhibidors de la FAS, C75 i cerulenina, resulta en una inhibició de la sensació de gana que s'ha descrit com un efecte anorèctic a nivell de la producció hipotalàmica de neuropèptid Y (NPY). La implicació d'un augment intraneural de malonil-CoA en aquestes respostes es confirma amb tractaments simultanis amb àcid tetradeciloxifuroic (TOFA), inhibidor de l'ACC, que reverteix l'efecte de C75 (Loftus et al., 2000). Alhora, la disrupció del gen *Acc2*, isoforma de la proteïna ACC, dóna lloc a ratolins hiperfàgics (Abu-Elheiga et al., 2001), confirmant que la disminució de la capacitat de sintetitzar malonil-CoA a nivell cerebral augmenta la gana, malgrat que els ratolins són més primers per l'augment de β -oxidació en altres teixits.

Tots aquests resultats apunten a l'existència d'una quantitat de malonil-CoA destinada al control de la gana. Però, per quin mecanisme?. Inhibint la CPT1A present a nivell cerebral?. Generant un augment d'acils-CoA de cadena llarga en el teixit neuronal?. L'existència d'individus deficients en CPT1A que no presenten anorèxia (Bonfont et al., 1999) va fer pensar en l'existència d'una nova proteïna sensible a malonil-CoA.

L'isotip CPT1C ha estat aïllat recentment a partir de "expressed sequence tags" (EST). Aquestes ESTs van revelar l'existència de varis clons humans i de ratolí de seqüències relacionades amb CPT1A i CPT1B que no corresponien realment a cap de les dues i que provenien, principalment, de cervell (Price et al., 2002). Segons les seqüències dels cDNAs de ratolí i humà, amb una identitat entre elles del 83.5%, es dedueix una proteïna de 798 aminoàcids amb un pes molecular pròxim al dels isotips A i B. La similitud en la seqüència aminoàcida del 54.5% i el 52.7%, respectivament, preveu una estructura primària i una disposició a la membrana mitocondrial externa similar entre els tres enzims.

2.- ORGANITZACIÓ GÈNICA

El gen humà *CPT1A* es localitza en el cromosoma 11q13.1-q13.5 (Britton et al., 1997). Presenta un marc obert de lectura de 2319 bp organitzat en, com a mínim, 19 exons separats per

18 introns de longituds molt diferents, amb seqüències 5' i 3' no traduïdes (76 i 35bp, respectivament) (Gobin et al., 2002). S'han proposat dos exons alternatius 1A i 1B (Gobin et al., 2002).

El gen humà *CPT1B* es localitza en el cromosoma 22q13.31-q13.32 (Britton et al., 1997). Presenta un marc obert de lectura de 2316 bp organitzat en: 2 exons 5' no traduïts, 1A i 1B, producte d'inicis de transcripció diferents, 18 exons codificants i 1 exó 3' no traduït (Yamazaki et al., 1996; Yamazaki et al., 1997). Els exons 1A i 1B van ser confirmats posteriorment, denominant-los U (*Upstream/Ubiquitous*), amb un inici 45bp corrent avall respecte 1A, i M (*Muscle*), que corresponia perfectament a 1B (Yu et al., 1998b). S'ha demostrat la presència de dos promotors alternatius pels gens humà, murí, de rata i oví (Van der Leij et al., 2002). A la regió 5' flanquejant del gen, aproximadament 300bp corrent amunt de l'exó 1A, s'ha trobat un homòleg de la colina cinasa i s'han descrit transcrits que contenen com a mínim la regió 3' d'aquest homòleg i part del gen *CPT1B*, però es desconeix, encara, la importància d'aquests transcrits (Yamazaki et al., 2000).

El gen humà *CPT1C* es localitza en el cromosoma 19q13.33. Presenta un marc obert de lectura de 2394 bp organitzat en 18 exons codificants i dos exons 5' no codificants. S'ha descrit un sol transcrit de 2.8Kb en humans (2.7Kb en ratolins). L'extrem 5' es troba adjacent a l'extrem 3' del gen que codifica per una proteïna Arginina N-metiltransferasa. (Price et al., 2002).

3.- PATRÓ D'EXPRESSIÓ

L'isotip CPT1A també es coneix com a isotip hepàtic (LCPT1) per ser aquest el primer teixit d'on es va aïllar. És l'enzim d'expressió única a fetge i fibroblasts humans (Britton et al., 1995), tot i que també s'expressa a intestins (Asins et al., 1995), illots pancreàtics (Assimacopoulos et al., 1997), ronyó, pulmó, melsa, ovari i cervell i en menor grau a cor (Brown et al., 1995), teixit adipós blanc i testicles (Esser et al., 1996; Adams et al., 1998; revisat per Cook et al., 1999).

L'isotip CPT1B també es coneix com a isotip muscular (MCPT1) per ser aquest el primer teixit d'on es va aïllar. És l'enzim d'expressió única a múscul esquelètic i teixit adipós marró (Esser et al., 1996) i predominant a cor (Weis et al., 1994a/b), teixit adipós blanc i testicles (Esser et al., 1996; Adams et al., 1998; revisat per Cook et al., 1999).

L'isotip CPT1C s'expressa principalment a cervell i nivells baixos de transcrits es detecten en testicles i ovaris humans. A nivell cerebral, la màxima expressió es concentra en àrees discretes directament implicades en el control de la gana i en el comportament alimentari: hipocamp i nuclis paraventricular, arcuat i supraquiasmàtic (Price et al., 2002).

Cal tenir en compte que els patrons d'expressió descrits no són fixes i que, encara avui, no està del tot clar la distinció entre teixits que expressin un o altre isotip. El desenvolupament post-natal de l'oxidació d'àcids grassos ha estat estretament relacionat amb l'activació del sistema CPT, principalment CPT1, i amb el canvi dels patrons d'expressió dels dos isotips en diferents teixits per tal d'adaptar-se a les necessitats energètiques i a la disponibilitat de substrat de cada moment.

En teixit cardíac de rata, l'isotip predominant en el moment del naixement és CPT1A, però els seus nivells disminuiran ràpidament durant l'etapa post-natal per augmentar els de CPT1B, que segueix el patró invers. Aquest canvi en els nivells correlaciona directament amb els nivells de carnitina, baixos en néixer i insuficients pel bon funcionament de l'isotip B, que presenta una afinitat per carnitina baixa, però suficients per l'isotip A, que presenta una afinitat per la carnitina superior. L'expressió transitòria de l'isotip A durant els primers temps de vida permet la β -oxidació durant la lactància (Brown et al., 1995). El teixit adipós blanc i els testicles també presenten un canvi en el patró d'expressió des de l'isotip A cap al B durant la diferenciació i la maduració sexual, respectivament (Brown et al., 1997; Adams et al., 1998).

4.- ACTIVITAT ENZIMÀTICA I CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES

4.1.- SISTEMES D'EXPRESSIÓ

L'enzim CPT1 catalitza la reacció de transesterificació d'acils-CoA de cadena llarga a acilcarnitines de cadena llarga. La seva activitat enzimàtica es troba íntimament relacionada amb la seva associació a la membrana mitocondrial externa, fins al punt que la dissociació d'aquesta dona lloc a un enzim inactiu. La principal dificultat en la caracterització d'aquests enzims ha estat trobar el sistema d'expressió adequat per generar un entorn membranós correcte, que donés lloc a un enzim actiu amb característiques similars a les descrites en mitocondris aïllats de teixits animals.

La transfecció de cèl·lules COS amb el cDNA de l'isotip hepàtic de rata dóna lloc a la sobre-expressió d'un enzim inhibible per malonil-CoA i sensible al tractament amb detergents (Esser et al., 1993b), però la presència d'activitat CPT1 endògena en els sistemes cel·lulars eucariotes dificulta l'estudi de les seves característiques cinètiques. És per això que l'expressió en sistemes heteròlegs sense activitat CPT1 endògena i que permeten l'expressió d'alts nivells de proteïna activa, com *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris*, ha significat el descobriment d'un bon model per l'estudi de les característiques enzimàtiques de les CPT (Brown et al., 1994b; De Vries et al., 1997).

L'ús del vector pHWO10 (Materials, apartat 4.2) per expressar els cDNAs de les CPT1 en *Pichia pastoris* GS115 i el clonatge dels cDNAs sense la regió 5' no codificant (Nicot et al., 2001) dóna lloc a enzims amb valors cinètics molt propers als descrits de mitocondris aïllats de teixit (McGarry et al., 1983); en contraposició a l'ús d'altres vectors, cDNAs amb la zona 5' no codificant clonada o altres soques de llevat que donen lloc a CPT1 amb sensibilitats a malonil-CoA molt diferents a les detectades en mitocondris de fetge i múscul esquelètic de rata (Jackson et al., 1999; Jackson et al., 2000a/b; Jackson et al., 2001).

4.2.- ACTIVITAT ENZIMÀTICA I CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES

L'activitat CPT1 es mesura, a partir de mitocondris de llevats aïllats, pel mètode de l'intercanvi isotòpic que, utilitzant L-[³H] carnitina i palmitoïl-CoA com a substrats, genera L-[³H] palmitoïlcarnitina que és extret amb solvents orgànics i detectat mitjançant comptatge radioactiu. Inicialment, els assaigs mostraven cinètiques de saturació que no seguien els patrons de Michaelis-Menten. A baixes concentracions de palmitoïl-CoA, els llocs d'unió de l'albumina, inclosa a l'assaig com a complexant de l'àcid gras, eren competits pel propi substrat, subestimant l'activitat CPT1 real. L'ús d'una relació molar fixa (6.1:1) entre el palmitoïl-CoA i l'albumina en tot el rang de concentracions de substrat va solucionar el problema, obtenint-se cinètiques de saturació de Michaelis-Menten (Pauly et al., 1988; Prip-Buus et al., 1998).

Utilitzant aquest mètode han estat caracteritzats els isotips CPT1A i CPT1B de diferents espècies (Zhu et al., 1997a/b; Price et al., 2003; Lin et al., 2005). En la majoria de casos, l'isotip A (hepàtic) mostra una sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA menor que l'isotip B (muscular) i una afinitat per la carnitina superior, no existint diferències significatives en l'afinitat pel substrat

acil-CoA (palmitoil-CoA) (Taula 2). Aquesta diferent sensibilitat al malonil-CoA respon, també diferent, a canvis hormonaals. Mentre que l'isotip A veu incrementada la seva sensibilitat a malonil-CoA en presència d'insulina i disminuïda per hormona tiroïdal, l'isotip B no és sensible a aquestes hormones. (Cook et al., 1980; Bremer, 1981; Cook et al., 1999). Els isotips hepàtics també veuen afectada la seva sensibilitat a malonil-CoA per canvis en la fluïdesa de la membrana mitocondrial (Kolodziej et al., 1990).

La proteïna CPT1C expressada en *Pichia pastoris* dona lloc a un enzim amb una alta afinitat per l'inhibidor malonil-CoA ($K_D=0.24\text{mM}$ respecte a RCPT1A $K_D=0.19\text{mM}$), però inactiu davant una àmplia varietat d'acil-CoAs de diferents longituds, tot i conservar les posicions claus per l'activitat carnitina aciltransferasa i la sensibilitat a malonil-CoA (Price et al., 2002). Cultius cel·lulars transfectats amb el cDNA de CPT1C mostren que aquesta no afecta els nivells de β -oxidació, indicant que la proteïna podria requerir de modificacions covalents específiques de neurona o d'activacions alostèriques absents en els sistemes assajats. CPT1C també podria actuar com a donador o acceptor de substrat ja que el lloc d'unió a carnitina es manté en l'estructura primària. El *Knockout* de CPT1C, tot i presentar una menor ingesta, és més sensible a les dietes riques en grasses i presenta una β -oxidació disminuïda (Wolfgang et al., 2006).

4.2.1- CPT1 de porc

El porc, com es descriu més endavant (Introducció, apartat 6.1.1), presenta unes característiques metabòliques, sobretot en néixer, molt diferents a les de la resta de mamífers. En adults, la β -oxidació hepàtica és poc efectiva mentre que presenten una bona β -oxidació muscular. En nounats, els nivells de β -oxidació i cetogènesi es troben molt disminuïts respecte a altres mamífers. Quin paper té la CPT1 en aquest comportament?

Estudis amb mitocondris hepàtics aïllats de porcs de pocs dies de vida i de rates adultes mostren que l'isotip hepàtic de porc és molt més sensible a malonil-CoA que el de rata ($IC_{50}=25\text{-}50\text{nM}$ respecte $IC_{50}=1270\text{nM}$) (Duée et al., 1994; Schmidt et al., 1998). Paral·lelament, l'assaig de mitocondris musculars indica que la sensibilitat a malonil-CoA de l'isotip B de porc és menor que la de l'isotip A, a diferència del que passa en la majoria d'espècies (Schmidt et al., 1998). Pel que fa a l'afinitat per carnitina, les K_m per carnitina de mitocondris hepàtics i musculars de porc donen valors similars als corresponents isotips de rata ($155\mu\text{M}$ i $419\mu\text{M}$, respectivament) (Heo et

al., 2000). Segons tots aquests resultats, les CPT1 de porc són enzims amb característiques cinètiques particulars que requereixen un estudi específic.

El clonatge del cDNA de l'isotip hepàtic de porc (PCPT1A), la seva expressió en el sistema heteròleg *Pichia pastoris* i la seva caracterització enzimàtica han permès descriure els paràmetres cinètics d'aquest enzim. La CPT1A de porc ha resultat ser una quimera natural dels isotips A i B, amb una afinitat per la carnitina alta ($K_m=126\mu\text{M}$, típica dels isotips A) i una sensibilitat a malonil-CoA alta ($IC_{50}=141\text{nM}$, típica dels isotips B). La K_m per palmitoïl-CoA presenta valors similars a les CPT1 de rata i humana descrites. (Nicot et al., 2001) (Taula 2).

	IC₅₀ Malonil-CoA (nM)	K_m Carnitina (μM)	K_m Palmitoïl-CoA (μM)
RCPT1A	1900	100	43
HCPT1B	69	666	42
PCPT1A	141	126	35

Taula 2.- Característiques cinètiques de CPT1A de rata, CPT1B humana i CPT1A de porc. Dades obtingudes de mitocondris de llevats recombinants. (Dai et al., 2000; Zhu et al., 1997; Nicot et al., 2001).

A nivell estructural, el cDNA de la CPT1A de porc codifica per una proteïna de 772 aminoàcids amb un pes molecular predit de 88 KDa i una alta homologia amb les proteïnes CPT1A de rata i humana. El gen *CPT1A* de porc conté 2 exons situats a 5' de l'exó que conté l'ATG i que són transcrits de manera alternativa donant lloc a la mateixa proteïna. El patró d'expressió és el mateix que el dels seus homòlegs en rata i humans.

5.- RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ

La proteïna CPT1 no ha estat cristal·litzada, però diferents models estructurals han estat proposats (Morillas et al., 2001; Gobin et al., 2003; Morillas et al., 2004) basant-se en els cristalls de les proteïnes CRAT (carnitina acetiltransferasa) humana i de ratolí i COT (carnitina octanoïltransferasa) (Jogl et al., 2003; Wu et al., 2003; Jogl et al., 2004; Jogl et al., 2005) i en la informació subministrada per l'anàlisi directa de les seqüències aminoàcides i la construcció i expressió en sistemes heteròlegs de mutants i enzims quimèrics (Zammit et al., 2001).

5.1.- TOPOLOGIA DE LA MEMBRANA

Les seqüències aminoàcides de les proteïnes CPT1, entre isotips i entre espècies, presenten un alt grau d'identitat que es creu que es tradueix en una pràcticament idèntica disposició a la membrana. Els enzims CPT1A i CPT1B es troben ancorats a la membrana mitocondrial externa a través de dos fragments transmembrana hidrofòbics (TM) amb estructura d' α -hèlix. Aquests dos fragments inclouen els aminoàcids 52-75 (TM1) i 102-126 (TM2). Els extrems amino (aminoàcids 1-51) i carboxil (aminoàcids 127-772/773) de la proteïna s'encaren cap al citosol mentre que la unió entre les dues regions hidrofòbiques es troba a l'espai intermembrana (Esser et al., 1993b, Fraser et al., 1997; Van der Leij et al., 1999; Zammit et al., 1999).

L'import de l'enzim a la membrana segueix un mecanisme de parada de transferència. La CPT1 sintetitzada és enviada al mitocondri per la seva seqüència d'import interna que, situada immediatament després del segon fragment transmembrana (posicions 123-147 a la CPT1A de rata), marca el direccionament i la inserció de l'enzim (Cohen et al., 1998). A continuació, la proteïna interacciona amb la maquinària d'import de la membrana mitocondrial externa i sembla que és TM2 el que actua com a seqüència de parada de transferència (Cohen et al., 2001). La substitució de l'extrem amino-terminal de l'enzim CPT1A per una seqüència Tom70p, que dirigeix i fixa a la membrana mitocondrial externa la proteïna, fa que CPT1 adopti una conformació menys plegada de l'extrem carboxi-terminal i presenti una activitat reduïda (Cohen et al., 1998). Aquest mecanisme, inicialment descrit pels isotips hepàtics, seria extrapolable als isotips musculars per la similitud de seqüències que indica un mateix grau d'hidrofobicitat i unes, probablement, molt similars estructures secundàries.

Igual que CPT1, l'enzim ACS també es troba associat a la membrana mitocondrial externa i sembla que les dues proteïnes es trobarien en zones on les membranes mitocondrials interna i externa estarien en contacte (Hoppel et al., 1998), creant una zona òptima per facilitar el transport d'àcids grassos a la matriu mitocondrial (Kerner et al., 2000). Cal assenyalar que també es troba a la membrana mitocondrial externa la proteïna ACC2 que catalitza la síntesi de malonil-CoA (Abu-Elheiga et al., 2000).

5.2.- DETERMINACIÓ DELS DOMINIS CATALÍTIC I REGULADOR

L'estudi de construccions mutants i quimèriques de CPT1A i CPT1B de diferents espècies, expressades en sistemes heteròlegs, ha permès localitzar, a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna, el domini catalític de l'enzim i implicar la regió N-terminal en la sensibilitat a malonil-CoA (Cohen et al., 1998; Swanson et al., 1998; Shi et al., 1998; Shi et al., 1999; Shi et al., 2000; Dai et al., 2000; Jackson et al., 2000b). Alhora, combinacions dels diferents dominis de la proteïna han demostrat que les interaccions entre els extrems citosòlics i entre els fragments transmembrana són claus per definir les característiques cinètiques de cada enzim (Jackson et al., 2000a).

Els treballs fins ara publicats indiquen que les afinitats pel palmitoïl-CoA i el malonil-CoA de la CPT1, especialment per CPT1A, són fruit d'interaccions entre els dominis amino i carboxil i responsabilitat de seqüències curtes de les regions N-terminal de la proteïna que tenen efectes positius o negatius sobre la sensibilitat a l'inhibidor. En contra, s'ha descrit que l'afinitat per carnitina depèn d'interaccions entre els dominis transmembrana, especialment en l'isotip B (Jackson et al., 2000a), fet que implicaria que variacions en la composició lipídica de la membrana no afectarien els paràmetres cinètics referents a palmitoïl-CoA i malonil-CoA, però sí a la K_m per carnitina.

Segons tots els resultats, l'extrem amino i els dominis transmembrana tenen el paper principal en la determinació de les característiques cinètiques, tant de CPT1A com de CPT1B. Els mecanismes que marquen les cinètiques d'aquests enzims són independents en cada paràmetre, anul·lant la idea clàssica que enzims amb una alta afinitat per carnitina (K_m baixa) presenten una baixa sensibilitat a malonil-CoA (IC_{50} alta) i a la inversa.

Aquesta afirmació ha estat confirmada amb el clonatge de la CPT1A de porc que, expressada en un sistema heteròleg, resulta en un enzim que cinèticament es comporta com una quimera natural, amb una afinitat per la carnitina alta ($K_m=126\mu M$, típica dels isotips A) i una sensibilitat a malonil-CoA alta ($IC_{50}=141nM$, típica dels isotips B) (Nicot et al., 2001). La caracterització cinètica de la CPT1A de porc també corrobora la idea que la interacció entre els fragments transmembrana és determinant en la K_m per carnitina. L'afinitat d'aquest enzim per aquest substrat és similar a la del seu homòleg de rata, amb qui comparteix pràcticament tota la seqüència aminoàcida d'aquesta regió. La CPT1B de rata, per la seva banda, presenta un residu

bàsic (Arginina⁵²) en el domini TM1 que podria ser responsable de les diferències observades entre isotips A i B en les K_m per carnitina.

5.2.1.- DOMINI CATALÍTIC

Fraser et al. (1997) van demostrar que el domini catalític de la CPT1 es trobava en la regió C-terminal. El mecanisme proposat per la catàlisi de les acilcarnitines és similar al d'enzims com les lipases, proteases i acetilcolinesterases i implica la formació d'una tríada catalítica entre un residu d'histidina, crític per la reacció, un d'aspàrtic i una serina o una treonina (Dodson i Wlodawer, 1998). En el cas de les CPT, el grup 3-hidroxi activat de la histidina atacaria el grup carbonil de l'acil-CoA o de l'acilcarnitina formant-se un pont d'hidrogen.

Per mutagènesi s'ha assignat a la His⁴⁷³ de la seqüència de la CPT1A la funció catalítica i s'ha definit el seu posicionament en el model tridimensional publicat basat en el cristall de la CRAT (carnitina acetiltransferasa) (Morillas et al., 2001; Morillas et al., 2004). En aquest cristall, el Glu³²⁶ el residu àcid de la tríada i equival a l'Asp⁴⁷⁷ de la CPT1A. En el cas de la CPT2 s'han descrit dos aspàrtics importants per l'activitat catalítica que corresponen als residus Asp⁴⁷⁷ i Asp⁵⁶⁷ de la CPT1A (Brown et al., 1994a). Finalment, s'ha proposat la Ser⁶⁸⁷ de la CPT1 com a tercer component de la tríada.

Entre els aminoàcids implicats en la unió dels substrats a l'enzim també s'han proposat diferents residus arginina i triptòfan de la CPT1A, que estabilitzarien els complexos enzim-substrat per neutralització de càrregues i interaccions hidrofòbiques (Dai et al., 2000). En tots els casos, es tracta de residus aminoàcids altament conservats entre les aciltransferases entre els quals destaquen: Arg³⁸⁸, Arg⁴⁵¹, Trp³⁹¹ i Trp⁴⁵². Aquests residus es troben inclosos en una regió de 100 bp amb una estructura secundària predita de 4 α -hèlixs similar a l'estructura tridimensional de l'ACBP (*acyl-CoA binding protein*) i que constituïria el putatiu lloc d'unió del palmitoil-CoA (Dai et al., 2000). Els resultats amb construccions quimèriques de combinacions dels diferents dominis de CPT1A amb els de CPT1B indiquen que el domini C-terminal de la CPT1B, a diferència del de la CPT1A, pot assumir canvis en les interaccions entre els dominis amino i carboxil, sense perdre afinitat al palmitoil-CoA (Jackson et al., 2000a).

Els residus Arg⁶⁰¹, Arg⁶⁰⁶ i Glu⁶⁰³ són també importants en l'activitat enzimàtica i la sensibilitat al malonil-CoA ja que la seva mutació a alanina o histidina implica una pèrdua total

d'activitat i una disminució de la sensibilitat a l'inhibidor (Treber et al., 2003). La Leucina-764 també s'ha implicat en l'activitat catalítica (Dai et al., 2003).

L'enzim CPT1 pot disposar-se en dos microambients membranosos, a la membrana mitocondrial externa com a tal o en regions d'aquesta que estan en contacte amb la membrana mitocondrial interna, variant, segons la localització, l'afinitat pel substrat acil-CoA. La CPT1 adopta doncs, estructures terciàries diferents segons on es trobi, alterant-se el lloc d'unió al palmitoil-CoA i/o la seva interacció amb l'ACBP (*acil-CoA binding protein*).

5.2.2.- DOMINI REGULADOR

Els extrems amino-terminal de les proteïnes CPT1 caracteritzades, inclosos els dos dominis transmembrana, presenten seqüències molt similars. (Figura 7). Aquesta elevada identitat aminoacídica es perd en les CPT2 i el fet que aquest enzim sigui insensible a malonil-CoA ha fet centrar els esforços cap als residus amino de les CPT1 per trobar la regió responsable de la sensibilitat a l'inhibidor.

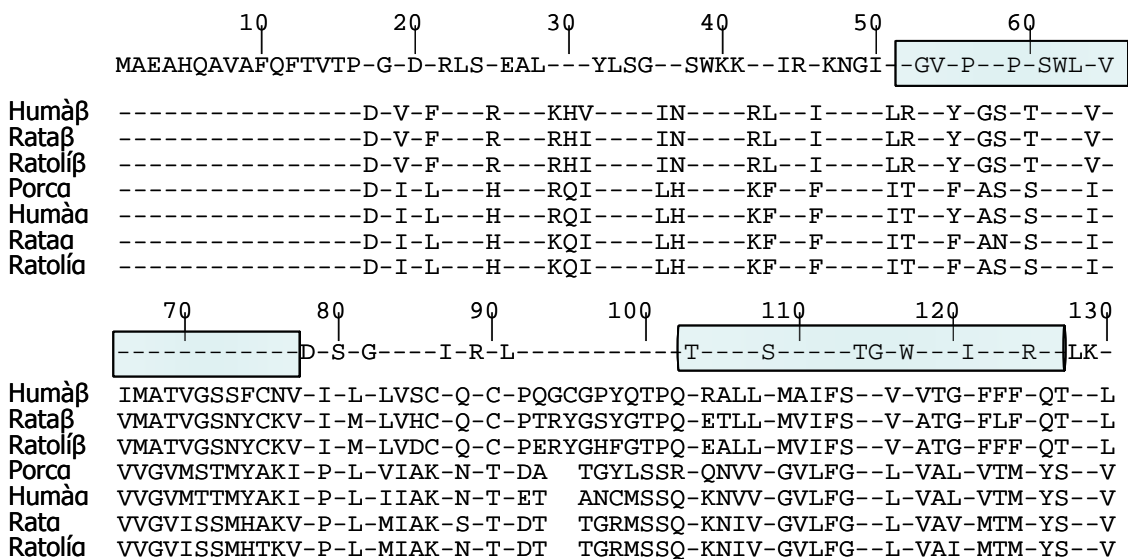


Figura 7.- Alineament de l'extrem amino i dels dominis transmembrana dels diferents isotips de CPT1. Alineament on s'indica l'extrem amino terminal i les dues regions transmembrana (incloses en un requadre) de diferents isotips de CPT1 de diferents espècies. S'observa la similitud de seqüència entre espècies i entre isotips. A la part superior de l'alineament s'indiquen els aminoàcids comuns indicant les diferències en cada seqüència.

La construcció i anàlisi de proteïnes mutants i quimèriques ha permès l'estudi de punts clau en la sensibilitat a malonil-CoA, però encara poc es coneix sobre els mecanismes que fan que

uns enzims siguin més sensibles que altres. El que sembla clar és que són molts els factors implicats en definir aquest paràmetre: residus específics com el Glu³, seqüències curtes de la regió N-terminal i l'extrem C-terminal. S'ha vist que alteracions en la interacció entre els dominis amino i carboxil afecten la sensibilitat a malonil-CoA dels isotips hepàtics (Zammit et al., 1997; Jackson et al., 2000a) i que la diferent sensibilitat entre els diferents isotips és, en part, deguda a l'estructura de la regió C-terminal de les proteïnes (Swanson et al., 1998; Jackson et al., 2000a).

Diferents estudis han demostrat que la pèrdua d'un petit número de residus aminoàcids de l'extrem amino-terminal de la CPT1, sobretot en l'isotip hepàtic, resulta en enzims insensibles o pràcticament insensibles a malonil-CoA.

La deleció progressiva de la regió N-terminal de l'enzim CPT1A de rata ha implicat els 18 primers aminoàcids de la proteïna en la sensibilitat a l'inhibidor. L'enzim mutant Δ 1-18, tot i tenir la mateixa activitat que l'enzim salvatge, presenta una IC_{50} pel malonil-CoA molt superior (de 1.9 μ M a 380 μ M) sent, doncs, un enzim molt insensible a l'inhibidor. En aquest treball, la deleció més llarga, 129 aminoàcids, dóna lloc a una proteïna inactiva, però tots els mutants intermitjos són més insensibles a malonil-CoA (IC_{50} = 170 μ M) que l'enzim salvatge (Shi et al., 1998). En el mateix sentit, la deleció de la seqüència aminoàcida entre els residus 19 i 30 de la CPT1A de rata té l'efecte contrari.

D'aquests resultats sorgeix la idea que els residus del 1-18 de la CPT1A de rata actuen com a dominant positiu per la sensibilitat a malonil-CoA, la seva deleció comporta un enzim menys sensible, i que, en canvi, la regió 19-30 actua com a dominant negatiu provocant, la seva deleció, un augment de sensibilitat a l'inhibidor. Els autors suggereixen que, *in vivo*, el balanç entre els dos dominants té efectes en els canvis conformacionals deguts a alteracions en la composició de la membrana lipídica (Jackson et al., 2000b).

Assaigs amb el "catalytic core" de CPT1A, un mutant delecionat en els 82 primers aminoàcids que ha perdut la regió amino i els dos dominis transmembrana de l'enzim, apunten a l'existència d'un gran determinant negatiu per la sensibilitat a malonil-CoA en tota aquesta regió perduda. Els enzims Δ 1-82 resulten ser més sensibles a l'inhibidor que el mutant Δ 1-18. El problema d'aquests resultats és el sistema d'expressió emprat pel grup del Dr. Zammit on l'enzim CPT1A presenta característiques cinètiques llunyanes a les descrites en mitocondris tissulars intactes, amb IC_{50} molt superiors a les naturals (38 μ M per RCPT1A). Els mateixos mutants

assajats per Shi et al. (1998) són només 1.3 vegades més sensibles a la inhibició per malonil-CoA que els enzims delecionats en els primers 18 residus.

Entre els residus que s'han implicat en la sensibilitat a malonil-CoA de la CPT1A cal destacar la His⁵ i el Glu³. La mutació de qualsevol dels dos a alanina (H5A i E3A) genera un enzim menys sensible a l'inhibidor (Swanson et al., 1998; Shi et al., 1999), però en cap cas es perd completament la capacitat del malonil-CoA d'inhibir l'enzim. Altres aminoàcids relacionats amb la sensibilitat al malonil-CoA de la CPT1A de rata han estat: His²⁷⁷, His⁴⁸³, Ala⁴⁷⁸, Met⁵⁹³; Ala⁴⁷⁸, Glu⁶⁰³, Arg⁶⁰¹, Arg⁶⁰⁶, Glu⁵⁹⁰ (Morillas et al., 2002; Morillas et al., 2003; Treber et al., 2003; Napal et al., 2003). En tots els casos, la seva mutació puntual comporta una pèrdua de sensibilitat a malonil-CoA, excepte pel residu glutàmic-590. Es tracta d'un aminoàcid molt conservat entre les aciltransferases que, mutat a alanina, dona lloc a un enzim més sensible a l'inhibidor (Napal et al., 2003).

Pel que fa a l'isotip CPT1B, ni la delecíó dels residus 19-30 (Jackson et al., 2000b), ni la mutació del Glu³, ni la delecíó dels primers 18 aminoàcids tenen efecte sobre la sensibilitat a malonil-CoA (Jackson et al., 2000b; Shi et al., 2000). En contra, delecions més llargues com ara la delecíó dels primers 28 aminoàcids de l'enzim humà que anul·la la capacitat del malonil-CoA d'inhibir l'enzim, sí que impliquen canvis en la sensibilitat a l'inhibidor. Cal destacar que malgrat els mutants Δ 3-18 i Δ 19-30 de la CPT1B no tenen afectada la sensibilitat a malonil-CoA sí que presenten canvis en l'afinitat per carnitina (Jackson et al., 2000b).

Els residus His⁵ i Glu³, igual que en la CPT1A, i els residus Val¹⁹, Leu²³ i Ser²⁴ s'han identificat com a necessaris per la inhibició dels isotips B (Zhu et al., 2003). La similitud entre les seqüències primàries d'aquesta regió dels dos isotips suggereix la interacció amb altres zones de la proteïna per explicar les diferents sensibilitats. Alguns estudis han apuntat la possibilitat que la presència en el TM1 dels isotips B del residu bàsic Arg⁵² podria atorgar-li a l'enzim una estructura més rígida que la dels isotips A, que explicaria la menor afectació de la sensibilitat a malonil-CoA d'aquest isotip per estats fisiològics i canvis en la composició lipídica de la membrana.

Una de les idees més esteses actualment en la definició de la sensibilitat a malonil-CoA preveu l'existència de dos llocs d'unió a l'inhibidor, un de baixa afinitat i un d'alta afinitat (Bird et al., 1984). Assaigs d'unió amb [¹⁴C]malonil-CoA mostren que el lloc d'alta afinitat desapareix en delecionar els primers 18 aminoàcids de la proteïna CPT1A de rata (Shi et al., 1998). En el

mateix sentit, els mateixos autors van observar que, mentre que els mutants de la His⁵ (H5A) conservaven les dues regions d'unió, els mutants del Glu³ (E3A) només presentaven el de baixa afinitat (Shi et al., 1999), demostrant que els dos aminoàcids i la unió d'alta afinitat són necessaris per la inhibició per malonil-CoA i la unió d'alta afinitat.

Un altre fet que corrobora aquesta idea és el comportament anòmal del malonil-CoA com a inhibidor competitiu del palmitoïl-CoA. L'increment de concentració de palmitoïl-CoA, *in vitro*, dóna lloc a representacions gràfiques sigmoïdes en les corbes d'inhibició per malonil-CoA (Cook, 1984). A concentracions elevades de palmitoïl-CoA, la inhibició per malonil-CoA disminueix, indicant que competeixen per un mateix lloc d'unió o si més no els seus llocs d'unió es solapen.

6.- REGULACIÓ DEL SISTEMA CPT1

L'enzim CPT1 és un punt de control important de la β -oxidació d'àcids grassos de cadena llarga i com a tal està sotmès a un estricte control hormonal i nutricional que afecta a la seva activitat enzimàtica i a la seva expressió gènica (Louet et al., 2001). Situacions com el dejú, la dieta rica en grasses o la diabetis impliquen un increment de l'activitat CPT1 i en conseqüència de la β -oxidació (Thumelin et al., 1994; Park et al., 1995).

Probablement però, el canvi més bruscat en els nivells i l'activitat de la CPT1 es dóna en el naixement. En la majoria de mamífers, la capacitat de β -oxidar, relacionada amb un increment de l'activitat CPT1A (McGarry et al., 1980; Thumelin et al., 1994; Asins et al., 1995), es desenvolupa immediatament després del part, en passar d'una dieta constant rica en carbohidrats i aminoàcids a una dieta rica en grasses (llet materna) amb intervals de dejú (Girard et al., 1992). Juntament amb aquests canvis nutricionals, el naixement també comporta una sèrie de canvis hormonals que també afectaran la taxa de β -oxidació. Els nivells plasmàtics de glucagó augmenten i els d'insulina cauen, probablement per acció del sistema nerviós simpàtic activat en l'estrès del part i aquesta relació es manté fins que s'inicia la dieta adulta i els valors s'inverteixen (Girard et al., 1992). Per altra banda, les concentracions d'hormona tiroïdal i glucocorticoides, baixes durant l'al·letament, augmenten en iniciar la dieta adulta rica en carbohidrats i pobra en grasses, afectant l'expressió de CPT1.

6.1.- METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS EN EL PORC

Després de néixer, els requeriments de glucosa per òrgans com el cervell s'han de satisfer ràpidament i tot i que les reserves de glicogen acumulades són molt limitades cal activar la gluconeogènesi. En aquests casos, el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa dependrà del bon funcionament de la síntesi i de l'aportació externa a través de la llet materna (Girard et al., 1992). En la majoria de mamífers, el naixement implica, segons això, una sèrie de canvis metabòlics que comporten l'activació de la gluconeogènesi, la β -oxidació i la cetogènesi. A nivell hepàtic, muscular, renal i de teixit adipós marró s'activa la β -oxidació sumada, en els teixits cetogènics com el fetge, a la producció de cossos cetònics. En aquesta situació s'incrementen els nivells de fosfoenolpiruvat carboxicinas (PEPCK), CPT1A i 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial (HMG-CoA sintasa). L'elevada expressió d'aquests gens es manté durant tot l'alletament i comencen a caure en el deslletament. (Serra et al., 1993; Thumelin et al., 1994; Asins et al., 1995; Asins et al., 1996).

El porc presenta característiques pròpies en el metabolisme lipídic que es mantenen al llarg de tota la seva vida, però que són especialment importants durant el període neonatal. Els nivells de cossos cetònics en porcs nounats es mantenen baixos tot i l'elevada concentració en plasma d'àcids grassos lliures i aquests animals no presenten la hipercetonèmia típica d'altres mamífers alimentats amb llet materna (Pegorier et al., 1981). Aquesta manca de cetogènesi és deguda a una limitada capacitat en la β -oxidació hepàtica (Pegorier et al., 1983) que no és conseqüència, ni d'una manca de mitocondris, que incrementen en número 24h després del naixement (Mersmann et al., 1972), ni d'una baixa activitat o inhibició de l'enzim CPT1. Es tracta, de fet, d'una falta de proteïna i activitat HMG-CoA sintasa mitocondrial (Duée et al., 1994) que pot provocar l'acumulació d'acetil-CoA i la inhibició de la β -oxidació. Malgrat aquests resultats clars és curiós comprovar que les característiques cinètiques de la CPT1A de porc difereixen considerablement de les altres CPT1A estudiades.

6.2.- REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL

6.2.1.- CPT1A

Tal i com s'ha explicat anteriorment, la capacitat de β -oxidar àcids grassos en la majoria de mamífers es desenvolupa en les primeres hores de vida extrauterina i l'activitat CPT1A segueix un patró d'expressió molt marcat des del naixement fins l'edat adulta. Les rates, en néixer, presenten una activitat CPT1 hepàtica baixa que s'incrementa durant el primer dia de vida, es manté alta durant l'al·letament i disminueix en passar a la dieta adulta excepte si aquesta és rica en grasses. Si es determinen els nivells de proteïna i mRNA en aquestes diferents situacions s'observen variacions en els nivells de missatger paral·leles a les variacions en l'activitat (Thumelin et al., 1994 ; Asins et al., 1995), implicant una regulació de la CPT1A a nivell de l'expressió gènica. Situacions com l'hipertiroïdisme o la diabetis induïda per estreptozotocina també indueixen els nivells de mRNA de CPT1A (Mynatt et al., 1994; Park et al., 1995).

Estudis amb hepatòcits fetals en cultiu han mostrat que l'AMPc, que es troba augmentat per l'elevada relació glucagó/insulina, i els àcids grassos de cadena llarga, que presenten alts nivells per la dieta rica en grasses aportada per la llet materna, són capaços d'incrementar els nivells de mRNA de la CPT1A (Chatelain et al., 1996). Aquest efecte pot ser antagonitzat per insulina. Paral·lelament, s'ha vist que els àcids grassos de cadena llarga, a part de tenir un efecte transcripcional directe, estableixen el mRNA de la CPT1A (Park et al., 1995).

La descripció de PPAR α com a factor de transcripció clau en la regulació transcripcional d'enzims implicats en el metabolisme lipídic (ACS, CPT1B, CPT2, MCAD, HMG-CoA deshidrogenasa), la inducció de CPT1A pel dejú i després del naixement, de manera similar als gens diana de PPAR α descrits, i l'increment de l'expressió de CPT1A per molècules proliferadores de peroxisomes com el clofibrat (Chatelain et al., 1996), amb pèrdua d'aquest efecte en animals que no tenen PPAR α (*Knockout*) (Louet et al., 2001), són dades que indiquen que *CPT1A* és un gen diana d'aquest receptor nuclear.

Inicialment, es va localitzar un putatiu lloc d'unió a PPAR (PPRE) en el promotor humà de la CPT1A. Aquest element era capaç d'unir PPAR α i HNF4 en assaigs de retardació en gel, però va resultar no funcional en assaigs de transfecció transitoria de cèl·lules HepG2 (Barrero et al., 2000a) i poc actiu en cèl·lules FAO (Louet et al., 2001), insuficient per explicar el mecanisme de

resposta a àcids grassos de cadena llarga. Finalment, a través d'aproximacions bioinformàtiques, ha estat localitzat un PPRE funcional 3Kb per sota de l'inici de transcripció, en una regió intrònica, que ha resultat ser funcional i fonamental per la resposta del gen a àcids grassos i per la inducció transcripcional observada per PGC-1 sobre CPT1A (Napal et al., 2005).

En el promotor proximal del gen de rata s'han descrit també llocs d'unió a Sp1, Sp3 i NFY (Park et al., 1998; Steffen et al., 1999). En posicions més distals hi ha un element de resposta positiva a hormona tiroïdal (TRE) (Barrero et al., 2000b; Jansen et al., 2000), un element de resposta a AMPc, (CRE: *cAMP responsive element*) que uneix CREB i una seqüència DR1 que uneix HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 α*). L'intró 1 del gen de la CPT1A de rata, per la seva banda, ha estat relacionat amb la resposta a hormona tiroïdal (T3) i a PGC-1 (Jackson-Hayes et al., 2003; Song et al., 2004) a través d'una regió que conté llocs d'unió a C/EBP α , USF-1 i USF-2. PGC-1 també coactiva la inducció de CPT1A per T3 a través del TRE (Zhang et al., 2004), ha estat implicat en la regulació del gen per AMPc (Louet et al., 2002) i darrerament s'ha descrit com a co-activador de Foxa2. (Wolfrum et al., 2006).

6.2.2.- CPT1B

Com en el cas de CPT1A, els nivells de mRNA de CPT1B augmenten en situacions com el dejú, la dieta rica en grasses o el tractament amb proliferadors de peroxisomes, fent pensar en regulació per àcids grassos de cadena llarga i en PPARs com a mediadors d'aquest efecte. Un element de resposta a PPAR (PPRE), capaç d'unir i conferir resposta als tres isotips de PPAR: PPAR α , PPAR δ i PPAR γ (Mascaró et al., 1998), va ser localitzat corrent amunt de l'exó 1A/U del gen humà. En cultius primaris de cardiomiòcits de rata i en cultius de cèl·lules C2C12, aquesta seqüència va ser descrita com un element de resposta a àcids grassos (FARE: *fatty acid response element*) capaç de mediar l'efecte d'àcids grassos com l'oleic o el decanoic i de proliferadors de peroxisomes com el gemfibrozil i el POCA a través de PPAR α (Yu et al., 1998b; Brandt et al., 1998).

Paral·lelament a aquests treballs, s'ha descrit, en ratolins que no expressen PPAR α (*knockout*), una expressió disminuïda, respecte els ratolins salvatges, de CPT1B a nivell cardíac (Brandt et al., 1998). Experiments amb cèl·lules musculars en cultiu mostren que lligands específics de PPAR α , com el GW7647, indueixen l'expressió d'enzims mitocondrials implicats en el catabolisme dels àcids grassos, entre ells la CPT1B i la malonil-CoA descarboxilasa (Muoio et

al., 2002). PPAR α és capaç de regular transcripcionalment *CPT1B* a través dels seus dos promotors, 1A/U i 1B/M (Yu et al., 1998b).

En el promotor humà, el PPRE descrit es troba flanquejat per una E-Box, element de resposta a factors de transcripció de la família MyoD, i un element d'unió a MEF. Aquests tres elements configuren una estructura de 46bp molt conservada entre els promotors humà, de rata, de ratolí i d'ovella (Baldán et al., 2001; Modificat de Van der Leij et al., 2002) (Figura 8).

	E-box	PPRE	MEF-2
Humà	GAACAGG CAGCTG ACACATCGG	TGACCTTTTCCCTACATTG G	CTATTTTTAGCTCTAAT
Rata	GGCTACA CAGCTG ACTCCTGG-	TGACCTTTTCCCTACATTCA G	CTATTTTTAGCACTGAT
Ratolí	GGCTGCT GAGCTG ACTCCTGG-	TGACCTTTTCCCTACATTCA G	CTATTTTTAGGACTGAT
Ovella	GGAGGCA CAGCTG ACACCCGGA	CGACCTTTTCCCTACATTCA G	CTATTTTTAGTTCAAAT

Figura 8.- Alineament dels promotors humà, de rata, de ratolí i d'ovella de *CPT1B*. Alineament de la seqüència promotora indicant els residus conservats (-) i els potencials llocs d'unió dels factors de transcripció MyoD (vermell), PPAR (verd) i MEF-2C (Blau). (Baldán et al., 2001; Modificat de Van der Leij et al., 2002).

Darrerament, s'ha suggerit des de molts àmbits la importància de PPAR δ en la regulació de gens implicats en el metabolisme lipídic. Experiments sobre cèl·lules de múscul esquelètic en cultiu amb agonistes específics d'aquest factor (GW501516) mostren una inducció en l'expressió de gens implicats en la β -oxidació (Dressel et al., 2003). PPAR δ és el principal isotip a nivell de múscul esquelètic i, tot i que de moment poc se sap sobre les seves funcions biològiques i els seus gens diana, diversos estudis apunten a un cavalcament funcional amb PPAR α , que també presenta bons nivells d'expressió a nivell muscular.

Per altra banda, el lloc d'unió a MEF2 és capaç d'unir MEF2A i MEF2C (Moore et al., 2001), membres de la família de factors de transcripció MADS implicats en la regulació transcripcional de gens musculars (Edmonson et al., 1993) i la E-Box és capaç d'unir MyoD, que també s'ha implicat en la regulació transcripcional de gens musculars. Corrent avall d'aquesta regió trobem una sèrie d'elements d'unió als factors de transcripció Sp1, Sp3 i Egr-1.

La zona 5' del gen *CPT1B* humà així com els elements responsables de la regulació transcripcional del gen estudiats en aquest treball es troben indicats en la Figura 9.

ccccatccctcccagtccttggtgcagcttagaataataaataactaggacttgggga
 ggaggagagtgatgggggtatgaagacgacctgaggtggggatgccgcccggagcaccag
 cgatcccagaacaggcagcagctgacacatcggtagacctttccctacatttggctat
tAGCTCTAATGCCACCATCCTCACGAGACTCTGGGGCCCCCAGGCTCCAGACCTTTGAG
CAACCTTCACCGCACAGAAACCCAGCCGCGCCCTGCAATTCCCACCGCGGAAGgtgggtgg
 gttctggttctcgccccacgtttttccccgaccccgatttgggagtaggtgtcaggttctt
ggtgagggcgggcggggggtggctaaggcctgaaggacgtggGGACACGGGCCAGAGTGGCT
 GGCCCCACGCACGGACAGGAGTGAACCCGAGCTgtgagtagggggcgggcacagggcgccc
 gcggggggtctggggccctcagccctgcacagggcgaggacggcgctggggcccgcgcgctc
 ggggtggggaagggcgggctcccgaaccctgcctctgtccaggccggctccacttccagggg
 cgcctctctcccctgcccgcgccctcgtgacgcccccaactccaggctgcccttcgccg
 tccttggggctcctggagctttcaaggcccaaattcccctgcaccacagtggctgtgcccac
 ccggaaggctggcgcgaggatttggcggcgggtggcctggcggggggcgcgggccggggggc
 agccgctagtgcgcggggtggggggcgcgaggggtcgcggactggctggggggcgtctcggcg
 cggctggcgggcgggggcggcctaacgcgcccgcgcacccatctgccccgctcctAGGTGCC
GACCAACCCCCAGGATGGCGGAAGCTCACCAGG

Figura 9.- Regió promotora del gen *CPT1B* humà. La seqüència en negre indica la regió del promotor estudiada al llarg d'aquest treball. Els elements reguladors es marquen en color: E-Box (vermell)(-789/-784), PPRE (verd) (-774/-755), lloc d'unió a MEF2C (blau) (-753/-744) i lloc d'unió a factors Sp (marró) (-557/535). Les coordenades dels diferents elements de resposta es numeren considerant el primer nucleòtid de l'ATG com la posició +1, indicat en negreta després de la regió en gris. Les seqüències exòniques es representen en majúscules. (Basat en Yamazaki et al., 1996).

Altres factors vinculats a la regulació del gen *CPT1B* han estat: el co-activador PGC-1 (*PPAR γ coactivator-1*), que actua a través de PPAR α i alhora pot interaccionar amb MEF2C i MEF2A (Vega et al., 2000), ROR α (Lau et al., 2004), RIP-140 (*cofactor receptor interacting protein*) com a repressor transcripcional (Powelka et al., 2006; Leonardsson et al., 2004; Christian et al., 2005) i els factors de transcripció USF que, possiblement per interacció amb PGC-1, reduïrien l'activitat de MEF-2 reprimint la *CPT1B* (Moore et al., 2003).

En cultius primaris de cardiomiòcits, el gen de rata es troba regulat per la interacció entre el factor muscular GATA-4 i SRF a través de seqüències corrent amunt de l'exó 1, l'equivalent a l'1B en humà (Moore et al., 2001). També s'ha localitzat un *enhancer* de l'activitat basal entre l'exó 1 i l'intró1 (Wang et al., 2002).

6.3.- REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA

L'enzim CPT1 és regulat, a nivell proteic, pel seu inhibidor fisiològic malonil-CoA. Variacions en la concentració de malonil-CoA o en la sensibilitat de la CPT1 a la inhibició per aquest són els mecanismes més àmpliament acceptats per regular l'activitat CPT1 i de retruc la β -oxidació.

6.3.1.- REGULACIÓ DELS NIVELLS DE MALONIL-CoA

A nivell hepàtic, el malonil-CoA és el primer intermediari en la síntesi d'àcids grassos, a part de ser un inhibidor alostèric de la CPT1. A nivell muscular i cardíac, on la síntesi d'àcids grassos és mínima, el seu paper principal és regular la β -oxidació. Enzims com la sintasa d'àcids grassos (FAS), la malonil-CoA descarboxilasa (MCD) (An et al., 2004) o els enzims del sistema d'elongació d'àcids grassos poden estar implicats en la regulació dels nivells de malonil-CoA, però el seu primer punt de control és la seva síntesi, que depèn de l'activitat acetil-CoA carboxilasa (ACC).

Existeixen actualment dos isotips descrits codificats per gens localitzats en cromosomes diferents (revisat per Kim et al., 1997). ACC1 (o α) és l'isotip majoritari en el citosol de teixits lipogènics (fetge, teixit adipós, glàndules mamàries i pulmó) i ACC2 (o β) s'expressa principalment en teixit cardíac, muscular i en menor proporció a fetge (Abu-Elheiga et al., 2001). Funcionalment, ACC1 està implicada en la producció de malonil-CoA citoplasmàtic que s'utilitzarà per la síntesi d'àcids grassos (Wakil et al., 1989). L'ACC2, per la seva banda, presenta un pèptid líder de direccionament mitocondrial en el seu extrem amino que fa que l'enzim s'associï a la membrana mitocondrial externa de manera similar a la CPT1 (Abu-Elheiga et al., 2000), proveint a aquesta de malonil-CoA. La producció de malonil-CoA queda, segons aquestes dades, repartida en compartiments cel·lulars diferents, en el citosol la resultant de la ACC1 i en el mitocondri la de l'ACC2 (Abu-Elheiga et al., 2001), fet que explica que ratolins que no expressen ACC2 (ACC2^{-/-}) presenten una β -oxidació incrementada, menys grassa acumulada en teixit adipós i fetge i menys reserves de glicogen hepàtiques (Abu-Elheiga et al., 2001).

L'activitat ACC és regulada alostèricament per citrat i LC-acil-CoA que activen i reprimeixen l'enzim, respectivament (revisat per Saha et al., 1999; Ruderman et al., 1999; Ruderman et al., 2004) i per mecanismes de fosforilació/desfosforilació a través de diferents serina/treonina cinases (PKA: *cAMP dependant protein kinase*, PKC: *protein kinase C* i AMPK: *Amp-activated*

protein kinase (Ferrer et al., 1985) que fosforilen l'enzim, inactivant-lo (revisat per Rasmussen et al., 1999; Ronnet et al., 2005). A nivell hormonal, la insulina és capaç d'activar l'ACC, disminuint els nivells d'AMPc i activant fosfatases que inhibeixen la AMPK, i hormones com el glucagó o molècules β -adrenèrgiques inactiven l'ACC incrementant els nivells d'AMPc.

A nivell fisiològic, la ingesta augmenta els nivells de glucosa i d'insulina incrementant la glucòlisi, la producció de citrat i la producció de malonil-CoA per activació de l'ACC. Al produir-se més malonil-CoA la CPT1 es troba reprimida, la β -oxidació aturada i la lipogènesi activada. En situacions de dejú o de diabetis, on els nivells d'insulina, o el seu efecte, es troben disminuïts, la poca glucòlisi estimula la mobilització d'àcids grassos, la inhibició de l'ACC, la caiguda dels nivells de malonil-CoA i l'activació de la CPT1, la β -oxidació i la cetogènesi. Existeix també un control adaptatiu on situacions com el dejú perllongat o l'exercici habitual afecten l'expressió dels gens CPT1 i ACC (Rasmussen et al., 1999).

A nivell muscular, tot i que la concentració de malonil-CoA varia en funció de situacions com el dejú, l'exercici físic i el tipus de fibres musculars, els nivells basals sempre són superiors a la concentració necessària per mantenir la CPT1 totalment inhibida. Ha d'existir algun mecanisme que mantingui aquest malonil-CoA lluny de la CPT1, emmagatzemat o segrestat per proteïnes citoplasmàtiques.

6.3.2.- CANVIS EN LA SENSIBILITAT A MALONIL-CoA

La sensibilitat a malonil-CoA de la CPT1A pot variar en situacions metabòliques determinades. En moments on la β -oxidació es troba incrementada (dejú, diabetis...) la CPT1A esdevé més activa i menys sensible a malonil-CoA (Cook et al., 1980; Ontko et al., 1980; Robinson et al., 1982). Per contra, en presència d'insulina l'enzim es mostra més sensible a l'inhibidor (Park et al., 1995). El mecanisme exacte pel qual es donen aquests canvis és desconegut, però diferents laboratoris han implicat modificacions en l'entorn lipídic de la membrana com a possible causa de la desensibilització de l'enzim (Zammit et al., 1998). S'han realitzat experiments amb mitocondris aïllats en contacte amb lípids que mimetitzen la membrana mitocondrial externa (fosfatidilcolina i cardiolipina) i s'ha observat la necessitat de determinats compostos de membrana, encara que minoritaris com la cardiolipina, pel bon funcionament de l'enzim (revisat per Kerner et al., 2000).

INTRODUCCIÓ

Les característiques cinètiques de la CPT1A han estat determinades en diferents fraccions de la membrana mitocondrial (membrana mitocondrial externa i zones de contacte). Els resultats han indicat que, en les zones de membrana mitocondrial externa, la K_m per palmitoil-CoA és superior i la inhibició per malonil-CoA no competitiva, fent que la IC_{50} sigui menor que en les zones de contacte, sense afectar-se, en cap cas, la K_m per carnitina (Fraser et al., 2001).

FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN LA REGULACIÓ GÈNICA

1.- RECEPTORS NUCLEARS

Els receptors nuclears (NR) constitueixen una superfamília de proteïnes que funcionen com a factors de transcripció activats per lligant. Es localitzen a nivell intracel·lular i són capaços de reconèixer i unir-se a seqüències específiques del DNA presents en les regions promotores dels seus gens diana, exercint un control transcripcional sobre aquests. Juguen papers claus en el desenvolupament, l'homeòstasi cel·lular, la diferenciació i altres processos biològics (revisat per Mangeldorf et al., 1995; Desvergne et al., 1999; Giguère et al., 1999; Aranda et al., 2001; Moller et al., 2001; Smith et al., 2005; Glass et al., 2006).

Els elements de resposta dels receptors nuclears (HRE: *hormone response element* o NRRE: *nuclear receptor response element*) deriven tots d'un hexàmer consens AGGTCA on poden unir-se com a monòmers, homodímers o heterodímers, a través d'una estructura de dits de zinc. En el cas d'unir-se com a dímers, la seqüència consens AGGTCA es troba repetida, configurant-se en diferents motius estructurals, segons si la repetició és directa (DR: *direct repeat*), inversa (IR: *inverse repeat*) o eversa (ER: *everse repeat*). Aquestes repeticions poden estar, alhora, separades entre elles per cap, un o varis nucleòtids formant diferents NRRE, específic cada un d'ells per un receptor nuclear (DR1 per PPAR-RXR, DR3 per VDR, DR4 per TR, DR5 per RAR...). Els NRRE s'identifiquen per les lletres DR, IR o ER seguides del número de nucleòtids que separen els dos hexàmers (DR1, DR2, ...). Alguns NR, com els PPAR o els que s'uneixen com a monòmers, requereixen, a part de la repetició de l'hexàmer, d'una regió rica en A/T a la zona 5' de l'element de resposta per la seva unió al DNA (revisat per Desvergne et al., 1999).

Els receptors nuclears poden dividir-se en dos grans grups: receptors que uneixen hormones esteroïdals i receptors que no uneixen hormones esteroïdals. Aquests darrers presenten lligants químicament molt diversos que poden ser sintetitzats per la pròpia cèl·lula diana. Entre els receptors amb lligants no esteroïdals trobem receptors capaços de dimeritzar amb RXR com el receptor d'hormona tiroïdal (TR), el receptor de vitamina D (VDR), el receptor activat per proliferadors de peroxisomes (PPAR) i el receptor d'àcid retinoic (RAR). Existeixen també, dins la

superfamília de receptors nuclears, una sèrie de receptors de lligant desconegut anomenats receptors orfes, com el factor de transcripció del promotor de l'ovoalbúmina de pollastre (COUP-TF), el factor nuclear d'hepatòcits (HNF-4) i el receptor relacionat amb estrògens (ERR).

ESTRUCTURA

Els receptors nuclears presenten una organització estructural altament conservada formada per cinc dominis funcionals anomenats successivament A-F (Figura 10) (Desvergne et al., 1999; Chawla et al., 2001; Zhang et al., 2002; Smith et al., 2005).

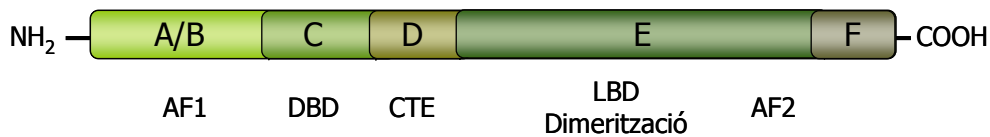


Figura 10.- Estructura dels receptors nuclears. AF-1/AF-2: Domini de transactivació-1/2; DBD: Domini d'unió a DNA. CTE: Extensió carboxi-terminal, LBD: domini d'unió a lligant.

La regió amino-terminal (A/B) és la menys conservada entre els membres de la superfamília, presenta longitud variable, conté un domini de transactivació independent de lligant (AF-1: *activation function-1*) i un lloc de fosforilació que afecta a l'activació per lligant. El domini C, per contra, és una zona altament conservada entre els receptors nuclears on es localitza el domini d'unió a DNA (DBD: *DNA binding domain*). Aquest domini està format per dos dits de zinc coordinats, cada un d'ells, a través de quatre residus cisteïna que es pleguen formant una estructura globular que reconeix els elements de resposta dels gens diana.

La regió D és la regió d'articulació. Es troba poc conservada i permet la rotació relativa dels dominis d'unió a DNA (DBD) i a lligant (LBD), fent possible que un mateix NR pugui unir-se tant a un DR com a un IR. En alguns casos, aquesta regió presenta una extensió C-terminal (CTE) del domini d'unió a DNA que participa en la unió del factor de transcripció al seu element de resposta, unint-se a la regió 5' rica en A/T. La zona E inclou el domini d'unió a lligant (LBD: *ligand binding domain*), poc conservat, el domini de transactivació dependent de lligant (AF-2: *activation function-2*), molt conservat i crític per l'activació transcripcional dels gens diana, el domini de dimerització, els dominis d'interacció amb co-reguladors i un domini de localització nuclear. La regió carboxil F no existeix en tots els receptors nuclears, presenta longitud variable i la seva funció és de moment desconeguda.

MECANISME D'ACCIÓ

En general, els receptors nuclears es troben en el nucli i units al DNA en absència de lligant, excepte un reduït grup (com alguns receptors esteroïdals) que són citoplasmàtics i es transloquen al nucli en unir-se al lligant. En tots els casos, la unió a lligant implica una sèrie de canvis conformacionals en el receptor nuclear que deixaran al descobert el domini AF-2 i canviaran l'afinitat del receptor per altres proteïnes modulant la seva capacitat transactivadora. (revisats per Glass et al., 1997; Xu et al., 1999a/b; Robyr et al., 2000; Hermanson et al., 2002) (Figura 11).

El mecanisme de transactivació dels receptors nuclears implica la participació de proteïnes co-reguladores que interaccionen, a través de motius LXXLL, amb aquests (Nolte et al., 1998). En condicions basals, en absència de lligant, molts dels receptors nuclears estudiats es troben units al DNA i associats a proteïnes co-repressores tipus N-CoR i SMRT, que atrauen histones desacetilases (HDAC) per interacció amb Sin3 i mantenen el gen reprimat (Horlein et al., 1995; Chen et al., 1995; Alland et al., 1997; Hassig et al., 1997; Heinzl et al., 1997; Nagy et al., 1997). SHARP1 també reprimeix receptors nuclears en presència i absència de lligant, a través de la interacció amb SMRT i el segrest del co-activador SRA (Shi et al., 2001).

En presència de lligant, el complex repressor es desestabilitza afavorint-se la interacció del receptor nuclear amb co-activadors tipus SRC-1 (*Sterol receptor coactivator-1*), P/CAF i CBP/p300. Aquests interaccionen amb la maquinària basal de la transcripció i acetilen les histones, gràcies a la seva activitat histona acetiltransferasa (HAT) intrínseca o al reclutament de HATs, descompactant la cromatina i activant la transcripció (Martinez-Balbás et al., 1998). El membres del complex DRIP/TRAP, com PBP/TRAP220 que interacciona amb PPAR, formen ponts entre la maquinària basal de la transcripció i els receptors nuclears.

Juntament amb el mecanisme d'acetilació/desacetilació, el balanç de metilació/desmetilació i fosforilació/desfosforilació d'histones és important per la regulació de la transcripció (Lemon et al., 2000). Els receptors nuclears també poden regular la transcripció dels seus gens diana a través de la interacció amb altres factors de transcripció de manera independent del DNA (Yang-Yen et al., 1990; Ray et al., 1994).

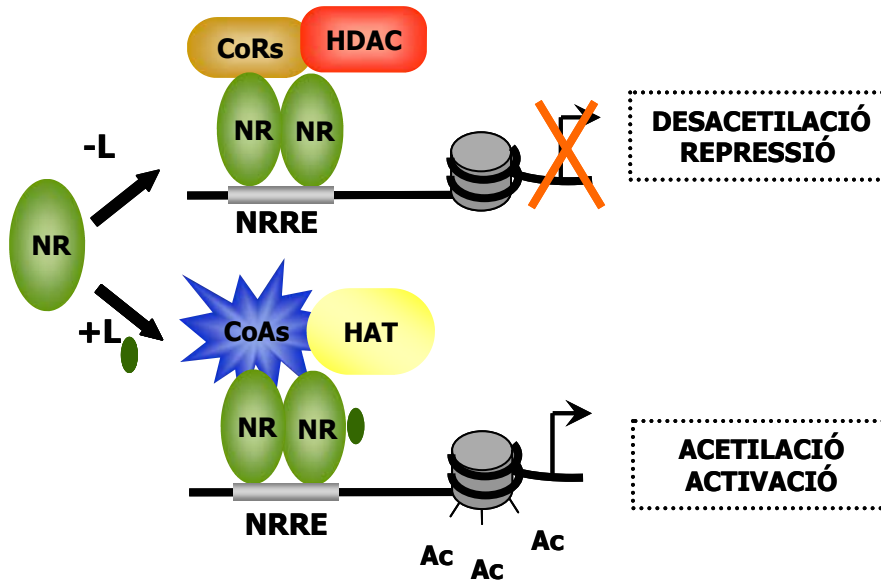


Figura 11.- Mecanisme d'acció dels receptors nuclears. En absència de lligant, molts receptors nuclears es troben units al DNA reclutant co-repressors i HDAC que mantenen la transcripció reprimida. En presència de lligant, els receptors nuclears canvien les afinitats i passen a reclutar co-activadors i HAT que activen la transcripció.

1.1- RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS DE PEROXISOMES (PPAR)

Els receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR o NR1C) són receptors nuclears implicats en la regulació de l'expressió de gens vinculats a l'homeòstasi lipídica i glucídica i a la diferenciació i proliferació cel·lular, actuant com a sensors lipídics (Desvergne et al., 1999; Willson et al., 2000; Escher et al., 2000; Chawla et al., 2001; Grimaldi et al., 2001; Kersten et al., 2002; Van Bilsen et al., 2002; Ferré et al., 2004; Desvergne et al., 2004; Smith et al., 2005).

El seu nom, PPAR, el deuen a què inicialment van descriure's com a mediadors de l'efecte de compostos sintètics que, administrats a rosegadors provocaven un increment del número i la mida dels peroxisomes hepàtics i un augment de la capacitat de metabolitzar àcids grassos per sobre-expressió de gens de la β -oxidació peroxisomal (Lazarow et al., 1985). Posteriorment, s'ha observat que aquests compostos també són capaços d'incrementar el número de mitocondris i la β -oxidació mitocondrial i que tenen efectes hipolipemiant. Entre les substàncies descrites com a proliferadores de peroxisomes destaquen el DEHP, herbicides, clofibrats i inhibidors de leucotriens. Els àcids grassos i els seus derivats eicosanoids són activadors naturals d'aquests receptors nuclears (revisat per Desvergne et al., 1999).

Fins avui s'han identificat tres isotips de PPAR: PPAR α (NR1C1), PPAR γ (NR1C3) i PPAR δ (NR1C2) amb una estructura gènica similar: un exó pels dominis A/B, dos exons pel domini d'unió a DNA, un exó pel domini D i dos exons per domini d'unió a lligant. A nivell de proteïna, s'ha definit l'estructura del domini d'unió a lligant per cristal·lografia de raigs X i està format per 13 α -hèlixs i una làmina- β que creen una butxaca que permet l'entrada de lligants hidrofòbics químicament molt diferents (Xu et al., 2001).

L'activació de gens per PPAR implica la formació d'heterodímers amb RXR (*retinoic-X-receptor*) i la unió a lligant. Es tracta d'un heterodímer permissiu que permet l'activació per lligants de qualsevol dels dos receptors i així, l'àcid 9-*cis*-retinoic pot activar gens reporters sota el control d'un PPRE a través de PPAR-RXR (Kliwer et al., 1992; Keller et al., 1993). Del receptor nuclear RXR se'n coneixen tres isotips: RXR α , RXR γ i RXR β (Mangelsdorf et al., 1992) i se sap que juga un paper dual a nivell de senyalització cel·lular, actuant com a receptor específic per ell mateix amb el 9-*cis*-retinoic com a lligant (Solomin et al., 1998) o com a parella d'altres receptors nuclears com PPAR, TR o RAR. En l'animal adult, les funcions de RXR α són desconegudes i té importància sobretot en el desenvolupament fetal, el ratolí *knockout* mor en fase embrionària. El *knockout* hepàtic de RXR α el presenta com una molècula integradora de molts processos fisiològics (Wan et al., 2000a/b) i els ratolins *knockout* dels altres dos isotips no presenten alteracions importants (Krezel et al., 1996; Kastner et al., 1996).

ELEMENT DE RESPOSTA A PPAR (PPRE)

L'element de resposta a PPAR (PPRE) és un DR1, una repetició directa imperfecta de l'hexàmer AGGTCA amb una adenina entremig (Kliwer et al., 1992), on PPAR interacciona amb l'hexàmer 5' i RXR amb el 3' (Ijpenberg et al., 1997). La unió dels heterodímers PPAR/RXR al DNA requereix, a més a més, d'una extensió 5' rica en A/T (Palmer et al., 1995; Juge-Aubury et al., 1997; Osada et al., 1997; Ortiz et al., 1999) que ha de ser reconeguda pel CTE de PPAR (Hsu et al., 1998). La seqüència consens descrita pel PPRE és, segons aquestes dades, 5'-AATC AGNCA A AGGTCA-3'.

Els elements PPRE poden trobar-se en les dues cadenes de DNA en orientacions diferents i, segons la seva capacitat d'unir PPAR-RXR, es poden classificar en forts, mitjans i dèbils, diferències que es correlacionen amb la conservació de l'element (Juge-Aubury et al., 1997). En

tots els casos, PPAR γ és el que s'uneix amb més força i més independentment de la regió 5' que per contra, és molt important per PPAR α . També l'isotip RXR marca la capacitat d'unió, sent més forta per heterodímers amb RXR γ i menys per heterodímers amb RXR α (Desvergne et al., 1999). Aquestes diferències d'afinitat podrien explicar, en part, els efectes sobre gens diferents dels diferents isotips de PPAR.

REGULACIÓ I CONTROL

Els PPARs són fosfoproteïnes que veuen afectada la seva capacitat transactivadora per mecanismes de fosforilació i desfosforilació (Camp et al., 1997; Camp et al., 1999; Juge-Aubry et al., 1999; Gelman et al., 2005). La insulina estimula la fosforilació de posicions del domini A/B de PPAR α per MAPK incrementant la seva activitat (Shalev et al., 1996; Juge-Aubry et al., 1999) i residus del DBD s'han descrit com a substrat de la PKA (Lazennec et al., 2000). També s'han descrit processos de sumoïlació i acetilació en la regulació de l'activitat de PPAR.

El reclutament de co-reguladors es dona amb PPAR tal i com s'ha explicat anteriorment. Fins fa poc, s'havia considerat que els co-repressors N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) i SMRT (*Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*) no podien interaccionar amb l'heterodímer PPAR:RXR per manca domini CoR box en els PPAR (DiRenzo et al., 1997; Zamir et al., 1997a/b). Recentment, aquesta idea ha estat desplaçada per una sèrie de publicacions que descriuen pels PPAR el mecanisme de repressió via N-CoR i SMRT descrit per altres receptors nuclears (Oberfield et al., 1999; Krogsdam et al., 2002; Yu et al., 2005). RIP-140 (*receptor interacting protein-140*) també ha estat inclòs entre els co-repressors de PPAR (Miyata et al., 1998; Dowell et al., 1999).

En relació als co-activadors, els PPAR interaccionen amb SRC-1 a través del LBD (dos dominis LXXLL) (Zhu et al., 1996), de manera dependent de lligant. Aquesta interacció sembla essencial per l'activació transcripcional via PPAR γ (Zhu et al., 1996; DiRenzo et al., 1997) però no via PPAR α (Qi et al., 1999). CBP/p300 també és capaç d'interaccionar amb el LBD dels PPARs en presència de lligant (Chakravarti et al., 1996). Altres co-reguladors descrits són PGC-1, PBP (*PPAR binding protein*) (Zhu et al., 1997) i TRAP220 (*Thyroid hormone receptor associated protein-220*).

ASPECTES FISIOPATOLÒGICS DELS PPARS

Existeixen evidències clares que relacionen els PPAR amb processos patològics com l'obesitat, la diabetis, la dislipèmia, l'arteriosclerosi, la resposta inflamatòria i el desenvolupament i la proliferació tumoral.

1.1.1.- PPAR α (ALFA)

CARACTERÍSTIQUES GENERALS

PPAR α és un receptor nuclear que regula el metabolisme lipídic. Actuant com a factor de transcripció controla l'expressió de gens implicats en la captació i oxidació mitocondrial i peroxisomal d'àcids grassos i en el catabolisme de TG. La seva expressió es concentra, sobretot, a teixits metabòlicament actius com fetge, ronyó, cor, múscul, intestí i pàncrees, tot i que també es detecta a placenta, pulmó i teixit adipós (Braissant et al., 1996; Auboeuf et al., 1997). El seu gen humà mapeja en el locus cromosòmic 22q12-q13.1 (Sher et al., 1993).

A nivell transcripcional, PPAR α és regulat a través de senyals hormonals i nutricionals. La seva expressió és activada pel dejú (Leone et al., 1999; Kersten et al., 1999) i controlada pel ritme circadiari (Lemberger et al., 1996), a través d'un efecte positiu dels glucocorticoides (Steineger et al., 1994; Lemberger et al., 1994) i Bmal1 (Oishi et al., 2005). L'expressió de PPAR α també es veu afectada per molècules com la leptina, l'hormona del creixement o la insulina (Steineger et al., 1994; Zhou et al., 1998; Jalouli et al., 2003) i el seu promotor respon a PPAR α i HNF-4 (Pineda et al., 2002).

PPAR α també està sotmès a un control post-traducciona l on lligants com Wy-14643 i GW-7647 augmenten la vida mitja del receptor impeding la seva ubiquitinització i degradació peroxisomal (Blanquart et al., 2002). Co-reguladors com SRC-1, CBP/p300, PBP/TRAP220 i PGC-1 són capaços d'interaccionar amb PPAR α (Puigserver et al., 1998; Vega et al., 2000; Barger et al., 2000). La insulina activa el factor per fosforilació del domini A/B.

Com a lligants naturals de PPAR α s'han assenyalat diversos àcids grassos saturats i insaturats com l'àcid palmític, l'àcid oleic, l'àcid linoleic i l'àcid araquidònic i els seus derivats eicosanoids com el leucotriè B4 (LTB4), amb afinitats pel receptor en el rang micromolar.

(Banner et al, 1993; Yu et al., 1995; Devchand et al., 1996; Forman et al., 1997; Kliewer et al., 1997; Xu et al., 1999a; Hostetler et al., 2005). En qualsevol cas, no està clar si les concentracions fisiològiques cel·lulars lliures dels àcids grassos o dels eicosanoids són suficients per activar PPAR α .

A nivell sintètic, els fibrats són el grup més gran de lligants de PPAR α . Descrits inicialment com a hipolipemians, presenten una afinitat pel receptor del rang micromolar. Alguns presenten activitat sobre els tres isotips (bezafibrat) i altres, tot i tenir més afinitat per PPAR α , també activen PPAR γ (clofibrat i fenofibrat). Wy-14643 és el més específic. Darrerament, s'han desenvolupat lligants més específics de PPAR α efectius a concentracions nanomolars com GW-9578 i GW-7647.

FUNCIONS BIOLÒGIQUES

L'estudi de ratolins que no expressen PPAR α ha revelat que aquest receptor és el mediador principal de la resposta a proliferadors peroxisomals a nivell hepàtic (Peters et al., 1996), però no de la biogènesi de peroxisomes. La manca de PPAR α no implica una disminució en el número total de peroxisomes hepàtics, però sí una falta de resposta al tractament amb proliferadors de peroxisomes.

PPAR α és un dels reguladors principals de l'expressió de gens implicats en la β -oxidació mitocondrial i peroxisomal, en la captació d'àcids grassos i en l'ensamblatge i transport de lipoproteïnes (revisat per Lefebvre et al., 2006). El seu efecte en el fetge, i en altres teixits, és la reducció de les concentracions intracel·lulars d'àcids grassos (Lee et al., 1995; Peters et al., 1997; Djouadi et al., 1998; Aoyama et al., 1998; Leone et al., 1999).

A nivell del metabolisme lipídic hepàtic, PPAR α regula la CPT1 (Mascaró et al., 1998; Brandt et al., 1998; Yu et al., 1998b; Napal et al., 2005), la CPT2 (Barrero et al., 2003) i els principals enzims de les reaccions de la β -oxidació mitocondrial (ACS, LCAD, MCAD i 3-cetoacil-CoA tiolasa) i peroxisomal (ACO: acil-CoA oxidasa i HD: la tiolasa bifuncional: enoil-CoA hidratasa/3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) (Dreyer et al., 1992; Tugwood et al., 1992; Marcus et al., 1993; Gulick et al., 1994; Van der Lee et al., 2000). PPAR α també regula la cetogènesi, controlant l'expressió de l'HMG-CoA sintasa mitocondrial (Rodríguez et al., 1994) i el desacoblament mitocondrial i la termogènesi, a través de l'activació d'UCP (*uncoupling protein*) en les seves tres

isoformes (Kelly et al., 1998; Cabrero et al., 1999; Barbera et al., 2001). S'ha descrit que agonistes específics de PPAR α estimulen la β -oxidació mitocondrial *in vivo*, tant a nivell muscular com hepàtic.

Pel que fa al transport lipídic, en el teixit hepàtic, PPAR α incrementa l'expressió de les proteïnes transportadores FATP, FAT/CD36, FABP i ACS (Schoonjans et al., 1995; Martin et al., 1997; Motojima et al., 1998; Van der Lee et al., 2000; Sato et al., 2002).

PPAR α juga un paper important en la funció cardíaca. Ratolins deficients en aquest receptor presenten nivells molt baixos dels enzims de la β -oxidació i tenen molt incrementada l'oxidació de la glucosa (Lee et al., 1995; Peters et al., 1997). En aquests ratolins el dejú no indueix els gens del metabolisme lipídic, acumulen grassa a nivell hepàtic i cardíac, tenen alterada la producció de cossos cetònics i mostren hipoglucèmia i hipotèrmia (Djouadi et al., 1998; Kersten et al., 1999). En el múscul esquelètic, les alteracions d'aquests animals en resposta al dejú són mínimes i s'ha proposat que aquest fet reflecteix la capacitat de PPAR δ de compensar la falta de PPAR α (Muoio et al., 2002a/b).

Per altra banda, l'activació crònica de PPAR α en el teixit cardíac mimetitzava els efectes causats per la diabetis (Finck et al., 2002). S'ha associat la disfunció ventricular i la hipertròfia cardíaca patològica a alteracions en la utilització de substrats energètics. Aquestes patologies comporten una disminució en l'oxidació d'àcids grassos per poca expressió dels gens de la β -oxidació (Barger et al., 2000; Sack et al., 1996; Sack et al., 1997) i un increment de la glucòlisi per produir energia (Christie et al., 1994; Taegtmeyer et al., 1988), que es podrien explicar per una caiguda dels nivells de PPAR α en el teixit cardíac.

Finalment, s'ha observat que els ratolins deficients en PPAR α tenen una resposta inflamatòria perllongada quan es tracten amb leucotriè B₄ (LTB₄), que correlaciona amb una disminució de la degradació d'aquest. S'apunta que PPAR α podria estar implicat en el catabolisme de LTB₄ (Devchand et al., 1996). PPAR α participa també, en l'homeòstasi de la glucosa i en el metabolisme de les lipoproteïnes, reduint la producció de TG, incrementant la lipòlisi i promovent el metabolisme de HDLs i el transport revers de colesterol.

1.1.2.-PPAR DELTA (PPAR δ)

CARACTERÍSTIQUES GENERALS

PPAR δ és un receptor nuclear d'expressió ubiqua i elevada, per sobre dels altres dos isotips en alguns teixits (Braissant et al., 1996; Braissant et al., 1998). El seu gen humà mapeja en el locus cromosòmic 6p21.1-21.2 (Yoshikawa et al., 1996) i es desconeixen encara els mecanismes de regulació de la seva expressió. S'ha vist que la seva activitat transcripcional incrementa quan és fosforilat per MAPK o PKA (Lazennec et al., 2000; Hansen et al., 2001; Gelman et al., 2005).

Com a lligants naturals s'han descrit els àcids grassos saturats i insaturats i alguns derivats eicosanoids com les prostaglandines A1 i D2 i la prostaciclina (Yu et al., 1995; Forman et al., 1997; Krey et al., 1997; Xu et al., 1999a;). A nivell sintètic, s'han generat lligants selectius poc afins com L-165,041, lligants selectius i potents com GW501516, així com molècules sintètiques que activen els tres isotips (L-796446 i L-783483) o a PPAR α i PPAR δ (GW-2433) (Willson et al., 2000; Berger et al., 2002).

FUNCIONS BIOLÒGIQUES

Entre les funcions de PPAR δ destaquen la maduració epidèrmica, el metabolisme del múscul esquelètic, del teixit adipós, del teixit ossi i de les lipoproteïnes (Michalik et al., 2000; Peters et al., 2000; Chawla et al., 2003; Grimaldi et al., 2003), la diferenciació adipocitària (Bastie et al., 1999; Hansen et al., 2001), el desenvolupament cerebral (Xing et al., 1995), la implantació uterina (Lim et al., 1999) i un paper antiproliferatiu en càncer de còlon (He et al., 1999; Barak et al., 2002). Estudis amb ratolins deficients per PPAR δ i amb animals que sobre-expressen el receptor han permès descriure més concretament els efectes metabòlics d'aquest factor (revisat per Barish et al., 2006).

S'han generat ratolins que no expressin PPAR δ i ratolins deficients en PPAR δ en el teixit adipós. En el primer dels casos, tot i que la majoria moren en etapes embrionàries, els que sobreviuen neixen amb una massa grassa reduïda, a diferència dels teixit-específic que no presenten aquest fenotip. Aquests resultats indiquen mecanismes independents al teixit adipós en la regulació global del metabolisme lipídic per part de PPAR δ . (Peters et al., 2000, Michalik et al., 2000).

I, s'han generat animals que expressen una forma constitutivament activa del receptor en el teixit adipós. Aquests rosegadors, sotmesos a una dieta normal, presenten, respecte els animals salvatges, una reducció del pes corporal, dels dipòsits de grassa inguinals, de TG i d'àcids grassos circulants. I, sotmesos a una dieta rica en grasses, l'expressió del PPAR δ actiu els protegeix de l'obesitat, de la hipertròfia adipocitària, de la hipertrigliceridèmia i de l'esteatosi (Wang et al., 2003). Tots aquests efectes es deuen a l'increment de l'expressió de gens implicats en la hidròlisi de TG (lipasa sensible a hormona), en l'oxidació d'àcids grassos (ACS, VCAD, ACO) i en el desacoblament de la fosforilació oxidativa (UCP1, UCP-3).

Per altra banda, el tractament de ratolins *db/db* amb agonistes de PPAR δ (GW501516) provoca efectes similars a la sobre-expressió de la forma activa del receptor (Leibowitz et al., 2000; Oliver et al., 2001), a més a més de disminuir els nivells d'insulina plasmàtica en dejú. Els resultats de diversos treballs indiquen que el múscul esquelètic seria el potencial teixit diana d'aquests efectes (Tanaka et al., 2003; Wang et al., 2003).

L'expressió d'una forma de PPAR δ constitutivament activa a múscul esquelètic i el tractament d'animals o de cèl·lules musculars en cultiu (C2C12 o L6E9) amb agonistes del receptor incrementen l'expressió de gens relacionats amb la β -oxidació (ACS, CPT1), la respiració mitocondrial (UCP), el metabolisme oxidatiu i el sistema de contracció de fibres musculars lentes (Tanaka et al., 2003; Solanes et al., 2003; Gilde et al., 2003; Dressel et al., 2003; Wang et al., 2004; Abbot et al., 2005). Nombrosos treballs han demostrat que l'agonista GW501516 i l'expressió específica de PPAR δ a múscul esquelètic protegeixen de l'obesitat induïda per la dieta, evitant la hipertròfia adipocitària, l'esteatosi hepàtica i l'acumulació de lípids a nivell muscular i millorant el metabolisme basal i l'oxidació lipídica. En aquests casos, el múscul esquelètic mostra un increment en el número de mitocondris i una més elevada proporció de fibres musculars oxidatives. (Luquet et al., 2003; Tanaka et al., 2003; Wang et al., 2004).

PPAR δ ha estat implicat en el catabolisme dels àcids grassos a múscul esquelètic a partir dels resultats obtinguts en ratolins deficientes per PPAR α en aquest teixit. En aquests animals, PPAR δ sembla que és capaç de compensar la manca de PPAR α , mantenint la inducció de gens clàssicament regulats per aquest. El tractament amb agonistes de PPAR δ incrementa la β -oxidació i indueix l'expressió de gens regulats per PPAR α a múscul esquelètic, indicant una redundància de funcions entre els dos isotips.

En el múscul esquelètic, PPAR δ és l'isotip més abundant i s'expressa, sobretot, en fibres de tipus I (oxidatives, riques en mitocondris, lentes) (Braissant et al., 1996; Wang et al., 2004). L'exercici físic continuat promou la conversió de les fibres musculars del tipus II (glucolítiques, ràpides) al tipus I (oxidatives i lentes) i un increment dels nivells de PPAR δ , que comporta increments en l'expressió de gens del catabolisme lipídic (Luquet et al., 2003). El dejú també indueix l'expressió de PPAR δ a nivell muscular i provoca l'activació de gens implicats en el transport d'àcids grassos (FAT/CD36) i l'entrada d'aquests al mitocondri (CPT1B) (Holst et al., 2003).

A nivell cardíac, la deleció específica de PPAR δ suprimeix l'expressió dels gens oxidatius i augmenta l'oxidació de glucosa provocant un augment d'àcids grassos i de la lipotoxicitat. Amb tot això, disminueix la relació contracció/relaxació del múscul cardíac, augmenta la pressió ventricular i disminueix la sortida de sang, apareixent hipertròfia i augmentant el risc de fallada (Cheng et al., 2004a/b).

En un altre sentit, a través d'experiments de co-transfecció, s'ha classificat PPAR δ com un inhibidor de la inducció dependent de lligant de PPAR α i PPAR γ . PPAR δ és capaç de desplaçar els altres dos isotips de les seqüències reguladores del DNA i d'interaccionar amb co-repressors com SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*), SHARP (SMRT i *Histone deacetylase-associated repressor protein*), NcoR o histones desacetilases (HDAC) (Shi et al., 2002), interaccions que disminueixen en presència de lligant. L'expressió de manera estable de PPAR δ en cèl·lules NIH-3T3-PPAR α o NIH-3T3-PPAR γ inhibeix l'expressió de gens activats per PPAR α o PPAR γ , respectivament (Shi et al., 2002).

1.1.3.- PPAR GAMMA (PPAR γ)

CARACTERÍSTIQUES GENERALS

El gen humà que codifica per PPAR γ mapeja en el locus cromosòmic 3p25 (Greene et al., 1995). Per l'ús de promotors diferents i processament alternatiu dels mRNA s'han descrit tres isoformes del receptor: PPAR γ 1, PPAR γ 2 i PPAR γ 3 (Fajas et al., 1997; Fajas et al., 1998). A nivell tissular, l'expressió en rates és troba reduïda, principalment, a teixits adipós blanc i marró, còlon, cec i melsa i en menor proporció, a intestí prim, retina i múscul esquelètic (Braissant et al., 1996; Braissant et al., 1998). En humans, PPAR γ 1 i PPAR γ 2 s'expressen fortament en teixit

adipós i en múscul esquelètic i PPAR γ 1 també en cor i fetge (Auboeuf et al., 1997; Mukherjee et al., 1997).

En rates i ratolins, l'expressió de PPAR γ 1 i 2 és regulada per la dieta, es troba reprimida per dejú i diabetis depenent d'insulina i induïda, en el teixit adipós, per dietes riques en grasses (Vidal-Puig et al., 1996). *In vitro*, la insulina i els corticosteroides augmenten l'expressió de PPAR γ (Vidal-Puig et al., 1997) mentre que TNF α la disminueix (Zhang et al., 1996), en adipòcits en cultiu.

Com a lligants naturals s'han descrit els àcids grassos saturats i insaturats, com l'àcid linoleic, l'àcid linolènic, l'àcid araquidònic i l'àcid icosapentanoic i alguns dels seus metabòlits eicosanoids, com la prostaglandina D2 (PGD2) i la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 (15d-PGJ2), capaços d'activar el receptor a concentracions micromolars (Kliewer et al., 1995; Forman et al., 1995; Yu et al., 1995; Xu et al., 1999a; revisat per Berger et al., 2002).

A nivell sintètic s'han dissenyat les tiazolidindiones (TZD) (Lehmann et al., 1995), rosiglitazona, la troglitazona i la pioglitazona, que s'utilitzen farmacològicament com a antidiabètics (revisat per Berger et al., 2002). El fet que la seva afinitat per PPAR γ sigui paral·lela a la seva potència normogluceuant i que la seva acció depengui de regions de DNA descrites com a elements d'unió a PPAR γ evidencia que el mecanisme d'acció de les TZD implica aquest receptor nuclear. Algunes TZD tenen activitat dual sobre α i γ (Murakami et al., 1998; Shibata et al., 1999).

Altres lligants més selectius i més potents per la transactivació de PPAR γ (GW1929; GW7845; GI262570) s'han desenvolupat a partir de l'estructura i del mecanisme d'interacció del receptor amb les TZD. Altres compostos no relacionats amb les TZD que també uneixen PPAR γ són LY-171883 (derivat de LTB4), alguns AINE com la indometacina o l'ibuprofè i el GE-0207 (revisat per Willson et al., 2000). En el cas de PPAR γ existeixen també antagonistes com el BADGE (Wright et al., 2000) i el GE0072 (Oberfield et al., 1999) que interaccionen amb residus diferents del LBD.

FUNCIONS BIOLÒGIQUES

Individus amb mutacions en el gen de PPAR γ presenten lipodistròfia, resistència a insulina, diabetis mellitus tipus 2 i hipertensió (Barroso et al., 1999; Savage et al., 2002; Savage et al., 2003; Agostini et al., 2004). El ratolí homozigòtic deficient en PPAR γ demostra que aquest receptor és essencial en el desenvolupament placental, cardíac i adipós i mor en etapes embrionàries (revisat per Semple et al., 2006).

PPAR γ té un paper fonamental en l'adipogènesi, on la seva expressió és màxima (Chawla et al., 1994). És un factor clau en la diferenciació adipocitària i en la formació de dipòsits lipídics, els seus lligants indueixen la transició de pre-adipòcits a adipòcits i la seva expressió precedeix a la de marcadors de diferenciació adipocitària com aP2 (Sandouk et al., 1993; Chawla et al., 1994; Tontonoz et al., 1994a/b; Kersten et al., 2002; Gerhold et al., 2002). En el teixit adipós, PPAR γ regula gens relacionats amb el metabolisme lipídic: *FATP-1*, *FAT/CD36*, (Martin et al., 1998; Motojima et al., 1998; Sato et al., 2002) *FABP*, *ACBP* (Poirier et al., 1997), *ACS* (Schoonjans et al., 1995; Martin et al., 1997) i amb l'homeòstasi energètica incrementant l'expressió de les proteïnes desacobladores UCP-1, UCP-2 i UCP-3 (Kelly et al., 1998). PPAR γ disminueix l'expressió de leptina, que actua inhibint la ingesta i augmentant el catabolisme lipídic (Kallen et al., 1996; De Vos et al., 1996), i que explicaria l'increment dels dipòsits lipídics observat en individus tractats amb agonistes de PPAR γ .

Malgrat la importància de PPAR γ a nivell adipocitari hi ha evidències que suggereixen que l'efecte de les TZD se centraria en el múscul esquelètic (Burant et al., 1997; Kausch et al., 2001). Malgrat la baixa expressió del receptor (Loviscach et al., 2000), el teixit muscular és el que més utilitza el transport de glucosa mediat per insulina. *In vitro*, les TZDs milloren la captació de glucosa dependent d'insulina en cèl·lules musculars en cultiu, estimulant l'activitat PI3K i la translocació de GLUT4 (Yonemitsu et al., 2001; Cha et al., 2001; Kausch et al., 2001; Ciaraldi et al., 2002). Diferents laboratoris han generat ratolins deficients en PPAR γ obtenint resultats discordants. En un dels treballs, els ratolins presenten una severa resistència a insulina a nivell de múscul esquelètic refractària al tractament amb TZDs i en l'altre, la disponibilitat de glucosa a múscul és normal (Norris et al., 2003; Hevener et al., 2003). En el teixit adipós, el tractament amb TZD incrementa els nivells d'adiponectina (Maeda et al., 2001; Yang et al., 2002; Combs et al., 2002), una adipocitocina que sobre-expressada provoca una redistribució del teixit adipós i una sensibilització a la insulina (Combs et al., 2004).

PPAR γ activa, en el múscul esquelètic, l'expressió de gens com UCP-2, UCP-3, IRS-1-2 i C/EBP α (Son et al., 2001; López-Solache et al., 2002a/b; Hammarstedt et al., 2003) i s'ha associat a factors com el TNF α (Hofmann et al., 1994). PPAR γ també ha estat implicat en la inhibició de processos inflamatoris (Jiang et al., 1998).

2.-PGC-1(PPAR γ COACTIVATOR-1)

PGC-1 α va ser identificat en el teixit adipós marró a través de la seva interacció funcional amb PPAR γ i va ser descrit com un co-activador induïble pel fred (Puigserver et al., 1998). Posteriorment, han estat aïllats dos co-activadors relacionats amb aquest: PGC-1 β (Lin et al., 2002a; Meirhaeghe et al., 2003) i PRC (*PGC-1 related protein*) (Andersson et al., 2001; Kressler et al., 2002). PGC-1 α i PGC-1 β s'expressen en teixits amb una elevada capacitat oxidativa: cor, múscul esquelètic i teixit adipós marró, on juguen papers claus en la capacitat mitocondrial i el metabolisme energètic (Puigserver et al., 1998; Wu et al., 1999; Lin et al., 2002b; Kamei et al., 2003; St. Pierre et al., 2003; revisat per Finck et al., 2006).

A nivell estructural, els tres factors presenten una organització molt similar factors amb diferents dominis funcionals, una regió rica en prolines i una altra rica en leucines importants per la interacció amb diferents factors de transcripció (Figura 12). Els receptors nuclears interaccionen a través del dominis de leucines.

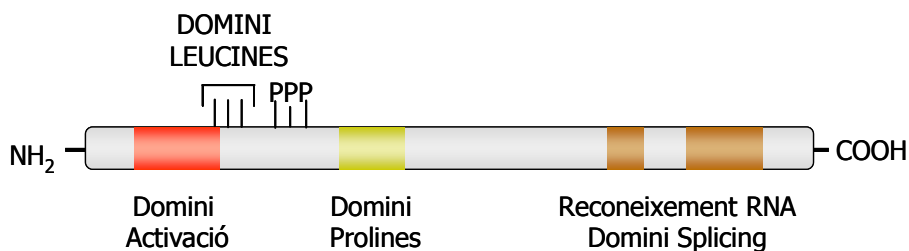


Figura 12.- Estructura de PGC-1 α : Esquema de l'estructura de PGC-1 α on s'indiquen els diferents dominis funcionals de la proteïna, així com les regions riques en prolines i leucines i els residus fosforilables per MAPK.

PGC-1 actua sobre l'expressió gènica a través de diferents factors de transcripció entre els quals s'inclouen alguns receptors nuclears. El seu mecanisme de transactivació implica el reclutament de proteïnes co-reguladores amb les que interacciona per modular l'activitat transcripcional dels seus gens diana. La regió amino de la proteïna és capaç d'interaccionar amb proteïnes amb activitat histona acetiltransferasa (HAT) com CBP/P300 o SRC-1 (Puigserver et

al., 1999), mentre que la seva regió carboxil interacciona amb el complex activador TRAP/DRIP (*Thyroid hormone receptor associated protein/vitamin D receptor interacting protein*) (Wallberg et al., 2003). Entre els seus efectes destaca la biogènesi mitocondrial, l'augment de la respiració cel·lular i la captació i ús de substrats energètics, efectes tots ells, encaminats a preparar la cèl·lula per assumir les demandes energètiques de cada situació.

En el teixit cardíac, PGC-1 α controla les vies metabòliques. S'indueix en el naixement, quan el cor passa a tenir la β -oxidació d'àcids grassos com a principal font d'energia, i en situacions d'estrès com el dejú (Lehman et al., 2000). PGC-1 α coactiva amb PPAR α i ERR α l'expressió de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos i en la respiració mitocondrial (Huss et al., 2004) i la seva sobre-expressió en cardiomiòcits en cultiu activa la biogènesi de mitocondris (Lehman et al., 2000). La co-activació de PPAR α per PGC-1 α és dependent de lligant i implica regions diferents a les descrites per la unió amb PPAR γ (Vega et al., 2000), requereix del domini AF-2 de PPAR α i d'un domini LXXLL de PGC-1 α . PGC-1 α és un regulador clau en la biogènesi mitocondrial (Puigserver et al., 1998) i interacciona amb NRF-1, regulant positivament gens implicats en el desenvolupament de la cadena respiratòria (Wu et al., 1999). PGC-1 coordina l'increment de la capacitat de la cadena respiratòria, a través de NRF-1 i l'increment de la β -oxidació, via una interacció funcional amb PPAR α (revisat per Finck et al., 2006).

En el múscul esquelètic, PGC-1 α s'expressa sobretot en fibres musculars oxidatives. S'ha observat que la seva sobre-expressió muscular augmenta la proporció d'aquest tipus de fibres (Lin et al., 2002b) i que l'entrenament incrementa els nivells de PGC-1 α (Goto et al., 2000; Baar et al., 2002; Terada et al., 2005; Taylor et al., 2005), indicant que aquest factor funciona com un mediador en l'adaptació metabòlica i estructural d'aquest teixit. Estudis recents han implicat PGC-1 α en la regulació del metabolisme de la glucosa, incrementant l'expressió del transportador GLUT-4 en cultius de cèl·lules musculars a través de MEF-2C (Michael et al., 2001). Paral·lelament, PGC-1 α també és capaç de reprimir l'oxidació de la glucosa, activant l'expressió de la piruvat cinasa deshidrogenasa-4 (PK-4) via ERR α (Wende et al., 2005). Segons aquests resultats, PGC-1 α controlaria la selecció muscular de substrat energètic incrementant o disminuint l'oxidació d'àcids grassos i glucosa.

A nivell hepàtic, les expressions basals de PGC-1 α i β són molt baixes i els seus nivells s'indueixen fortament per dejú (Yoon et al., 2001; Herzig et al., 2001). Ambdós factors poden activar l'expressió de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos (Yoon et al., 2001; Lin et al.,

2003; Koo et al., 2004) i la sobre-expressió de PGC-1 α incrementa la transcripció de gens gluconeogènics, a través de FOXO1 i HNF-4 α (Yoon et al., 2001; Puigserver et al., 2003; Rhee et al., 2003). SIRT1 exerceix un paper important sobre l'expressió de gens gluconeogènics desacetilant i activant PGC-1 α (Rodgers et al., 2005). Pel que fa a la biosíntesi lipídica, aquesta és regulada per PGC-1 α a través de LXR (Liver X receptor), que modula l'expressió de SREBP (Horton et al., 2002; Oberkofler et al., 2004) i per PGC-1 β que, mitjançant una regió no conservada entre la resta de membres de la família de PGC, és capaç d'activar gens implicats en la lipogènesi i en la secreció de TG per interacció amb el factor de transcripció SREBP1c (Lin et al., 2005).

Estudis recents, han relacionat alteracions en la senyalització de PGC-1 α amb intolerància a la glucosa, resistència a la insulina i diabetis. El seu paper protector o inductor de la patologia no està clar tenint en compte que els seus efectes varien entre teixits. A nivell de múscul esquelètic, PGC-1 α actua com a factor protector en el desenvolupament de resistència a insulina. Activa la translocació de GLUT4 (Michael et al., 2001), la seva sobre-expressió protegeix de l'obesitat induïda per la dieta i de la resistència a la insulina (Kamei et al., 2003) i és crític pel bon funcionament mitocondrial, havent-se relacionat deficiències mitocondrials hereditàries amb la diabetis. Per contra, en el teixit hepàtic, la seva expressió es troba augmentada en models animals de diabetis tipus 2, provocant l'activació constitutiva de la gluconeogènesi i de l'oxidació lipídica, a través de HNF4, PPAR α i CREB (Vega et al., 2000; Yoon et al., 2001; Herzig et al., 2001; Louet et al., 2002; Rhee et al. 2003). Ratolins deficients en PGC-1 α al fetge presenten hipoglucèmia al dejuni i una sensibilitat a insulina augmentada (Koo et al., 2004). En el pàncrees, la sobre-expressió de PGC-1 α suprimeix la secreció d'insulina (Yoon et al., 2003).

3.- FACTORS MIOGÈNICS

Els membres de les famílies MyoD i MEF-2 són proteïnes essencials durant la miogènesi. Com a factors de transcripció regulen l'expressió gènica múscul-específica i el procés de diferenciació cel·lular en aquest teixit. Els seus elements de resposta en els promotors dels seus gens diana es localitzen, sovint, en regions pròximes, indicant un mecanisme cooperatiu en l'activació transcripcional (Fickett et al., 1996b; Molkentin et al., 1998a). *In vitro*, MEF-2C i MyoD interaccionen físicament i experiments amb construccions reportereres d'E-box i llocs d'unió a MEF mostren una activació sinèrgica dels promotors per aquests factors (Molkentin et al., 1995).

3.1.- MRFS O FAMÍLIA MyoD (Myoblast differentiation)

Els MRFs són factors de transcripció bHLH (*basic helix-loop-helix*) de classe II (teixit-específics). Pertanyen a la superfamília de proteïnes bHLH on s'inclouen reguladors transcripcionals de la proliferació i diferenciació cel·lular (Kingston et al., 1989; Berkes et al., 2005). La família MyoD (revisada per Weintraub et al., 1991a; Edmondson et al., 1993; Yun et al., 1996; Arnold et al., 1998; Puri et al., 2000) consta de quatre membres codificats per gens diferents: MyoD (Wright et al., 1989), miogenina (Edmondson et al., 1989), Myf5 (Braun et al., 1989) i MRF4/herculin/Myf6 (Rhodes et al., 1989). La sobre-expressió d'un d'ells és suficient per activar la diferenciació muscular de línies cel·lulars o cultius primaris no musculars i tot ells són capaços d'activar la seva pròpia expressió (Thayer et al., 1989; Edmondson et al., 1992). En la diferenciació muscular, Myf5 i MyoD actuen en les primeres fases de la determinació mioblàstica i miogenina activa la diferenciació terminal.

ESTRUCTURA

Les proteïnes de la família MyoD presenten dominis de transactivació en els seus dos extrems amb activitat independent de teixit. Aquests dominis poden regular la transcripció gènica en cultius cel·lulars musculars i no musculars, fusionats al domini d'unió a DNA de Gal-4 (Braun et al., 1990; Weintraub et al., 1991b; Schwarz et al., 1992). A la regió central de la proteïna trobem el domini bHLH que identifica la família. Estructuralment, el domini bHLH consta d'una regió bàsica, important en el control de l'expressió muscular, que mitjança la unió a DNA i que confereix especificitat a l'activació transcripcional i una zona *helix-loop-helix* que inclou el domini d'unió a DNA i el de dimerització (Figura 13).

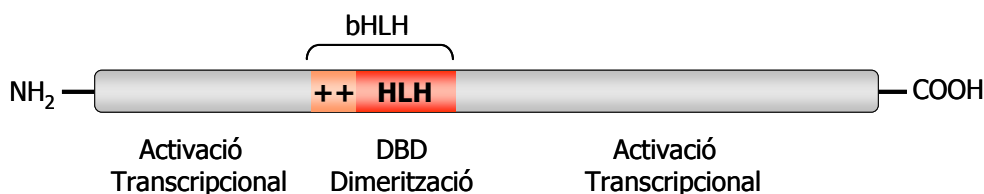


Figura 13.- Estructura de les proteïnes de la família MyoD. Els extrems amino i carboxil presenten el domini de transactivació i la regió central inclou un domini bàsic (++) i la zona d'hèlix-loop-hèlix (HLH) que identifica als membres de la família. (Adaptat d'Edmondson et al., 1993).

Entre els residus aminoàcids del domini bàsic destaca el triplet Alanina-Treonina-Lisina (ATK), conservat entre els membres de la família MyoD, però absent a la resta de proteïnes bHLH i que es coneix com a motiu de reconeixement miogènic. Aquest triplet és essencial perquè es produeixi el canvi conformacional del domini transactivador amino de la proteïna, un cop aquesta es troba unida al DNA (Huang et al., 1998) i és el que habilita als factors de transcripció MyoD per activar gens múscul-específics (Davis et al., 1990; Brennan et al., 1991; Davis et al., 1992).

UNIÓ A DNA (E-box)

Les proteïnes MRF poden unir-se al DNA com a homodímers o com a heterodímers a través d'un element de resposta anomenat E-Box que presenta com a seqüència consens l'hexàmer CANNTG (Buskin et al., 1989, Lassar et al., 1989). Cal destacar, que tot i que els dos tipus de dímers són estables (Maleki et al., 1997) i capaços d'unir-se al DNA, l'activació transcripcional de gens només es dona en presència d'heterodímers amb proteïnes de la família E (E12/E47) (Murre et al., 1989; Lassar et al., 1991). Les proteïnes E12/E47 són proteïnes dels tipus bHLH de classe I. Presenten una expressió ubíqua i són fruit de processaments alternatius del gen E2A.

REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT

Diferents estudis demostren que el context de promotor on es troba l'E-box és important per la capacitat transactivadora de MyoD i que no existeix relació directa entre aquelles seqüències que uneixen amb més força el factor i una major capacitat transactivadora (Huang et al., 1996). L'estudi de l'estructura cristal·lina de MyoD descriu residus de la proteïna que interaccionen amb zones 5'-flanquejants de l'E-Box (Ma et al., 1994) i que podrien ser importants per un bon reconeixement i funcionament de l'element de resposta (Weintraub et al., 1994).

Un dels principals mecanismes de regulació de l'activitat transcripcional de MyoD implica les proteïnes E, que són capaces d'interaccionar amb una àmplia varietat de factors com Id, Twist, MyoR i Mist-1.

La família de proteïnes Id consta de quatre membres: Id1, Id2, Id3 i Id4 (Benezra et al., 1990; Sun et al., 1991; Christy et al., 1991; Neuhold et al., 1993; Riechmann et al., 1994; revisat per Melnikova et al., 1999) que presenten un domini HLH, però són incapaces d'unir-se al DNA per

manca del domini bàsic. Actuen com a dominants negatius dels factors de la família MyoD interaccionant amb E12/E47. La seva expressió és alta durant l'embriogènesi i la proliferació cel·lular (Benezra et al., 1990; Riechmann et al., 1994) i disminueix durant la diferenciació. Twist, per la seva banda, és una proteïna HLH sense domini de transactivació i amb un domini repressor. És capaç de formar heterodímers amb E12/E47 i d'unir-se a les E-box (Hebrock et al., 1994; Spicer et al., 1996; Hamamori et al., 1997; Hebrock et al., 1997). MyoR i Mist 1 són proteïnes bHLH sense el domini de transactivació i amb un domini repressor amino-terminal. Són capaces de formar homodímers o heterodímers amb MyoD i unir-se al DNA reprimint l'activació del gen (Lemerrier et al., 1997; Lemerrier et al., 1998; Lu et al., 1999).

Altres mecanismes de regulació observats en les proteïnes MyoD inclouen la proteïna ZEB i la proteïna Mdfi. La proteïna ZEB (*zinc finger/Ebox binding*) s'uneix a determinades E-Box d'on és desplaçada per MyoD en un balanç de concentracions (Postigo et al., 1997). Mdfi és una proteïna citoplasmàtica sense domini bHLH que impedeix la translocació de MyoD al nucli per interacció directa amb el MyoD citoplasmàtic (Chen et al., 1996).

MyoD també pot ser regulat per fosforilació/desfosforilació. La PKC és capaç de reprimir la capacitat transactivadora de MyoD fosforilant el residu treonina del triplet de reconeixement miogènic i impeding la unió del factor al DNA (Li et al., 1992a). Altres cinases com la PKA (Li et al., 1992b), la CDC2 (cdk1) (Hashimoto et al., 1994) o MAPKs i SAPKs (Ono et al., 2000) han estat implicades en la inhibició de la cascada miogènica per alteració de la vida mitja de MyoD.

MyoD és capaç d'interaccionar amb co-activadors del tipus CBP/p300 i PCAF, amb activitat histona acetiltransferasa (Puri et al., 1997) i amb co-repressors amb activitat histona desacetilasa (HDAC). MyoD pot ser acetilat per CBP/p300, millorant la seva capacitat d'unió a DNA i activant la transcripció (Sartorelli et al., 1997; Polesskaya et al., 2000; Polesskaya et al., 2001). I desacetilat per HDAC1, impeding la capacitat de PCAF d'activar la transcripció de gens via MyoD (Mal et al., 2001). MyoD també interacciona amb el complex repressor NcoR/SMRT (Bailey et al., 1999).

3.2.- FAMÍLIA MEF-2 (Myocyte enhancer factor 2)

Les proteïnes de la família MEF-2 formen part dels factors de transcripció MADS-box (MDM1, Agamous, Deficiens, SRF) (Revisat per Olson et al., 1995; Molkentin et al., 1996a;

Ornatsky et al, 1996; Black et al., 1998; Naya et al., 1999). Actualment, hi ha descrites quatre proteïnes MEF-2: MEF-2A, MEF-2B i MEF-2D d'expressió ubiqua (Yu et al., 1992; Breitbart et al., 1993) i MEF-2C d'expressió restringida a múscul esquelètic, cervell i melsa (Leifer et al., 1993; Martin et al., 1993; McDermot et al., 1993).

ESTRUCTURA

Les proteïnes MEF-2 consten de tres dominis funcionals: el domini MADS-box a l'extrem N-terminal, el domini MEF2 que defineix a la família i un gran domini transactivador a la regió C-terminal susceptible de processaments alternatius (revisats per Olson et al., 1995; Molkentin et al., 1996b) (Figura 14). Els dominis MADS-box i MEF-2 són necessaris, i suficients, per la dimerització i pel reconeixement i unió a seqüències específiques de DNA (Schwarz et al., 1992; Nurrish et al., 1995; Molkentin et al., 1996b). El domini MEF és també el responsable de la interacció amb co-factors.

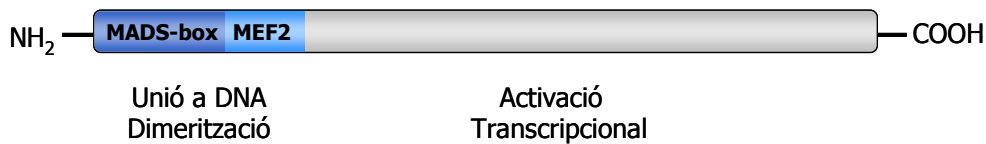


Figura 14.- Estructura de les proteïnes MEF-2. Es destaca la zona de dimerització i unió de DNA composta pels dominis MEF-2 i MADS-box i el domini transactivador C-terminal. (Adaptat de Molkentin et al., 1996a).

UNIÓ A DNA

Les proteïnes MEF-2 poden unir-se al DNA com a homodímers o heterodímers. La seqüència consens del seu element de resposta és CTA(A/T)₄TAG (Pollock et al., 1991; Andres et al., 1995; Fickett et al., 1996a/b).

REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT

MEF-2, especialment MEF-2C, es troba regulat per mecanismes similars als descrits prèviament per MyoD. La fosforilació de MEF-2C per diferents MAPK (p38 i ERK5) incrementa la seva activitat transcripcional (Yang et al., 1998; Yang et al., 1999) i la proteïna Twist també és capaç d'interaccionar amb MEF-2C, inhibint la miogènesi (Spicer et al., 1996).

Les histones desacetilases de classe II (HDAC4 i HDAC5), per la seva banda, inhibeixen l'expressió de gens múscul-específics que contenen llocs d'unió a MEF-2 (Zhang et al., 2002). El mecanisme d'aquesta inhibició és la interacció directa de les HDAC amb els dominis MADS-MEF de MEF-2C, formant complexos capaços d'unir-se al DNA, però incapços de transactivar (McKinsey et al., 2000; Dressel et al., 2001; McKinsey et al., 2001; Puri et al., 2001). L'activació de la transcripció requereix del trencament d'aquesta interacció, que sembla que es produeix a través de la cinasa dependent de calci-calmodulina (CaMK). Segons el mecanisme proposat, la fosforilació de dues serines conservades de les HDAC per part de la CaMK provocaria la unió de la proteïna xaperona 14-3-3 al complex i la sortida de HDAC del nucli, per exposició de la seva seqüència senyal d'exportació nuclear. D'aquesta manera, MEF-2C seria alliberat i la transcripció activada (McKinsey et al., 2001). MEF-2C esdevé, així, una proteïna integradora de senyals de calci controlades per calmodulina (Lu et al., 2000a/b; revisat per McKinsey et al., 2002).

MEF-2C és capaç, també, d'interaccionar amb proteïnes co-activadores com CBP/p300 o PCAF (McKinsey et al., 2000) i amb GRIP1. GRIP-1 és un co-activador dels receptors d'esteroides (Chen et al., 2000), necessari per l'expressió gènica dependent de MEF-2C i per la diferenciació cel·lular. S'ha descrit que la interacció d'ambdós factors amb CARM-1 potenciarà la miogènesi. CARM-1 (*co-activator-associated arginine methyltransferase-1*) és un membre de les proteïnes PMRT (*protein-arginine N-methyltransferase*) que catalitzen la metilació de residus arginina. És capaç de metilar la histona H3 *in vitro* i requerida per la diferenciació miogènica en sistemes de cultius cel·lulars. PGC-1 també interacciona amb MEF-2C (Michael et al., 2001).

4.- FACTORS DE LA FAMÍLIA Sp

La família de factors de transcripció Sp inclou 8 proteïnes anomenades, successivament, des de Sp1 fins a Sp8 i definides per tres dits de zinc pròxims a l'extrem C-terminal, que conformen el domini d'unió a DNA i presenten estructura Cys₂His₂ (Suske et al., 1999). Estructuralment, s'han definit dos subgrups de proteïnes Sp: Sp1-4 i Sp5-8, que presenten regions N-terminals molt diferents. Les proteïnes Sp s'uneixen al DNA a través de seqüències específiques anomenades caixes GC (seqüència consens: GGGCGGGG) o caixes GT/CACCC (seqüència consens: GGYGTGGGG), que constitueixen elements reguladors importants per molts gens d'expressió constitutiva, teixit-específics, virals i induïbles (Philipsen et al., 1999; Suske et al., 1999; Bouwman et al., 2002; Li et al., 2004).

4.1.- Sp1-Sp3

Sp1 i Sp3 pertanyen a la subfamília Sp1-Sp4. Són proteïnes d'expressió ubiqua amb un alt grau d'homologia en la seqüència d'unió a DNA (90%) i capacitat per unir-se al mateix element de resposta (caixa GC). Les seves funcions es solapen durant el desenvolupament per divergir després en l'individu adult (Suske et al., 1999; Bouwman et al., 2000).

ESTRUCTURA

Sp1 és una proteïna de 105Kda (785 aminoàcids) (Briggs et al., 1986; Kadonaga et al., 1987; Takahara et al., 2000), mentre que Sp3 té 781 aminoàcids (Oleksiak et al., 2002) i presenta dues formes truncades de 769 i 697 aminoàcids (Suske et al., 1999; Bouwman et al., 2002). Ambdues proteïnes s'han dividit en diferents dominis funcionals (Kadonaga et al., 1988; Courey et al., 1988; Courey et al., 1989; Pascal et al., 1991) (Figura 15).

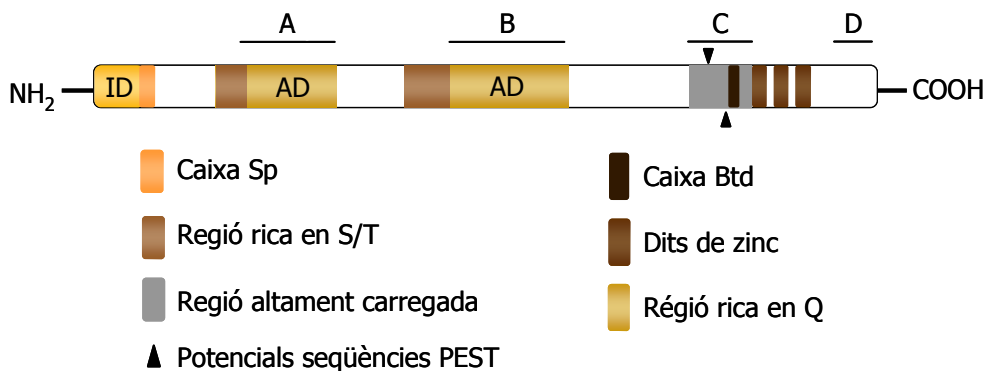


Figura 15.- Estructura del factor de transcripció Sp1. AD: domini d'activació, ID: domini inhibidor. Els dominis funcionals de la proteïna s'indiquen a la part superior de la figura com a A, B, C i D. (Adaptat de Bouwman et al., 2002).

Les regions A i B conformen el domini de transactivació. És una zona rica en glutamines (Gln) que, fusionada a un domini d'unió a DNA, és capaç d'estimular la transcripció gènica. A continuació d'aquest domini es localitza una zona rica en serines i treonines que es creu que està implicada en modificacions post-traduccionals de la proteïna (Roos et al., 1997; Yang et al., 2001). El domini C és un domini amb aminoàcids carregats que inclou l'element Btd (*Buttonhead*). Aquest element és important per l'activitat transactivadora i per l'activació sinèrgica de Sp1 amb factors SREBP (Yieh et al., 1995; Athanikar et al., 1997). L'extrem carboxil d'aquest domini conté els tres dits de zinc que caracteritzen la família i que permeten la unió dels factors

Sp al DNA. Aquesta regió inclou, també, putatives seqüències PEST, motius potencials de proteòlisi induïda. (Mortensen et al., 1997). El domini D, situat a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna, és requerit pel bon funcionament dels dominis de transactivació A i B i pel sinergisme observat en promotors amb diverses caixes GC (Pascal et al., 1991).

A l'extrem amino d'aquestes proteïnes (excepte a Sp7) es troba la seqüència anomenada Sp (SPLALLAATCSR/KI). Es tracta d'una seqüència altament conservada que conté un lloc de proteòlisi i que sembla implicada en la degradació proteosòmica de la proteïna (Su et al., 1999). En aquesta regió es localitza, a Sp1, un domini inhibidor que, a Sp3 es troba immediatament davant dels dits de zinc i que podria explicar el diferent comportament d'aquests factors a nivell transcripcional (Murata et al., 1994; Dennig et al., 1996; Suske et al., 1999).

REGULACIÓ. MODIFICACIONS POST-TRADUCCIONALS

Sp1 i Sp3 poden regular-se per glicosilació, fosforilació, acetilació, metilació i sumoïlació. (Jackson et al., 1990; Braun et al., 2001; Sapetschnig et al., 2002; Ryu et al., 2003; Ammanamanchi et al., 2003; Spengler et al., 2006).

ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE Sp

Les proteïnes Sp1 i Sp3 poden actuar com a reguladors positius i negatius de l'expressió gènica (Birnbaum et al., 1995; Majello et al., 1997; Shou et al., 1998; Suske et al., 1999; Barth et al., 2002; Bouwman et al., 2002). Sp1 té un paper important en prevenir la metilació de caixes CpG (Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994) i en l'inici de la transcripció de gens mancats de caixa TATA (*TATA-less*), on participa en el reclutament de factors iniciadors de la transcripció sobre el promotor (Weis et al., 1997; Smale et al., 1997).

Un dels principals mecanismes de regulació per part de Sp1 i Sp3 implica els seus nivells relatius (Apt et al., 1996). Nombrosos estudis han mostrat que l'abundància relativa d'ambdós factors de transcripció és capaç de modular l'expressió dels seus gens diana. A més a més, s'ha vist que Sp1, a diferència de Sp3, és capaç d'activar sinèrgicament promotors amb múltiples llocs d'unió a Sp formant tetràmers a través dels dominis D (Mastrangelo et al., 1991; Su et al., 1991; Li et al., 1991; Yu et al., 2003).

Un altre dels mecanismes de regulació de l'activitat Sp1 sobre un promotor és l'afinitat per unir-se als seus elements de resposta. Diferents estudis han demostrat que la capacitat d'unió i la naturalesa del lloc d'unió a Sp1 influencien en l'activitat de determinats promotors (Russell et al., 2003). Substitucions de nucleòtids en les seqüències de les caixes GC impliquen reduccions dràstiques en la capacitat d'unir Sp1 o Sp3 (Letovsky et al., 1989).

MECANISMES DE REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL

Les proteïnes Sp1 i Sp3 regulen l'expressió dels seus gens diana per interacció directa o indirecta amb altres factors de transcripció, amb elements de la maquinària basal de la transcripció (Hoey et al., 1993; Emili et al., 1994; Gill et al., 1994; Chen et al., 1994; Chiang et al., 1995; Tanese et al., 1996;) i amb proteïnes remodeladores de la cromatina. Sp1 és capaç de reclutar complexos com SWI/SNF que alteren l'estructura cromatínica del DNA, permetent l'entrada d'altres factors. Sp1 també pot interaccionar amb proteïnes amb activitat HAT (CBP/p300) (Billon et al., 1999; Suzuki et al., 2000) o amb activitat HDAC (HDAC1 i HDAC2) (Doetzlhofer et al., 1999).

D'entre els factors de transcripció amb què pot interaccionar Sp1 s'inclouen PPAR i RXR (Krey et al., 1995; Sugawara et al., 2002) COUP-TF (Rohr et al., 1997), MEF-2C (Krainc et al., 1998), factors GATA (Merika et al., 1995; Fluck et al., 2004), ER (Kim et al., 2003) o c-Myc (Gartel et al., 2003). La unió de Sp1 a aquests factors pot comportar l'activació transcripcional del gen diana, com en el cas d'ER (Kim et al., 2003; Stoner et al., 2004) o la repressió del gen per no unió al DNA, com és el cas de la interacció amb PPAR γ (Sugawara et al., 2002).

C75

La FAS (*fatty acid synthase*) és l'enzim que catalitza la síntesi de *novo* d'àcids grassos a partir de la condensació d'acetil-CoA i malonil-CoA. A part d'expressar-se en teixits perifèrics i participar en l'emmagatzematge lipídic, la FAS s'expressa a nivell hipotalàmic on juga un paper important en el comportament alimentari dels individus. L'interès de la FAS en el control de la ingesta i del balanç energètic té el seu origen en l'estudi dels processos cancerosos, on s'ha observat que una alta proporció de càncers humans cursen amb un increment en l'expressió d'aquesta proteïna (Kuhajda et al., 1994; Kuhajda et al., 2000; Gabrielson et al., 2001).

El primer compost inhibidor de la FAS estudiat va ser la cerulenina (Omura et al., 1976; Funabashi et al., 1989). Es tracta d'un antibiòtic natural extret del fong *Cephalosporium caerulens* que indueix l'apoptosi de cèl·lules tumorals, però no en cèl·lules no transformades. El principal problema terapèutic d'aquest compost és que provoca pèrdues de pes dosi-depenent reversibles, però importants (Loftus et al., 2000; Makimura et al., 2001; Jin et al., 2004).

El C75 (Kuhajda et al., 2000) va ser sintetitzat intentant buscar un substitut a la cerulenina que fos permeable a la cèl·lula, presentés una major estabilitat química i una reactivitat menor. Aquest compost és capaç d'inhibir tres activitats enzimàtiques de la FAS, l'enoil reductasa, la tioesterasa i la β -cetoacil-acil sintetasa, a diferència de la cerulenina que només inhibeix aquesta última. A més a més, el C75 actua com un inhibidor competitiu dels diferents substrats de la FAS, l'acetil-CoA, el malonil-CoA i el NADPH (Rendina et al., 2005). Igual que en el cas de la cerulenina, el C75 provoca pèrdua de pes i pèrdua de massa grassa administrat perifèricament i intraperitoneal (Kim et al., 2002). Els resultats d'aquests tractaments apunten a què, com a mínim una part d'aquests efectes es donen a nivell central (Loftus et al., 2000; Kumar et al., 2002). L'anorèxia causada per C75 s'ha associat a una reducció dels nivells del pèptid orexigènic NPY i dos estudis han relacionat el tractament crònic de ratolins amb obesitat induïda per la dieta amb C75 a un increment de l'expressió de CART (*cocaine and amphetamine related transcript*) (Thupari et al., 2004; Tu et al., 2005). Segons aquestes dades, el C75 actuaria a nivell central, alterant la ingesta.

En el sistema nerviós central (SNC), el control de la ingesta depèn de la informació que aquest rebí sobre les reserves energètiques disponibles a través de molècules com la insulina o,

sobretot, la leptina. El sistema de melanocortina, en presència de leptina, actua sobre l'hipotàlem reduint l'expressió dels pèptids orexigènics (inductors de la ingesta), NPY (Billington et al., 1994; Gehlert et al., 1999) i AgRP, i induint la de pèptids anorexigènics (supressors de la ingesta), CART i POMC (Friedman et al., 1998; Elias et al., 1999; Schwartz et al., 2000). El C75, per un mecanisme independent de leptina i de l'aportació energètica de la glucosa, és capaç d'anul·lar la inducció dels pèptids orexigènics i la repressió d'anorexigènics que es produeix en estats de dejú (Loftus et al., 2000; Kumar et al., 2002; Shimokawa et al., 2002).

Els mecanismes proposats per explicar aquest efecte anorèctic del C75 es basen en les evidències que atorguen al malonil-CoA un paper com a mediador metabòlic de la ingesta (McGarry et al., 2000; Hu et al., 2003; Leonhardt et al., 2004).

En el primer dels casos s'ha suggerit que la inhibició de la FAS provocaria un increment dels nivells centrals de malonil-CoA que donarien una falsa senyal de sacietat al SNC, que disminuiria la ingesta (Hu et al., 2003; Leonhardt et al., 2004). En un sentit similar, l'altre mecanisme proposat apunta a què el C75 podria estar afectant la ingesta modificant l'activitat de l'enzim AMPK (Landree et al., 2004). Aquest enzim és un sensor de l'estat energètic perifèric, inhibeix l'anabolisme i estimula el catabolisme, i també se li assigna un paper neuronal en la regulació de la ingesta (Kim et al., 2004; Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004). L'AMPK fosforila i inactiva l'ACC, disminuint els nivells de malonil-CoA i inhibint la síntesi d'àcids grassos (Frederich et al., 2002). Segons l'estudi publicat, el C75 inactivaria l'AMPK central, impeding la fosforilació i conseqüent inactivació de l'ACC (Landree et al., 2004).

Per altra banda, s'ha observat que la pèrdua de pes provocada per C75 no és només deguda a una disminució en la ingesta, sinó que també es dona un increment en la despesa energètica perifèrica (Kumar et al., 2002; Thupari et al., 2002). Animals tractats amb C75 perden més pes que animals no tractats amb la dieta restringida fins al nivell dels tractats i mostren un increment en el consum d'oxigen (Thupari et al., 2002; Thupari et al., 2004; Landree et al., 2004; Tu et al., 2005).

Els senyals metabòlics que arriben a SNC són transmesos als teixits perifèrics. Canvis en els nivells hipotalàmics de malonil-CoA són ràpidament comunicats des del SNC al múscul esquelètic per alterar la despesa energètica. L'administració central de C75 provoca l'emissió de senyals del SNC cap al teixit muscular a través del SNS. En aquest teixit, l'inhibidor de la FAS

provoca una sobreexpressió d'UCP3 i PPAR α i una disminució dels nivells de malonil-CoA, per fosforilació i inactivació de l'enzim ACC (Ser⁷⁹) (Cha et al., 2005). El resultat d'aquests efectes seria un increment de la termogènesi i de la β -oxidació muscular, que afectarien la despesa energètica de tot l'individu.

Segons tots els estudis publicats, el C75 ha estat proposat com un possible agent antitumoral i com a fàrmac antiobesitat. Presenta efectes citotòxics i citostàtics en cultius de cèl·lules tumorals, on l'increment dels nivells de malonil-CoA causa apoptosi específica de les cèl·lules transformades. I, per altra banda, és capaç d'alterar la secreció de pèptids anorexigènics i orexigènics i els nivells de malonil-CoA hipotalàmic, disminuint la ingesta i d'afectar la β -oxidació i la termogènesi perifèriques, incrementant la despesa energètica perifèrica, provocant, en darrera instància, una pèrdua de pes corporal.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

En el capítol que aquí s'inicia s'expliquen les característiques del material biològic, així com els mètodes emprats en la realització d'aquest treball. Oligonuclèotids i construccions generades es descriuen a l'apèndix.

Totes les solucions utilitzades es van preparar amb aigua MiliQ autoclavada (30 min, 121°C, 1.2atm) i aquelles que contenien substàncies làbils a aquest procés d'esterilització es van filtrar a través de filtres Millipore® de 0.2 µM de porus. Si no existeixen especificacions pròpies, totes les solucions es van guardar i tots els protocols es van desenvolupar a temperatura ambient.

MATERIALS

1.-SOQUES BACTERIANES

Dues soques d'*Escherichia coli* van ser utilitzades per la propagació i selecció de plasmidis i l'expressió de proteïnes.

XL1-Blue (Stratagene): end A1, hsd R17(rk-, mk+), sup E44, thi-1, λ⁻, rec A1, gyr 96, relA1, lac[F', pro AB, lac/ ZΔM15, Tn10 (tet^r)].

DH5α (GibcoBRL): sup E44, ΔlacU169 (θ80 lac ZΔM15), hsd R17, rec A1, gyr A96, thi-1, rel A1.

Aquestes soques es van créixer en medi LB i una alíquota es va conservar congelada a -80°C en medi LB al 15% de glicerol.

LB (Luria-Bertrani Broth) pH7.4

Triptona	10 g/L
Extracte de llevat	5 g/L
NaCl	5 g/L
(Les plaques de LB sòlid contenen un 1.5% d'agar).	

2.-SOQUES DE LLEVAT

***Pichia pastoris* GS115:** Es tracta d'una soca àmpliament utilitzada per l'expressió de proteïnes heteròlogues (Cregg et al., 1993). En aquest sistema els gens d'estudi s'expressen normalment sota el control del promotor de l'alcohol oxidasa 1 (P_{aox1}). Aquest promotor és induïble per metanol i es troba reprimat en presència de glucosa i glicerol en el medi de creixement.

En el cas de l'expressió de proteïnes mitocondrials, com la CPTI, l'ús del metanol com a inductor no és el més apropiat degut a l'augment de peroxisomes que provoca i que es copurifiquen amb els mitocondris durant la centrifugació diferencial. En aquest treball es va utilitzar el promotor de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (P_{GAP}) per dirigir l'expressió de CPTI. Aquest promotor va ser aïllat de *Pichia pastoris* l'any 1997 per Waterham et al.

Aquesta soca es va créixer en medi YPD i vàries alíquotes es van conservar congelades a -80°C en medi YPD al 15% de glicerol.

YPD (Yeast-Peptide-Dextrose)

Extracte de llevat	1%
Peptona	2%
Dextrosa	1%

(Les plaques de YPD sòlid contenen un 1.5% d'agar).

3.- LÍNIES CEL·LULARS ESTABLERTES

C2C12 (ATCC n°: CRL-1772): Múscul esquelètic de ratolí (*Mus musculus*).

CV-1 (ATCC n°: CCL-70): Ronyó de mico verd africà (*Cercopithecus aethiops*).

COS-7 (ATCC n°: CRL-1651): Ronyó de mico verd africà (*Cercopithecus aethiops*).

CHO-K1 (ATCC n°: CCL-61): Ovari d'hàmsster xinès (*Cricetulus griseus*)

4.- VECTORS

En aquest punt s'indiquen els plasmidis utilitzats en aquest treball. Les construccions generades es recullen a l'apèndix.

4.1.- VECTORS DE CLONATGE

Els fragments de DNA que es van sotmetre a un subclonatge van ser clonats, inicialment, en un dels dos vectors descrits a continuació.

pBluescript SK+/-: (Stratagene): Conté els promotors T3 i T7, la seqüència de lacZ, el gen de resistència a ampicil·lina i una zona de clonatge amb diferents dianes de restricció úniques (*polylinker*).

pGEM®-T (Promega Ref.:A3600): Es tracta d'un vector linealitzat per digestió amb EcoRV que presenta una timidina afegida als extrems 3'. Aquest nucleòtid permet el clonatge de productes de PCR als que la *Taq* polimerasa ha incorporat una adenina en finalitzar cada nova cadena. Conté els promotors T7 i SP6, la seqüència lacZ, el gen de resistència a ampicil·lina i una zona de clonatge amb diferents dianes de restricció úniques (*polylinker*).

En ambdós casos, es tracta de vectors d'alt número de còpia, que confereixen resistència a ampicil·lina als transformants i que permeten la selecció per color de les colònies recombinants gràcies a la seqüència *lacZ*. La inserció de fragments de DNA en la zona del *polylinker* d'aquests vectors provoca la interrupció de la regió codificant del gen *lacZ* i la pèrdua de l'activitat β-galactosidasa de les cèl·lules. En un medi suplementat amb ampicil·lina (100 mg/L), IPTG (8 mg/L) i X-Gal (40 mg/L) les colònies recombinants apareixeran blanques, per incapacitat d'hidrolitzar el substrat X-Gal, mentre que les que han incorporat el vector buit seran blaves, per presència de productes d'hidròlisi de X-gal.

4.2.- VECTORS D'EXPRESSIONI

pSG5 (Green et al., 1988): Vector d'expressió eucariota *in vitro* i *in vivo*. Permet el clonatge de cDNAs en les dianes úniques EcoRI, BamHI i BglII donant alts rendiments de DNA. L'expressió *in vitro* està dirigida pel promotor T7, situat immediatament corrent amunt dels punts de clonatge i l'expressió de proteïnes *in vivo* es dona gràcies al promotor viral del SV40. Aquest vector confereix resistència a ampicil·lina.

pCDNA3 (Umesono et al., 1991): Vector d'expressió eucariota *in vitro* i *in vivo*. Presenta una regió de clonatge de dianes úniques obtenint-se alts rendiments dels DNAs introduïts. L'expressió *in vitro* pot estar dirigida pels promotors T7 o SP6 i, *in vivo*, les proteïnes s'expressen sota el control del promotor viral del CMV. Confereix resistència a ampicil·lina.

pCDM8 (Invitrogen, Ref.:V30820): Vector d'expressió eucariota *in vitro* i *in vivo*. Presenta una regió de clonatge de dianes úniques. L'expressió *in vitro* està dirigida pel promotor T7 i presenta el promotor del CMV per l'expressió de proteïnes *in vivo*. Confereix resistència a ampicil·lina.

pSV-SPORT (GIBCO-BRL, Ref.:15386014): Vector d'expressió eucariota *in vitro* i *in vivo*. Presenta una regió de clonatge de dianes úniques flanquejada pels promotors T7 i SP6 que poden dirigir l'expressió *in vitro*. *In vivo*, les proteïnes s'expressen sota el control del promotor viral del CMV. Confereix resistència a ampicil·lina.

pGEX-4T (Amersham Biosciences): Vector utilitzat per la producció de proteïnes de fusió amb la Glutatió-S-Transferasa (GST) en *Escherichia coli*. Conté una zona de dianes de clonatge úniques, confereix resistència a ampicil·lina i el seu promotor (Tac) és induïble per IPTG. Existeixen tres vectors pGEX-4T: pGEX-4T1 (Ref.:27-4580-01) pGEX-4T2 (Ref.:27-4581-01) i pGEX-4T3 (Ref.:27-4583-01) que presenten la zona de les dianes de restricció segons els diferents marcs de lectura, permetent el clonatge dels cDNAs de manera que es generi correctament la proteïna de fusió.

pHWO10 (Waterham et al., 1997): Vector utilitzat per expressar les proteïnes CPT en *Pichia pastoris* sota el control del promotor de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (P_{GAP}). Aquest plasmidi conté l'origen de replicació i el gen de resistència a ampicil·lina del vector d'*E.coli* pBR322 i el gen *His4*, la seqüència de terminació de la transcripció del gen *Aox1* i el P_{GAP} de *P.pastoris*. Presenta una diana única de clonatge EcoRI entre la seqüència de terminació de la transcripció del gen *Aox* i el promotor P_{GAP} i una sèrie de dianes de linealització que permetran la posterior integració del cDNA clonat en els llocs P_{GAP} o *His4* del genoma de *P.pastoris*. En tots els casos, es va utilitzar l'enzim AvrII, que talla en el locus del P_{GAP} , per linealitzar les construccions.

4.3.- VECTORS REPORTERS

Els sistemes reporters aquí presentats permeten l'estudi de seqüències reguladores de la transcripció eucariota. Després de la transfecció de cèl·lules eucariotes en cultiu, els extractes cel·lulars poden ser assajats per detectar, per quimioluminescència, la presència d'activitat enzimàtica de la proteïna reportera. El sistema utilitzat en aquest treball es basa en el gen *luc* de la cuca de llum (*Photinus pyralis*). Aquest enzim presenta nivells d'activitat endògena en cèl·lules de mamífer pràcticament indeterminables. La luminescència detectada en els lisats cel·lulars és directament proporcional a l'activitat promotora de la construcció transfectada.

pGL3Basic (Promega, Ref.:E1751): Vector sense promotor eucariota ni seqüències *enhancer*. Presenta una zona de clonatge i confereix resistència a ampicil·lina. S'ha utilitzat per l'estudi de promotors ja que l'activitat de l'enzim luciferasa en cèl·lules transfectades amb aquest plasmidi dependrà, únicament, de la funcionalitat del promotor inserit corrent amunt del reporter (gen *luc*).

pGL3Promoter (Promega, Ref.:E1761): Vector amb el promotor viral del SV40. Presenta una zona de clonatge i confereix resistència a ampicil·lina. S'ha utilitzat per comprovar la funcionalitat d'elements *cis*.

pRL-CMV (Promega, Ref.:E2261): Vector d'expressió constitutiva del gen *luc* de renilla (*Renilla reniformis*) sota el promotor del CMV. S'utilitza com a control de l'eficiència de transfecció en cèl·lules de mamífer en cultiu.

5.- OLIGONUCLEÒTIDS

Tots els oligonucleòtids utilitzats van ser sintetitzats per Sigma-Genosys i purificats per HPLC. L'apèndix i els articles inclosos en aquest treball mostren la seqüència de tots ells.

6.- ANTICOSSOS

CPTI (#139): Anticòs contra l'isotip hepàtic de la CPTI de porc. Va ser obtingut per immunització d'un conill amb la construcció pGEX-4T1/PLCPT1, que genera una proteïna de fusió GST-PLCPT de 41KDa (aa PLCPT1: 303-441). Reconeix els isotips muscular i hepàtic de diferents espècies (porc, humà i rata) en extractes mitocondrials de llevats transformats, però no detecta la proteïna en mitocondris aïllats de teixit hepàtic de porc. (Nicot et al., 2001).

SP-1 (PEP-2) (Santa Cruz Biotechnology, Ref.:sc-59x): Anticòs monoclonal de ratolí contra un epítip d'un domini intern de la proteïna Sp1 de rata.

Anti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked (Amersham Biosciences, Ref.:NA934V): Anticòs conjugat a l'enzim peroxidasa que reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari, permetent la localització dels punts de la membrana on aquest s'ha unit.

7.- MATERIAL RADIOACTIU

[α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol) (Amersham Biosciences, Ref.:AA0005): Utilitzat en el marcatge per ompliment de fragments de DNA 5'-protuberants en experiments de retardació en gel (EMSA).

[γ -³²P]dATP (3000Ci/mmol) (Amersham Biosciences, Ref.:AA068): Utilitzat en el marcatge per fosforilació de fragments de DNA amb extrems roms en experiments de retardació en gel (EMSA).

L-[methyl-³H] Carnitine Hydrochloride (82Ci/mmol) (Amersham Biosciences, Ref.:TRK762): Utilitzat en assaigs d'activitat CPT.

L-[³⁵S] Methionine (1000Ci/mmol) (Amersham Biosciences, Ref.: SJ1015): Utilitzat en protocols de transcripció i traducció *in vitro* per generar proteïnes radioactives en assaigs de *GST-pull-down*.

8.- REACTIUS

8.1.- REACTIUS UTILITZATS EN CULTIUS CEL·LULARS

Sèrum boví fetal	(Gibco BRL Ref.:10270-106)
Sèrum de cavall	(Gibco BRL Ref.:16050-122)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	(Gibco BRL Ref.:52100-039)
Ham's F-12	(Gibco BRL Ref.:21765-029)
Penicil·lina- Estreptomicina 10.000 U.I./mL	(Gibco BRL Ref.:15140-122)
L-glutamina 200 mM	(Gibco BRL Ref.:25030-024)
Piruvat sòdic	(Gibco BRL Ref.:11360-039)
Tripsina EDTA	(Gibco BRL Ref.:15400-054)
Bicarbonat sòdic en solució al 7,5 %	(Sigma Ref.:S-8761)
Fungizona	(Gibco BRL Ref.:15290-026)
Material fungible de plàstic	(Cultek)

Els reactius referenciats a continuació es van utilitzar com a tractaments puntuals en transfeccions transitòries. En cada cas s'indica el solvent emprat i la concentració final. Un cop dissolts, els reactius es van aliquotar i guardar a -20°C.

Wy-14643 (Sigma Ref.:C7081): Àcid 4-cloro-6-(2,3-xilidino)-2-pirimidiniltioacètic (àcid piriníxic). Es dissol en DMSO a una concentració de 10 mM. Es tracta d'un agonista de PPAR α .

GW-7647 (Sigma Ref.:G-6793): Àcid 2-(4-(2-(1-Ciclohexanebutil)-3-ciclohexilureido) etil)-feniltio)-2-metilpropioníc. Es dissol en DMSO a una concentració de 10 mM. Es tracta d'un agonista de PPAR α .

L-165,041 (Sigma Ref.:L-2167) Àcid 4-[3-(4-Acetil-3-hidroxi-2-propilfenoxi) propoxi] fenoxiacètic. Es dissol en DMSO a una concentració de 10 mM. Es tracta d'un agonista de PPAR δ .

Àcid 9-cis retinoic (Sigma Ref.:R4643): 9-cis-Tretinoin. Es dissol en DMSO a una concentració de 10 mM. Es tracta d'un lligant de RAR i de RXR.

8.2.- C75 (Calbiochem Ref.:X270286D001)

Àcid 4-Metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxílic. Es tracta d'un inhibidor de la FAS emprat, en aquest treball, en tractaments de cèl·lules eucariotes en cultiu (COS-7 i CHO) i en assaigs enzimàtics de CPT. Es dissol en DMSO a una concentració de 10mM i es va utilitzar a una concentració final de 200 μ M.

8.3.- ALTRES REACTIUS

Prestained SDS-PAGE Standards	(BioRad Ref.: 161-0318)
Prestained Protein Molecular Weight Marker	(Fermentas Ref.:SM0441)
Marcador DNA 100pb	(Biotools Ref.:31006)
Marcador DNA 1Kb	(Biotools Ref.:31005)
Albúmina de sèrum boví (BSA)	(Sigma Ref.:A7906)
Albúmina de sèrum boví. Fracció V, lliure d'àcids grassos	(Roche Ref.:775827)
Bromur d'etidi	(Sigma Ref.:E4134)
DNA polimerasa I Klenow	(Promega Ref.:M220A)
Fosfatasa alcalina (AP)	(Roche Ref.:713023)
Líquid de centelleig Ecolite(+)	(ICN Biolink 2000 Ref.:882475)
Malonil-CoA	(Sigma Ref.:M4263)
Poli-dIdC	(Amersham Ref.:27-7880-01)
S-Palmitoil-CoA, sal de liti	(Sigma Ref.:P9716)
Taq BioTherm TM DNA Polimerasa	(Attend Bio Ref.:GC-002-0500)
T4 DNA lligasa	(Promega Ref.: M1801)
T4 Polinucleòtid cinasa (PNK)	(Fermentas Ref.:EK0031)
Unwashed glass beads (450-600µm)	(Sigma Ref.:G9268)
Extractes nuclears C2C12	(Genycell Biotech Ref.:36078)
PPO	(Scharlab Ref.:PP0001)
Inhibidors de proteases	(Sigma Ref.:P8340)
PMSF	(Sigma Ref.:P7626)
Sefarosa CL-4B	(Sigma Ref.:CL-4B-200)
Glutatió sefarosa	(Amersham Ref.:17-0756-01)

MÈTODES**1.- OBTENCIÓ DE DNA****1.1.- CULTIUS BACTERIANS**

Per tal d'obtenir DNA plasmídic, la soca bacteriana que conté el plasmidi d'interès es creix en medi líquid LB/antibiòtic. L'antibiòtic d'elecció va ser, en tots els casos, ampicil·lina (100 mg/L), antibiòtic al que confereixen resistència els vectors utilitzats en aquest treball. El volum de medi dels inòculs va ser escollit en funció de la quantitat de DNA que es volia obtenir: 2mL per una obtenció a petita escala (mini-preparació) o 100mL per una obtenció a gran escala (maxi-preparació). En el primer dels casos era aconsellable iniciar el cultiu a partir d'una colònia aïllada crescuda en medi sòlid. En el segon calia un pre-inòcul de volum inferior (2-10mL) perquè el creixement fos òptim.

1.2.- PREPARACIÓ DE DNA PLASMÍDIC

Els mètodes de preparació de DNA plasmídic descrits a continuació, es basen en el protocol de lisi alcalina de la paret bacteriana de Birnboim et al., (1979). Els plasmidis obtinguts per aquests sistemes es troben, majoritàriament, en forma circular tancada (superenrotllat) i en general no necessiten purificacions posteriors per la manipulació enzimàtica.

El procés consisteix en una lisi suau de la paret bacteriana en medi alcalí permetent que el cromosoma bacterià quedi associat a les parets i pugui ser eliminat per centrifugació amb les restes de membranes. El DNA plasmídic queda en el sobrenedant i és purificat mitjançant una resina d'intercanvi iònic obtenint-se rendiments d'entre 1-5µg de DNA/mL de cultiu.

Les preparacions a petita escala de DNA es van realitzar amb el *kit* comercial *Wizard™ Minipreps DNA Purification* (Promega, ref. A1460), obtenint-se, a partir de cultius de 2mL, 1-10µg de DNA d'un plasmidi d'alt número de còpies. En l'obtenció de grans quantitats de DNA es va utilitzar el *kit Nucleobond AX 500 / 50 cart.* (Cultek, Ref.:740531.50), obtenint-se, a partir de cultius de 100mL, 100-500µg de DNA d'un plasmidi d'alt número de còpies.

1.3.- PRECIPITACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE DNA

1.3.1.- Precipitació del DNA

La precipitació del DNA té lloc a -20°C en presència de 2.5 volums d'etanol absolut i 0.1 volum d'acetat sòdic 3M pH 5.2. Les mostres a precipitar es van mantenir en aquestes condicions durant un temps mínim de 30 minuts i posteriorment, es van centrifugar a 15000rpm durant 15 minuts. El sediment obtingut es va rentar amb etanol al 70% i el DNA precipitat va ser resuspès en aigua MilliQ autoclavada o TE pH 8.0.

1.3.2.- Extracció amb fenol-cloroform

L'extracció amb fenol-cloroform s'utilitza per eliminar proteïnes de solucions de DNA. El fenol és un solvent orgànic que desnaturalitza les proteïnes i la seva eficiència d'extracció és major si s'utilitza amb cloroform.

A la solució de DNA es va afegir 1 volum d'una mescla fenol-cloroform 1:1. L'emulsió formada se centrifugà a 15000 rpm durant 5 min, recuperant la fase aquosa. A continuació, es va realitzar una segona extracció amb 1 volum de cloroform per eliminar les restes de fenol.

1.3.3.- Quantificació del DNA

La concentració de DNA es determina per espectrofotometria mesurant l'absorbància de la mostra a 260nm i 280nm i tenint en compte que 1 unitat de densitat òptica a 260nm (OD₂₆₀) correspon a 50µg/mL de DNA de cadena doble (DNAs). La relació entre les dues absorbàncies indica la puresa de la mostra i es consideren acceptables valors >1.8. La lectura espectrofotomètrica va ser realitzada en cubetes de quars i es va utilitzar un espectrofotòmetre Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech).

Per la quantificació de petites quantitats de DNA es van resoldre els fragments en gels d'agarosa/TAE/bromur d'etidi.

1.4.- RESOLUCIÓ, IDENTIFICACIÓ I PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA

1.4.1. Separació de fragments de DNA en gels d'agarosa/TAE/bromur d'etidi

L'electroforesi en gel d'agarosa és una tècnica útil per la separació de fragments de DNA de mides compreses entre 50bp i 25kb. La resolució d'aquests gels ve determinada per la

concentració d'agarosa (0.8-2%), permetent la separació de fragments de menor mida incrementant la relació agarosa/TAE.

La comparació de les mobilitats electroforètiques de les bandes resoltes en un gel d'agarosa amb fragments de DNA de mida coneguda permet el càlcul del pes molecular d'un DNA lineal, tenint en compte que la mobilitat electroforètica d'un fragment de DNA en un gel d'agarosa és inversament proporcional al logaritme del seu pes. Es van utilitzar dos marcadors de pes molecular de DNA: el marcador DNA 100pb (Biotools Ref.:31006) amb un rang de 1000-100bp i el marcador DNA 1Kb (Biotools Ref.:31005) amb rang de 10000-250bp

Els gels d'agarosa també es van utilitzar per la quantificació de fragments de DNA. El DNA es visualitza en el gel mitjançant la incorporació, a la solució d'agarosa/TAE, d'un colorant fluorescent, bromur d'etidi, que s'intercala entre les dues cadenes de l'àcid nucleic i revela la presència de DNA o RNA al ser irradiat amb llum ultraviolat d'ona curta (310nm).

Per preparar els gels d'agarosa es va dissoldre, en calent, l'agarosa en el tampó d'electroforesi (TAE1x) i es va afegir el bromur d'etidi (0.5 µg/mL) a la solució temperada.

Tampó d'electroforesi (TAE1X)

Tris-acetat pH 8,3	40 mM
EDTA	1 mM
Bromur d'etidi	0.5 µg/mL

Tampó de càrrega de les mostres 5x

Ficoll 400	30 %
EDTA	40 mM
SDS	0.1 %
Blau de bromofenol	0.2 %

1.4.2.- PURIFICACIÓ DE FRAGMENTES DE DNA EN GELS D'AGAROSA

Existeixen *kits* comercials que permeten l'extracció i purificació de fragments de DNA resolts en un gel d'agarosa. Aquests protocols es basen en la dissolució en un agent caotrópic (perclorat sòdic) del fragment de gel que conté el DNA a purificar i l'adsorció selectiva d'aquest DNA a una matriu de sílice. El DNA adsorbit és rentat per eliminar impureses i eluït en condicions de baixa força iònica (aigua MilliQ autoclavada o TE pH 8.0) (Vogelstein i Gillespie, 1979).

Es va utilitzar el *kit* comercial *Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Ref.: A9282) i es van purificar els fragments seguint el protocol de la casa comercial.

2.- MODIFICACIÓ ENZIMÀTICA DEL DNA

2.1.- DIGESTIÓ DE DNA

Les endonucleases de restricció són enzims purificats a partir de bacteris o fongs que reconeixen seqüències curtes de DNA específiques i que actuen sobre aquestes trencant l'enllaç fosfodièster i en conseqüència la cadena de DNA. Els enzims utilitzats al llarg d'aquest treball van ser desoxiribonucleases de tipus II.

Les reaccions es van protocol·lar, per norma general, digerint el DNA a una concentració final de 5-200ng/μL, amb una relació de 1-3 unitats d'enzim per μg de DNA i sempre evitant superar el 5% de glicerol a la solució. Els requeriments de força iònica i temperatura són específics de cada enzim. En cada cas, es van seguir les indicacions de la casa comercial (Fermentas, New England Biolabs). El temps de digestió va ser de 2-3 hores i els productes van ser analitzats en gels d'agarosa/TAE/Bromur d'etidi.

2.2.- DESFOSFORILACIÓ DEL DNA: Fosfatasa alcalina de vedella (CIAP) (Roche, Ref.: 713023)

Aquest enzim catalitza la hidròlisi de residus fosfat de l'extrem 5' de les cadenes de DNA i RNA, de ribonucleòtids i de desoxiribonucleòtids trifosfat. Es tracta d'un metal·loenzim que requereix de Zn²⁺ per actuar. El seu ampli ús ve donat per la seva elevada activitat específica i per ser fàcilment inactivable per escalfament (70°C 10min) o extracció amb fenol-cloroform.

La CIAP es va utilitzar per desfosforilar els extrems cohesius o roms dels vectors plasmídics, per tal de reduir el número de colònies no recombinants en clonatges no dirigits. La reacció de desfosforilació es va realitzar en les condicions més endavant descrites, utilitzant el tampó indicat per la casa comercial.

Reacció de desfosforilació

DNA lineal	100-200 ng/μL
CIAP	0.1U.I enzim/μg de DNA
Tampó 1x (Tris-HCl pH8.0 20mM, ZnCl ₂ 1mM, MgCl ₂ 1mM)*	

*El tampó el subministra la casa comercial concentrat 10 vegades.

Les reaccions es van incubar durant 1h a 37°C, inactivant l'enzim per calor (75°C, 10min) i extracció amb fenol-cloroform.

2.3.- HIBRIDACIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS I FOSFORILACIÓ DEL DNA: Polinucleòtid cinasa del bacteriòfag T4 (T4 PNK) (Fermentas, Ref.:EK0031)

La T4 polinucleòtid cinasa (T4PNK) catalitza la transferència de l'últim grup fosfat d'una molècula d'ATP (fosfat-γ) a un extrem hidroxil 5' de DNA o RNA. Es tracta d'una reacció molt eficient que va ser utilitzada per la fosforilació d'oligonucleòtids sintètics hibridats. Aquests oligonucleòtids fosforilats podien ser, posteriorment, clonats en vectors plasmídics.

Reacció de fosforilació (Vf=50μL)

DNA lineal	40 ng/μL
T4 PNK (10U.I/μL)	10 U.I/μg DNA
ATP 100mM	1 mM
Tampó 1x (Tris-HCl pH 7.5 50mM, MgCl ₂ 10mM, DTT 5mM)*	

*El tampó el subministra la casa comercial concentrat 10 vegades.

La reacció es va incubar durant 1h a 37°C i posteriorment, es va inactivar l'enzim per calor (65°C 5min) i extracció amb fenol-cloroform.

Els oligonucleòtids sintètics de cadena complementària es van hibridar entre sí en presència de NaCl.

Reacció d'hibridació d'oligonucleòtids (Vf=100µL)

Oligonucleòtid A	5 µg
Oligonucleòtid B	5 µg
NaCl 5M	3 µL (0.15M)
TE pH 8.0 q.s.p	100 µL

La reacció es va incubar 10 min a 68°C i 20 min a temperatura ambient.

2.4.- GENERACIÓ D'EXTREMS ROMS: Ompliment (Fill-in). DNA polimerasa fragment Klenow (Promega, Ref.: M220A)

La tècnica d'ompliment (*fill-in*) permet completar els extrems 5' protuberants de seqüències de DNA. El fragment *klenow* de la DNA polimerasa és capaç d'emplenar els buits generats per la digestió amb enzims de restricció que donen extrems 5' protuberants, mitjançant la seva activitat 5'→3' polimerasa. La reacció es realitza en presència de desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs).

Aquesta tècnica es va utilitzar pel clonatge de fragments de DNA. En fer roms els extrems de l'insert i del vector s'aconsegueix fer compatibles de lligació DNAs digerits amb enzims de restricció diferents.

Reacció d'ompliment (Vf=20µL)

DNAds	0.1-4 µg
dNTPs	25 µM de cada un (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
Klenow	1U.l
Tampó 1x (Tris-HCl pH7.5 25mM, MgCl ₂ 25mM, DTT 12.5mM)*	

*El tampó el subministra la casa comercial concentrat 10 vegades.

La reacció es va incubar 30 min a 30°C i l'enzim es va inactivar mantenint-lo a 75°C 15 min.

2.5.- LLIGACIÓ DE DNA: DNA lligasa del bacteriòfag T4 (Promega, Ref.: M1801)

Aquest enzim catalitza la formació d'enllaços fosfodièster entre un fragment de DNAds, amb un fosfat 5' terminal i un fragment de DNAds, amb un hidroxil 3' terminal. La DNA lligasa pot actuar sobre extrems 5' o 3' cohesius o sobre extrems roms. En aquest darrer cas, l'addició de polietilenglicol al 3% a la reacció ajuda a millorar l'eficiència. Aquest enzim funciona a 16-22°C, és dependent d'ATP i es va utilitzar en la construcció de molècules de DNA híbrides.

Reacció de lligació (Vf=20µL)

Vector	50 ng
Insert	x3-x5 molècules / molècula de vector
T4DNA lligasa	1µL (1-3U.l/µL)
Tampó1x (Tris-HClpH7.5 40mM, MgCl ₂ 10mM, DTT 10mM, ATP 0.5mM, BSA 50µg/mL)*	

*El tampó el subministra la casa comercial concentrat 10 vegades.

La relació vector:insert va ser normalment de 1:3, 1:5 en número de molècules. La reacció de lligació es va incubar durant mínim 1h a temperatura ambient.

2.6.- MARCATGE RADIOACTIU DE MOLÈCULES DE DNA

2.6.1.- Marcatge de fragments 5'protuberants: Ompliment (*fill-in*). DNA polimerasa fragment Klenow (Promega, Ref.: M220A) (Feinberg et al., 1983).

Tal i com s'ha explicat en l'apartat 2.4, la tècnica de *fill-in* permet completar els extrems 5' protuberants de seqüències de DNA, aprofitant l'activitat 5'→3' polimerasa del fragment *klenow* de l'enzim DNA polimerasa i en presència de desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs). En aquest cas, cal tenir en compte que un dels nucleòtids trifosfat ha de ser radioactiu. Es va utilitzar [α - ^{32}P]dCTP (3000Ci/mmol) (Amersham Biosciences, Ref.: AA0005).

Aquest tipus de marcatge es va emprar en assaigs de retardació en gel de la mobilitat electroforètica (EMSA).

Reacció d'ompliment (Vf=20 μL)

Oligonucleòtids hibridats	0.1 μg
dNTPs	1 mM cada un (dATP, dTTP, dGTP)
[α - ^{32}P]dCTP	2 mCi/mL
Klenow	5 U.l
Tampó 1x (Tris-HCl pH7.5 25mM, MgCl ₂ 25mM, DTT 12.5mM)*	

*El tampó el subministra la casa comercial concentrat 10 vegades.

Les reaccions es van incubar 20min a 30°C. A continuació, es van afegir a la mescla dNTPs 5mM (1 μL) i es va incubar la reacció 10min més a 30°C. L'enzim es va inactivar per calor (5min a 75°C) i extracció amb fenol-cloroform.

2.6.2.- Marcatge per fosforilació de l'extrem 5'. Polinucleòtid cinasa del bacteriòfag T4 (T4 PNK) (Fermentas, Ref.:EK0031)

La T4 PNK es va utilitzar en el marcatge radioactiu d'oligonucleòtids hibridats. El procés és el mateix que el descrit a l'apartat 2.3 i consisteix en transferir grups fosfat- γ a l'extrem 5'-hidroxil d'un DNA lineal. En aquest cas, cal tenir en compte que el donador de grups fosfat ha de ser una molècula marcada radioactivament. Es va utilitzar [γ - ^{32}P]dATP (3000Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech. Ref.: AA068). Aquests oligonucleòtids van ser utilitzats en assaigs de retardació en gel de la mobilitat electroforètica (EMSA).

Reacció de fosforilació (Vf=50 μL)

Oligonucleòtids hibridats	0.1 μg
T4 PNK (10U.l/ μL)	10 U.l
[γ - ^{32}P]dATP	1 mCi/mL
Tampó 1x (Tris-HCl pH 7.5 50mM, MgCl ₂ 10mM, DTT 5mM)*	

*El tampó aquí especificat el subministra la casa comercial concentrat 10 vegades.

La reacció es va incubar a 37°C 45min i l'enzim es va inactivar per calor (65°C, 5 min) i extracció amb un fenol-cloroform.

3.- CONSTRUCCIÓ DE MOLÈCULES DE DNA RECOMBINANT

3.1.- SUBCLONATGE DE FRAGMENTES DE DNA

Les tècniques de subclonatge s'utilitzen amb diferents finalitats, construcció de plasmidis per transfectar, obtenció de sondes, síntesi *in vitro* de proteïnes, expressió *in vivo* de proteïnes recombinants o de fusió, etc.

Per tal de construir molècules híbrides, els DNAs van ser tractats amb els enzims de restricció adients en cada cas i el vector plasmídic va ser, normalment, desfosforilat, per evitar la seva recircularització durant la reacció de lligació. Vector i insert van ser purificats de gel d'agarosa (Mètodes, apartat 1.4.2), abans de ser combinats i tractats amb T4DNA lligasa (Mètodes, apartat 2.5).

Posteriorment, els productes de la reacció de lligació van ser introduïts a cèl·lules *E.coli* competents (transformació) (Mètodes, apartat 3.2). Els transformants es van identificar per selecció de color (blau/blanc), resistència a antibiòtic o PCR-preps (Mètodes, apartat 4.2) i es van confirmar els positius per digestió, electroforesi i seqüenciació del DNA obtingut de les colònies.

En cada cas es va buscar la metodologia òptima per l'obtenció de la molècula de DNA desitjada, sempre aplicant els protocols descrits en l'apartat 2 d'aquest capítol.

En el cas dels clonatges en pGEM®-T, els fragments de PCR generats amb *Taq* DNA polimerasa van ser resolts, extrets i purificats d'un gel d'agarosa i lligats sense modificació enzimàtica prèvia, gràcies als extrems cohesius generats per la *Taq* polimerasa, que són compatibles amb els extrems protuberants del vector.

3.2.- TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES *E.COLI*

La transformació consisteix en la introducció de DNA plasmídic a cèl·lules procariotes. Existeixen diferents mètodes de transformació, xoc tèrmic, electroporació... i tots requereixen de la preparació prèvia de les cèl·lules per fer-les receptives a l'entrada de DNA exogen. Aquest procés consisteix, generalment, en permeabilitzar la membrana d'aquestes cèl·lules. El protocol a seguir dependrà del posterior mètode de transformació utilitzat. Aquestes cèl·lules susceptibles de ser transformades s'anomenen cèl·lules competents.

3.2.1.- PREPARACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS: Mètode del CaCl_2

El mètode del clorur càlcic (Mandel i Higa, 1970) es basa en la permeabilització de les membranes cel·lulars bacterianes amb ions calci. Es tracta d'una tècnica que ofereix altes eficiències de transformació (10^6 - 10^7 transformants/ μg de DNA).

A partir d'un cultiu de cèl·lules *E.coli* en fase exponencial de creixement ($\text{OD}_{600}=1.4$), se separen les cèl·lules del medi per centrifugació i es renten dues vegades en una solució de CaCl_2 60mM. El tractament amb ions calci permeabilitza les membranes i aquestes cèl·lules esdevenen susceptibles d'incorporar el DNA present en el medi. Un cop preparades, les cèl·lules es poden conservar a -70°C durant llargs períodes de temps.

Solució de CaCl₂ (solució estèril. Ajustar el pH i filtrar)

CaCl ₂	60 mM
Glicerol	15 %
PIPES	10 mM pH 7.0

3.2.2.- TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS: Xoc Tèrmic

L'entrada dels productes de lligació, anteriorment descrits, a la cèl·lula competent es va realitzar per xoc tèrmic (10min en gel → 5min 37°C → 2min gel). Posteriorment, les cèl·lules van ser incubades, en agitació, en 1mL de medi LB líquid, no selectiu (1h a 37°C), abans de créixer-les en plaques de medi LB sòlid selectiu.

En alguns casos es van utilitzar cèl·lules competents DH5α comercials (Invitrogen Ref.:18265-017).

3.3.- SELECCIÓ DE COLÒNIES TRANSFORMADES

La selecció de bacteris transformats es va realitzar mitjançant el creixement de les cèl·lules sotmeses a la transformació en plaques de medi LB-agar selectiu. El sistema de selecció constava, en tots els casos, de l'antibiòtic pel qual el plasmidi incorporat conferia resistència (ampicil·lina 100 mg/L). Si el vector permetia selecció per color, blanc/blau, les plaques utilitzades se suplementaven amb IPTG (8 mg/L) i X-Gal (40 mg/L), a més a més de l'antibiòtic.

4.- REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet la síntesi enzimàtica de seqüències de DNA definides. S'utilitza per amplificar un fragment de DNA situat entre dues regions de seqüència coneguda (DNA motlle).

La reacció utilitza dos oligonucleòtids (*primers*) com a encebadors. Aquests oligonucleòtids presenten seqüències complementàries a les cadenes oposades del DNA motlle i flanquegen la regió de DNA a amplificar. Mitjançant cicles repetitius de desnaturalització del DNA motlle, hibridació dels encebadors i extensió d'aquests per acció d'una DNA polimerasa s'aconsegueix l'acumulació exponencial de fragments específics de DNA, on les cadenes naixents en un cicle actuen de motlle en el cicle següent. Al final del procés s'obté un número de molècules de DNA 2ⁿ sent n el número de cicles.

Saiki et al. (1988) van descriure la utilització en aquesta tècnica d'una DNA polimerasa termostable purificada del bacteri termofílic *Thermus aquaticus* (Taq DNA Polimerasa). El fet que aquest enzim resulti poc inactivat en l'etapa de desnaturalització (94°C) evita que s'hagi d'afegir a l'inici de cada amplificació.

4.1.- AMPLIFICACIÓ DE DNA

Al llarg d'aquest treball es van realitzar amplificacions de DNA a partir de DNA plasmídic. Es van utilitzar encebadors que generessin dianes de restricció en els extrems dels fragments amplificats, pel seu posterior subclonatge o bé es van clonar els fragments amplificats directament en el vector pGEM®-T (Materials, apartat 3.1). Pel disseny dels encebadors es van tenir en compte els següents criteris:

- La longitud de l'oligonucleòtid segueix la fórmula empírica: longitud=18 més una base extra per cada 2% de baixada respecte al 50% G+C.
- El rang ideal de G+C és de 40-60%. Percentatges elevats de A+T no hibriden adequadament
- Cal comprovar possibles homologies internes, o adjacents a la regió a amplificar, entre els oligonucleòtids i el DNA motlle, així com possibles hibridacions entre encebadors o intraencebadors (estructures secundàries).
- Cal comprovar els últims 10 nucleòtids de l'encebador (3') que és on s'inicia la hibridació. És recomanable que aquesta zona tingui una composició equilibrada de G+C.
- Si es generen dianes de restricció en els encebadors cal deixar 3-5 nucleòtids de marge a 5' perquè hi ha enzims que perden eficiència si la diana es troba a l'extrem.

Les amplificacions es van realitzar amb *Biotherm™ Taq Polymerase* (Attend Bio GC-002-0500) en un termociclador *Minicycler MJ Research, Inc.* o un *PTC-100 MJ Research, Inc.* A continuació es descriuen les condicions estàndards d'amplificació i de la mescla de reacció. Les característiques especials de les reaccions realitzades al llarg del treball s'especifiquen en cada cas en el moment que apareixen.

Reacció de PCR

DNA motlle	5-10 ng
Tampó <i>Taq</i> 10x	5 µL
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM cada dNTP
Oligo <i>forward</i>	1 µM
Oligo <i>reverse</i>	1 µM
<i>Taq</i> DNA polimerasa	2.5 U.l
Aigua q.s.p. (Oli mineral 50µL)	50 µL

Condicions d'amplificació

Desnaturalització inicial (<i>hot start</i>)	94°C	5 min
Desnaturalització	94°C	45 seg
Hibridació	55°C-68°C	45 seg
Extensió	72°C	1 min/Kbp
25-30 cicles		
Extensió final	72°C	10min

La temperatura d'hibridació es va decidir en funció de les T_m dels encebadors (temperatura de fusió (*melting*)) i va oscil·lar, com s'observa, entre els 55°C i els 68°C. Les reaccions es van realitzar en volums de 50-100µL.

En els casos on era necessari reduir al màxim la possibilitat d'introduir errors en els productes de PCR les amplificacions es van realitzar amb *Pfx* DNA polimerasa (Invitrogen Ref.: 11708013), que genera productes amb extrems roms. Aquests productes, fosforilats, poden ser clonats en vectors digerits amb enzims de restricció que generin extrems roms o bé poden ser digerits, si els encebadors inclouen dianes de restricció. Les condicions d'amplificació i reacció d'aquests PCR es van fer segons indicacions de la casa comercial.

4.2.- PCR-prep

Es tracta d'un mètode de selecció de colònies transformants. Consisteix en detectar les colònies que han incorporat el plasmidi mitjançant l'amplificació per PCR d'un fragment d'aquest, sense necessitat d'aïllar-lo prèviament (McPherson et al., 1991).

La mescla de reacció es va preparar segons el protocol descrit a l'apartat anterior en un volum final de 20 μ L. En aquest cas, el DNA motlle s'aporta en picar una colònia aïllada crescuda a la placa de LB/antibiòtic resultat de la transformació. Durant el cicle de desnaturalització inicial (94°C 5 min) es trenquen les parets bacterianes, deixant accessible el material genètic.

4.3.- MUTAGÈNESI DIRIGIDA

La tècnica de PCR va ser utilitzada per generar mutacions puntuals i/o introduir dianes de restricció a determinades seqüències de DNA subclonades.

4.3.1.- Introducció de dianes de restricció

Per introduir dianes de restricció a fragments de DNA ja clonats es van dissenyar oligonucleòtids que continguessin la diana de restricció desitjada en el seu extrem 5'. Aquests oligonucleòtids contenien, com a mínim, 10 nucleòtids complementaris a la regió de DNA a amplificar i 4 nucleòtids a 5' de la diana a introduir. Els PCR es van realitzar, segons les condicions adients per cada amplificació, generant molècules que contenien a 5' i/o a 3' les dianes desitjades.

4.3.2.- Introducció de mutacions puntuals amb dos oligonucleòtids

La introducció de mutacions puntuals comporta la generació d'un fragment de DNA idèntic al DNA motlle, excepte en la zona de la seqüència mutada. En aquests casos, un dels encebadors inclou la mutació i una diana de restricció present en el DNA salvatge i pròxima a la zona a mutar, i l'altre encebador inclou una segona diana de restricció de la seqüència salvatge de DNA, situada a l'altre costat de la mutació. El fragment de PCR presentat inclou la zona mutada, flanquejada per dues dianes de restricció presents també en el DNA motlle salvatge. Per digestió d'ambdues seqüències el fragment mutat pot substituir el salvatge.

4.3.3.- Introducció de mutacions puntuals per Extensió per cavalcament (*Overlap extension PCR*)

Es tracta d'una variant de la tècnica descrita en l'apartat anterior. Posada a punt per Ho et al., (1998) és utilitzada quan no es disposa de dianes de restricció pròximes a la zona a mutar. En aquesta situació, es realitzen dues reaccions de PCR independents (α i β) sobre el mateix DNA motlle, utilitzant, en cada cas, un encebador iniciador intern que conté la mutació a introduir i un encebador extern no mutat que inclou una diana de restricció de la seqüència salvatge.

Els fragments α i β amplificats se solapen en la zona mutada central i són utilitzats com a cadena motlle per un nou PCR amb els encebadors externs utilitzats en els primers PCRs. Aquesta nova reacció genera el producte γ , que inclou la mutació puntual desitjada flanquejada per dues dianes de restricció presents també a la seqüència salvatge inicial i que permet la substitució, per digestió, del fragment salvatge pel fragment mutat.

4.3.4.- **QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit** (Stratagene Ref.: 200518)

Es tracta d'un *kit* comercial que permet generar mutacions puntuals. El mètode utilitzat per aquest *kit* presenta importants avantatges respecte a les tècniques de mutagènesi dirigida per PCR convencional. En aquest cas, el DNA sintetitzat en cada cicle de la reacció no pot ser utilitzat com a motlle en cicles posteriors, reduint la probabilitat d'introduir mutacions no desitjades. Aquest mètode, basat en els treballs de Fisher i Pei (1997), permet la síntesi del DNA mutat a partir de DNA motlle de doble cadena circular, utilitzant dos encebadors complementaris entre sí i que contenen la seqüència mutada.

La síntesi de DNA és duta a terme per una DNA polimerasa d'alta fidelitat, *PfuTurbo® polymerase*. Els oligonucleòtids són estesos cap a ambdues cadenes del DNA motlle fins a copiar tot el plasmidi. En aquest punt, el discerniment entre el DNA parental i el DNA mutat es basa en el fet que el DNA sintetitzat per *E.coli* es troba metilat, a diferència del sintetitzat *in vitro*. La digestió amb l'enzim DpnI, que únicament reconeix el DNA metilat, elimina el DNA motlle de la reacció i el producte resultant, el DNA mutat, és directament transformat en cèl·lules XL-1 blue competents, segons el protocol subministrat per la casa comercial.

5.- SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA DE DNA

La seqüenciació de DNA es va realitzar utilitzant el *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, ref. 4337456). La mescla de reacció i el processament de les mostres es van fer seguint les indicacions del fabricant. Les mostres precipitades van ser processades pels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Reacció de seqüenciació (Vf=10µL)

DNA motlle	300-500 ng
Mix	1.5 µL
Tampó	1 µL
Oligonucleòtid 10µM	0.5 µL
Aigua q.s.p.	10 µL

6.- OBTENCIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES

6.1.- OBTENCIÓ D'EXTRACTES NUCLEARS A PARTIR DE CÈL·LULES EN CULTIU

Per l'obtenció d'extractes nuclears de diferents línies cel·lulars en cultiu es va seguir el mètode descrit per Andrews i Faller (1991). El procés es realitza íntegrament a 4°C. Les cèl·lules en cultiu es recullen en PBS1x i se centrifuguen durant 10seg, recuperant-se el sediment de cèl·lules. Aquest sediment es resuspèn, sense utilitzar el vòrtex, en 400µL (10^5 - 10^7 cèl·lules) del tampó A fred (Tampó hipotònic) i s'incuba en gel (10min). A continuació, es barregen amb el vòrtex les cèl·lules (10seg) i se centrifuguen (10seg). El nou sediment obtingut es resuspèn en 50µL de tampó C fred (Tampó d'alta salinitat) i s'incuba en gel (20min). Les restes cel·lulars se separen de les proteïnes nuclears (sobrenedant) mitjançant una centrifugació de 2min. Els extractes obtinguts es quantifiquen (Bradford, apartat 6.2), s'aliquoten i es guarden a -80°C.

Tampó A (Tampó hipotònic)

Hepes-KOH pH 7.9	10 mM
MgCl ₂	1.5 mM
KCl	10 mM

Tampó C (Tampó hipersalí)

Hepes-KOH pH 7.9	20 mM
Glicerol	25 %
NaCl	420 mM
MgCl ₂	1.5 mM
EDTA	0.2 mM

Abans d'utilitzar els tampons A i C cal afegir-hi inhibidors de proteases (*Inhibitor protease cocktail*, Sigma Ref.: P8340) i DTT 0.5 mM.

6.2.- QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES: MÈTODE DE BRADFORD

El mètode de quantificació de proteïnes introduït per Bradford (1976) es basa en el canvi que es produeix en l'espectre d'absorció de certs colorants, com a conseqüència de la seva adsorció sobre molècules proteiques. Aquest mètode mostra una gran sensibilitat i amplis marges de linealitat. Pel seu ús es van seguir les indicacions del fabricant de la solució (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad, ref. 500-0006), utilitzant com a proteïna patró l'albumina sèrica bovina (BSA).

6.3.- SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA – SDS (SDS-PAGE).

L'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970) és una tècnica de separació de proteïnes segons el seu pes molecular. Aquesta separació es realitza en una matriu de poliacrilamida, en condicions que assegurin la dissociació de les proteïnes en subunitats polipeptídiques individuals. La desnaturalització de les proteïnes es du a terme en presència de β -mercaptoetanol, agent reductor de ponts disulfur, i de SDS, que s'uneix a aquests polipèptids desnaturalitzats carregant-los negativament. En aquest cas, la càrrega negativa de cada polipèptid serà proporcional a la quantitat de SDS unit, que alhora serà directament proporcional al pes molecular del polipèptid. L'aplicació d'un camp elèctric en aquestes condicions fa que la migració cap a l'ànode d'aquests polipèptids es faci d'acord amb la seva mida.

Els gels d'acrilamida utilitzats en aquest treball constaven de dues fases, la fase apiladora i la fase separadora. La concentració d'acrilamida d'aquesta darrera fase es va decidir en funció dels pesos moleculars de les proteïnes a resoldre en el gel, oscil·lant entre el 5% per proteïnes d'alt pes molecular i el 15% per proteïnes molt petites. El processament de les mostres abans de sotmetre-les a l'electroforesi (30mA) inclou: la mescla amb el tampó de càrrega i la desnaturalització per ebullició durant 5 min.

Gel apilador

Acrilamida	5%
Tris-HCl pH 6.8	0.12M
SDS	0.1%
Persulfat amònic 10%	0.1%

Gel separador

Acrilamida	5-15%
Tris-HCl pH 8.8	0.37M
SDS	0.1%
Persulfat amònic 10%	0.1%

L'agent polimeritzant TEMED es van incloure en quantitats que variaven en funció de la concentració d'acrilamida des del 0.08-0.04%.

Tampó de càrrega per proteïnes 2X (Laemmli Buffer)

Tris-HCl pH 6.8	50 mM
SDS	2%
Glicerol	10%
Blau de bromofenol	0.012%
β -mercaptoetanol	5%

Tampó d'electroforesi

Tris-HCl pH 8.8	25 mM
Glicina	0.19 M
SDS	0.1%

Com a patrons de pes molecular de proteïnes es van utilitzar els marcadors Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Ref.:SM0441) i Prestained SDS-PAGE Standard High Range (Bio-rad, nº 161-0309).

6.4.- ANÀLISI DE PROTEÏNES PER IMMUNOTRANSFERÈNCIA: WESTERN- BLOT

En les tècniques de *western-blot*, les mostres proteiques són fraccionades en un gel de poliacrilamida-SDS i transferides a un suport sòlid per ser incubades amb anticossos específics que permetran la identificació de proteïnes específiques.

Després de l'electroforesi, el gel de poliacrilamida-SDS va ser col·locat en contacte amb una membrana de PVDF (*Immobilon-P*, 0,45 μ m, Millipore Ref.: IPVH00010), entre peces de paper Whatman® 3MM i dues esponges humides en tampó de transferència. El conjunt es va col·locar, submergit en tampó de transferència, en un suport entre dos elèctrodes on el gel va quedar en el càtode i la membrana encarada a l'ànode. La transferència es va realitzar en un *Mini Trans blot* (Bio-Rad) durant un temps mínim de 3 h, a 4 °C i 120 mA.

Tampó de transferència

Tris	25 mM
Glicina	0.2 M
Metanol	20% (v/v)

Un cop realitzada la transferència es va saturar la membrana amb PBS1X-0.1%Tween amb un 5% de llet en pols desnatada durant 1 hora. Seguidament, aquesta membrana va ser incubada amb l'anticòs primari i amb el secundari mantenint aquestes incubacions un temps mínim d'1 hora cada una. Entre les dues incubacions i abans de la detecció es van fer varis rentats amb PBS1x-0.1%Tween.

Durant el procés d'immunodetecció, l'anticòs primari reconeix els punts antigènics presents a la membrana i el secundari és un anticòs que reconeix la cadena pesada del primari. Aquest segon anticòs va conjugat a un enzim que permetrà la localització dels punts de la membrana on s'ha unit el primari.

En el *kit* que es va utilitzar, *EZ-ECL™ Western blotting detection reagent* (Reactiva Ref.: 20-500-120), els anticossos secundaris es trobaven conjugats a la peroxidasa de rave. Aquest enzim oxida el luminol, passant-lo d'un estat relaxat a un estat excitat, que en recuperar-se emet un tipus de llum que pot ser detectada per autoradiografia. Per detectar la presència de la proteïna a la membrana es va seguir el protocol recomanat per la casa comercial.

La immunodetecció de CPT1B es va realitzar mitjançant l'anticòs #139 (Materials, apartat 6), diluït 1:1000 en PBS1X-0.1%Tween-5%llet desnatada i un anticòs secundari contra la fracció constant de les immunoglobulines de conill marcat amb la peroxidasa de rave (*Anti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked* (Amersham Biosciences, Ref.:NA934V), diluït 1:10000.

La immunodetecció de Sp1 es va realitzar mitjançant l'anticòs monoclonal PEP-2 (Materials apartat 6), diluït 1:500 en PBS1X-0.1%Tween-3%llet desnatada i un anticòs secundari contra la fracció constant de les immunoglobulines de conill marcat amb la peroxidasa de rave (*Anti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked* (Amersham Biosciences, Ref.:NA934V), diluït 1:5000.

6.5.- TRANSCRIPCIÓ I TRADUCCIÓ *IN VITRO*

Els protocols de transcripció i traducció *in vitro* permeten obtenir proteïna directament de plasmidis de DNA que contenen els cDNAs de les proteïnes a sintetitzar. Aquestes proteïnes transcrits i traduïdes *in vitro* es van utilitzar en experiments de retardació en gel i GST-*pull-down*. Es van utilitzar plasmidis amb els cDNAs clonats immediatament després dels promotors T7 o SP6.

Els kits emprats van ser *TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation* i *TNT® SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega, ref. L1170 i L2080), respectivament. Amb aquests kits, la transcripció (RNA polimerasa) i la traducció (en lisats de reticulòcit de conill) es realitzen de manera seqüencial i simultània en un sol tub. Les incubacions es van fer seguint les instruccions de la casa comercial (30°C, 90min).

La substitució de la metionina freda de la mescla de reacció per [³⁵S]-metionina ens va permetre l'obtenció de proteïnes marcades radioactivament que van ser utilitzades en els experiments de GST-*pull-down*.

Reacció de TnT (Reacció completa Vf=50µL)

DNA plasmídic	1 µg
Extracte de reticulòcits	40 µL
Metionina	1 µL
Aigua lliures de nucleases q.s.p	50 µL

6.6.- EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ

L'expressió i purificació de proteïnes de fusió permet l'obtenció de grans quantitats de proteïnes eucariotes. Aquestes proteïnes, clonades en plasmidis específics, s'obtenen

fusionades a proteïnes de fàcil purificació. L'expressió d'aquests cDNAs es pot dur a terme en cèl·lules bacterianes o de llevat, segons el vector de clonatge.

Durant aquest treball es van expressar i purificar, a partir de cèl·lules bacterianes *E.coli* BL21, les proteïnes de fusió: GST-PPAR α , GST-PPAR δ i GST. Els cDNAs dels dos isotips de PPAR havien estat prèviament clonats en el vector pGEX-4T (Materials, apartat 4.2).

Per tal d'expressar i purificar les proteïnes de fusió, cèl·lules BL21 transformades es van fer créixer en medi LB/ampicil·lina (50mL) durant 16 hores a 37°C. Aquest pre-inòcul va ser diluït en 500mL de medi LB/ampicil·lina fresc i es va deixar créixer a 30°C fins a una O.D₆₀₀ de 1.6.

En aquest punt es va iniciar la inducció de la proteïna de fusió afegint al medi IPTG (isopropil- α -D-tiogalactosidasa) 0.5mM i mantenint el cultiu a temperatura ambient. Aquesta inducció es va repetir 4 hores més tard. Les cèl·lules van ser recollides, 16 hores després de la segona inducció, per centrifugació (7000 rpm 15 min), resuspeses en tampó NETN i lisades per sonicació (4 temps de 30 segons, 90% potència). El sonicat va ser centrifugat (15000 rpm 10 min 4°C) per eliminar les restes cel·lulars i es va iniciar la purificació de la proteïna de fusió aprofitant la capacitat de la glutatió-S-Transferasa (GST) d'unir-se al glutatió.

El sobrenedant de la centrifugació del sonicat es va incubar durant mínim 1h amb una suspensió al 50% de resina glutatió-sefarosa (Amersham Biosciences, Ref.:17-0756-01), seguint les instruccions de la casa comercial. Després de rentar tres vegades la resina amb NETN, la proteïna purificada va ser, en els punts indicats del treball, eluïda de la glutatió-sefarosa mitjançant el tampó d'elució més endavant descrit (1h 4°C en rotació) i dialitzada contra Tris-HCl 100mM pH 7.2 durant 12 hores.

Es va comprovar la integritat de la proteïna obtinguda per electroforesi en un gel SDS-PAGE i tinció amb Comassie Blue i es va quantificar pel mètode de Bradford (Mètodes, apartat 6.2). En aquells casos on la proteïna no es va eluir de la resina de glutatió-sefarosa, la integritat i la quantificació es van fer per electroforesi en un gel SDS-PAGE i tinció amb Comassie Blue.

Tampó NETN

Tris-HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	0.5%

Tampó d'elució

Tris-HCl pH 9.0	50 mM
Glutatió reduït	20 mM

7.- ASSAIGS DE RETARDACIÓ DE LA MOBILITAT ELECTROFORÈTICA (EMSA)

Els assaigs de retardació de la mobilitat electroforètica permeten determinar si una proteïna transcrita i traduïda *in vitro*, o inclosa en un extracte total o nuclear, és capaç d'unir-se a una determinada seqüència de DNA. En aquests experiments, el fragment de DNA es marca radioactivament per tal de poder-lo revelar en una autoradiografia. Després de posar en contacte el DNA amb la proteïna i sotmetre les mostres a una electroforesi en un gel de poliacrilamida, la

unió de la proteïna al fragment de DNA dóna lloc a un complex de mobilitat reduïda, respecte al fragment de DNA lliure de proteïna en les mateixes condicions.

7.1.- MARCATGE DEL FRAGMENT DE DNA

Es van marcar fragments de DNAs. Aquestes sondes eren oligonucleòtids específics hibridats entre si i marcats per *fill-in* amb la DNA polimerasa klenow i [α - 32 P]dCTP (Mètodes, apartat 2.6.1), si presentaven extrems 5' protuberants, o per fosforilació terminal amb la polinucleòtid cinasa del bacteriòfag T4 i [γ - 32 P]dCTP (Mètodes, apartat 2.6.2), si els extrems eren roms.

7.2.- PREPARACIÓ DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Es van utilitzar gels no desnaturalitzants de baixa força iònica (TBE 0.5x) de poliacrilamida al 4.5%.

Gel de retardació (Vf=40mL)

TBE5x	4 mL (0.5x)
Acilamida/bis 40 % (29:1)	4.5 mL (4.5%)
TEMED	37 μ L (0.925 μ L/mL)
Persulfat amònic 30 %	200 μ L (0.15%)

7.3.- REACCIÓ D'UNIÓ DE LA PROTEÏNA AL DNA MARCAT

Les proteïnes transcrits i traduïdes *in vitro* i/o els extractes nuclears van ser pre-incubats amb el tampó d'unió i 100ng/ μ L de Poly(dI-dC) 10 min en gel i 5 min a temperatura ambient. Posteriorment, es van afegir 4ng de sonda marcada (2 μ L) a les mostres i es van incubar 20min en gel.

Reacció d'unió (Vf=20 μ L)

TNT / extractes nuclears	2 μ L
Tampó d'unió 5x	4 μ L
Poly(dI-dC) (1 μ g/ μ L)	2 μ L
Sonda marcada	2 μ L
Aigua q.s.p	20 μ L

En preparar les reaccions d'unió es va preparar també una mostra on se substituïa el TnT per la quantitat equivalent, en volum, d'extracte de reticulòcit. En el cas d'extractes nuclears la quantitat equivalent, en volum, s'afegia d'aigua.

Tampó d'unió PPAR/RXR 1x

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
KCl	40 mM
Nonidet P-40	0.05% (v/v)
Glicerol	6%
Ditiotreitol (DTT)	1 mM

Tampó d'unió MEF-2C 1x

Tris-HCl (pH 8.0)	10mM
KCl	100 mM
Nonidet P-40	0.05% (v/v)
Glicerol	6%
Ditiotreitol (DTT)	1 mM

7.4.- ELECTROFORESI DE LES MOSTRES

Les mostres no van requerir cap mena de tampó de càrrega donat l'alt contingut en glicerol del tampó d'unió. L'electroforesi es va realitzar a 4°C i 30mA després d'haver sotmès el gel buit a un *pre-running* de 30mA durant 20 min. Per seguir l'evolució de l'electroforesi paral·lelament a les mostres es va carregar un colorant (blau de bromofenol). En acabar el procés electroforètic, els gels es van assecar sobre paper *Whatman*®3MM en un assecador Bio-Rad i van ser exposats a una pel·lícula autoradiogràfica.

7.5.- EXPERIMENTS DE SUPER-RETARDACIÓ

Aquests experiments es basen en el reconeixement dels complexos proteïna-DNA per un anticòs específic, que formarà un nou complex anticòs-proteïna-DNA amb mobilitat retardada respecte l'anterior. Si la unió de l'anticòs impedeix la formació de dímers o la unió proteïna-DNA, el que s'observa és la desaparició de la banda que correspon al complex proteïna-DNA. Per realitzar aquests experiments 1µL d'anticòs era afegit a la reacció d'unió.

8.- ASSAIGS DE GST PULL-DOWN

Els assaigs de GST *PULL-DOWN* permeten descriure interaccions proteïna-proteïna *in vitro*, estant una de les proteïnes fusionada a la Glutatió-S-Transferasa (GST). El mètode es basa en posar en contacte la proteïna de fusió amb una segona proteïna i purificar els complexos proteics formats entre ambdues, aprofitant la unió de la GST al glutatió. La presència o no de la segona proteïna unida a la proteïna de fusió serà revelada mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS seguit de fluorografia o *western blot*.

8.1.- REACCIÓ D'UNIÓ

En aquells experiments on la proteïna de fusió no havia estat eluïda de les boles de glutatió-sefarosa es van incubar quantitats equivalents de proteïna de fusió GST o proteïna GST amb proteïna traduïda i transcrita *in vitro* o amb extractes nuclears.

En aquells experiments on la proteïna de fusió havia estat eluïda i quantificada pel mètode de Bradford es van incubar les quantitats de proteïna de fusió indicades en cada cas amb proteïna traduïda i transcrita *in vitro* o amb extractes nuclears, afegint a la mescla de reacció 50µL de resina glutatió sefarosa per la posterior purificació. Les mostres es van incubar en 1mL de tampó d'unió durant 4h a 4°C en rotació.

Reacció d'unió

GST eluïda	50 µg
TnT	4 µL
Sefarosa 50%	50 µL
Tampó d'unió q.s.p	1 mL

Tampó d'unió (preparació extemporània)

Llet desnatada	0.5%
DTT	1mM
Inhibidors de proteases	1x
NETN	q.s.p

8.2.- RECUPERACIÓ DELS COMPLEXES PROTEÏNA GST-PROTEÏNA I DETECCIÓ DE LA INTERACCIÓ

La reacció d'unió es va mantenir en rotació durant 4h a 4°C. Després de la incubació les mostres van ser centrifugades a 2000 rpm, 1 min. La resina obtinguda es va rentar a temperatura ambient amb NETN dues vegades i es va barrejar amb tampó de càrrega de proteïnes per poder ser resolta en un gel de poliacrilamida-SDS. La interacció es va detectar per fluorografia, si es tractava de TnT radioactius, o per *western blot* (Mètodes, apartat 6.4), si la incubació s'havia fet amb extractes nuclears.

8.3.- FLUOROGRAFIA

Aquesta tècnica s'utilitza per detectar proteïnes resoltes en un gel de poliacrilamida-SDS marcades radioactivament amb [³⁵S]-metionina.

Després de la reacció d'unió (Mètodes, apartat 8.1) i l'electroforesi (Mètodes, apartat 6.3) el gel va ser fixat amb una solució d'àcid acètic al 7% durant com a mínim 1 hora i deshidratat amb DMSO (dos rentats de 30min). Seguidament, el gel es va incubar durant 3h amb una solució de PPO al 20% en DMSO per finalment rehidratar-lo amb aigua durant 1h. El gel rehidratat es va mantenir durant 30min submergit en una solució de glicerol 5%/metanol 30%, intentant minimitzar les possibilitats de trencament en sotmetre'l al procés d'assecamment (80°C 120min en un assecador per buit de BioRad). Un cop sec, el gel es va exposar a una pel·lícula autoradiogràfica.

9.- CULTIUS CEL·LULARS I TRANSFECCIONS

L'estudi de la regulació transcripcional de promotors per factors de transcripció i/o determinats tractaments es va dur a terme mitjançant transfeccions transitòries de cèl·lules eucariotes. Promotors clonats en plasmidis reporters i factors de transcripció clonats en vectors d'expressió van ser introduïts a cèl·lules eucariotes. Es va utilitzar com a gen reporter el gen *Luc* de la cuca de llum (*Photinus pyralis*). Aquests experiments permeten, mesurant la quimioluminescència produïda per l'activitat enzimàtica luciferasa en els extractes cel·lulars, calcular l'activitat promotora d'una construcció i l'efecte de diferents factors de transcripció o de tractaments.

9.1.- CONDICIONS DE CULTIU DE LES LÍNIES CEL·LULARS**C2C12**

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 10x	1x
Glucosa ¹	4.5 g/L
Glutamina ¹	4 mM
Bicarbonat sòdic	1.5 g/L
Piruvat sòdic	10 mM
Penicil·lina ³	100 U.I./mL
Estreptomicina ³	0.1 mg/mL
FBS(manteniment) / HS(diferenciació)	10% / 10%

CV-1/COS-7

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 10x	1x
Glucosa ¹	4.5 g/L
Glutamina ²	6 mM
Bicarbonat sòdic	3 g/L
Penicil·lina ³	100 U.I./mL
Estreptomicina ³	0.1 mg/mL
FBS	10%

CHO

Ham's-F12	1x
Glucosa ¹	4.5 g/L
Glutamina ²	6 mM
Bicarbonat sòdic	3 g/L
Penicil·lina ³	100 U.I./mL
Estreptomicina ³	0.1 mg/mL
FBS	10%

¹El DMEM (GibcoBRL Ref.: 52100-021) ja inclou aquestes quantitats de glutamina i glucosa i per tant no cal afegir-les en preparar el medi de cultiu.

²En el cas de les cèl·lules CV-1 sí que es va suplementar el medi amb L-Glutamina 2mM.

³La solució Penicil·lina- Estreptomicina 10.000 UI/mL (GibcoBRL Ref.: 15140-122) correspon a una solució 10 vegades concentrada respecte a la concentració final desitjada d'antibiòtics en el medi de cultiu.

Les cèl·lules es van créixer adherides a una placa, a 37°C i 5% CO₂, en un incubador humidificat. Periòdicament, les cèl·lules van ser tripsinitzades i diluïdes en funció del número de present en una placa confluent i del tipus d'experiments a realitzar. Es va treballar en campana estèril de flux laminar amb reactius i material estèrils.

Les cèl·lules es van conservar congelades en nitrogen líquid. Un cop tripsinitzades i centrifugades (1500rpm 5min), les cèl·lules a congelar es van resuspendre en medi de creixement suplementat amb 5-10% de Dimetilsulfòxid (DMSO), segons indicacions de l'ATCC. El procés de congelació es va realitzar en un criotub, disminuint la temperatura de les cèl·lules gradualment durant 2-3 dies, mantenint-les a -80°C en un tanc d'isopropanol.

Les cèl·lules es van descongelar a 37°C, augmentant la temperatura ràpidament. El contingut d'un vial congelat de les línies amb què es va treballar es va resuspendre en 10 mL de medi de creixement fresc i es va afegir a una placa de 10mm. El medi va ser canviat quan les cèl·lules es van haver adherit (5-6 h) per tal d'eliminar el DMSO.

9.2.- DIFERENCIACIÓ DE CÈL·LULES C2C12

La línia cel·lular C2C12 és una línia de múscul esquelètic de ratolí amb morfologia de fibroblast i susceptible de diferenciar-se a miotubs. La població mioblàstica present es diferencia a miotubs en presència de sèrum de cavall substituint l'habitual sèrum fetal boví del medi de cultiu. La diferenciació és completa 6 dies després del canvi de medi i cal iniciar-la quan les cèl·lules es troben a un 80-90% de confluència. El medi de diferenciació va ser substituït per medi fresc cada 48h. Durant aquest període de temps les cèl·lules no poden ser tripsinitzades.

9.3.- TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA

La transfecció transitòria permet la introducció de DNA a l'interior de cèl·lules eucariotes durant un període de temps curt (2-3 dies). Existeixen diferents mètodes de transfecció que s'escolliran, en funció de la durada de l'expressió requerida (transfecció estable o transitòria) i del tipus de cèl·lula a transfectar.

9.3.1.- MÈTODE DEL FOSFAT CÀLCIC

Per transfectar les cèl·lules CV-1/COS-7/CHO es va utilitzar el mètode del fosfat càlcic (Wigler et al., 1977; Maitland et al., 1977). Aquest mètode es basa en la formació de precipitats de DNA que poden ser internalitzats per la cèl·lula. El DNA co-precipita amb el fosfat càlcic, que l'engloba i facilita la seva entrada a la cèl·lula fins al nucli. Un cop en el nucli, els plasmidis utilitzen la maquinària de la cèl·lula per expressar els gens clonats.

En aquest cas, les cèl·lules van ser plaquejades 24h abans de la transfecció, a una densitat de $0.5 \cdot 10^5$ cèl·lules / placa de 35mm (*Multiwells* 6 pous; NUNC, Ref.:150239), i van ser recollides 48h després de la transfecció. Tots els punts de cada experiment es van realitzar per duplicat.

9.3.1.1.- Preparació dels precipitats DNA-fosfat càlcic

Els precipitats de transfecció es van preparar a partir de dues solucions, A i B, que contenien, respectivament, el DNA a transfectar i el tampó fosfat i que, barrejades, donarien lloc als cristalls de DNA-fosfat càlcic que la cèl·lula és capaç d'internalitzar.

Per realitzar la mescla de les dues solucions es va afegir la solució A (DNA-clorur càlcic), gota a gota i en agitació constant sobre la solució B (HBS2x). En tot moment cal evitar la formació de concentracions locals elevades de clorur càlcic que provocarien la precipitació brusca del DNA i la reducció de l'eficiència de transfecció. Els precipitats formats van ser incubats a temperatura ambient durant 20 min., abans d'afegir-los al medi de cultiu de les cèl·lules a transfectar.

Solució A (per plaques de 35mm)

DNA	3-5 µg
CaCl ₂ 2M	12.5 µL
Aigua q.s.p.	125 µL

Solució B (per plaques de 35mm)

HBS2x	125 µL
-------	--------

Generalment, en plaques de 35mm es van transfectar: 2µg de plasmidi reporter i 40ng de plasmidi control de la transfecció (pRL-CMV). La quantitat de plasmidi d'expressió dels factors de transcripció va variar segons el factor de transcripció transfectat (0.2-1µg). La quantitat de DNA transfectat a cada punt d'un mateix experiment es va ajustar amb DNA de salmó o vector buit perquè sempre fos la mateixa.

HBS2X (Hepes Buffered saline) pH 7.1

HEPES pH7.1	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1.5 mM

PBS (Phosphat Buffered Saline) pH 7.1

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	4.3 mM
KH ₂ PO ₄	1.4 mM

9.3.1.2.- Transfecció de les cèl·lules

Les cèl·lules es van incubar amb els precipitats de DNA-fosfat càlcic 12-16h i posteriorment, van ser rentades amb PBS1x per tal d'eliminar els precipitats no internalitzats. Les cèl·lules transfectades van ser recollides i lisades 48h després de la transfecció.

9.3.2.- TRANSFECCIÓ AMB REACTIUS LIPÍDICS COMERCIALS

Els mètodes de transfecció amb reactius lipídics van ser utilitzats en aquelles línies que presentaven eficiències de transfecció baixes amb el mètode del fosfat càlcic. Les cèl·lules C2C12 van ser transfectades amb el reactiu comercial FuGENE[®]6 (Roche, ref. 18115075). Aquest sistema de transfecció es basa en l'embolcallament del DNA per lípids catiónics que faciliten l'entrada del DNA a la cèl·lula.

Les transfeccions amb FuGENE[®]6 es van realitzar segons les indicacions de la casa comercial, preparant primer els complexos DNA-FuGENE[®]6 i dipositant-los, després, sobre les cèl·lules a transfectar.

Les cèl·lules C2C12 van ser plaquejades 24h abans de cada transfecció a una densitat de 2.5-3x10⁵ cèl·lules / placa de 35mm (*Multiwells* 6 pous; NUNC, Ref.:150229) i recollides entre 48-72h després de la transfecció, segons s'indica en cada experiment. Tots els punts de cada experiment es van realitzar per duplicat.

9.3.2.1.- Preparació dels complexos DNA--FuGENE 6

Els complexos DNA-FuGENE[®]6 es van preparar a partir de dues solucions, A i B, que contenien, respectivament, el DNA a transfectar i el FuGENE[®]6. La solució B (reactiu lipídic + medi de cultiu lliure de sèrum) es va preparar en condicions d'esterilitat i es va deixar reposar a temperatura ambient durant 5 min abans d'afegir-la sobre la solució A (DNA). La mescla de transfecció es va incubar durant 20 min a temperatura ambient i es va afegir sobre el medi de cultiu de les cèl·lules a transfectar.

Solució A

FuGENE®6	2.5 µL/µg DNA transfectat
DMEM lliure de sèrum q.s.p	100 µL/cada 2 mL de medi de cultiu

Solució B

DNA	3-5 µg DNA
-----	------------

Generalment, en plaques de 35mm es van transfectar: 2µg de plasmidi reporter i 40ng de plasmidi control de la transfecció (pRL-CMV). La quantitat de plasmidi d'expressió dels factors de transcripció va variar segons el factor de transcripció transfectat (0.2-1µg). La quantitat de DNA transfectat a cada punt d'un mateix experiment es va ajustar amb DNA de salmó o vector buit perquè sempre fos la mateixa.

9.3.2.2.- Diferenciació de les cèl·lules transfectades

Les cèl·lules C2C12 transfectades van ser rentades amb PBS1x 24h després de la transfecció, exceptuant casos puntuals que s'indiquen en el treball, on aquesta incubació va ser menor. Després del rentat, es va iniciar la diferenciació de les cèl·lules canviant el medi de manteniment (DMEM 10%FBS) pel de diferenciació (DMEM 10%HS). Les cèl·lules es van recollir i lisar 48h després d'iniciar la diferenciació.

9.3.2.3.- Transfecció de cèl·lules diferenciades o en medi de diferenciació

En el cas de transfectar cèl·lules diferenciades, o en diferenciació, la preparació dels complexos i el procés de transfecció va ser el mateix. Les cèl·lules es van mantenir en el medi de diferenciació i es van recollir 48h després de la transfecció. En aquest cas, no va ser necessari el rentat amb PBS1x ja que el medi era el mateix abans i després de la transfecció.

En aquells experiments on les cèl·lules no estaven diferenciades, però interessava recollir la transfecció 48h després d'haver afegit els complexos DNA-FuGENE®6, es va canviar el medi de les cèl·lules en el moment que es van afegir els precipitats, iniciant la diferenciació en el mateix moment que la transfecció.

9.4.- OBTENCIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS I ASSAIG D'ACTIVITAT LUCIFERASA

Les cèl·lules transfectades per qualsevol dels mètodes de transfecció descrits van ser, passats els temps d'incubació apropiats (48-72h), lisades per tal de determinar l'activitat luciferasa present en els extractes cel·lulars.

La lisi cel·lular es va realitzar amb 400µL/per placa de 35mm d'un tampó de lisi passiva comercial (*Passive Lysis Buffer*, Promega, Ref.: E1941). Els extractes cel·lulars obtinguts van ser assajats amb el kit comercial *Dual-Luciferase™ Reporter Assay System* (Promega REF: E1960), seguint les instruccions de la casa comercial. En general es van analitzar 10µL d'extracte cel·lular amb 20µL de cada un dels reactius, segons indicacions de la casa comercial. Es van obtenir així, els valors de luciferasa de *Photinus pyralis* (representativa de l'activitat del promotor o de la regió promotora estudiada) i de *Renilla reniformis* (control intern de transfecció i utilitzat en molts casos per normalitzar els valors de la primera). Les mesures de luminescència es van realitzar en un luminòmetre Sirius de Berthold Detection System.

10.- CULTIU DE LLEVATS I TRANSFORMACIÓ DE *Pichia pastoris*

Les cèl·lules de llevat (*Pichia pastoris* GS115) utilitzades en aquest treball es van créixer en medi YPD (Materials, apartat 2). Les colònies transformades es van créixer en medi selectiu YND.

YND

Extracte de llevat sense aminoàcids ni sulfat amònic	0.17%
Sulfat amònic	0.25%
Dextrosa	0.5%

(Les plaques de LB sòlid contenen un 1.5% d'agar).

La introducció de DNA exogen a cèl·lules de llevat (transformació) es va realitzar amb l'objectiu d'expressar l'enzim CPT1 en un sistema heteròleg lliure d'activitat CPT endògena. Es tracta de cèl·lules de creixement relativament ràpid i de processament proteic similar al de les cèl·lules de mamífer. El procés de transformació és, conceptualment, idèntic al de les cèl·lules bacterianes. Cal obtenir cèl·lules competents, forçar l'entrada de DNA, en aquest cas per electroporació enlloc de per xoc tèrmic, seleccionar les colònies transformades en un medi selectiu i caracteritzar-les com colònies recombinants positives.

10.1.- PREPARACIÓ DE CÈL·LULES ELECTROCOMPETENTS

Les cèl·lules de *P.pastoris* GS115 es van créixer en 500mL de YPD fins a una OD₆₀₀ de 1.3-1.5. Cal tenir present que cal posar varis pre-inòculs de volums diferents (10-50mL) la nit anterior, per tal de tenir-ne algun amb la densitat òptica adequada per posar l'inòcul de 500mL. El temps de duplicació d'aquesta soca de llevat és de 2h.

En arribar a la densitat òptica desitjada, les cèl·lules van ser centrifugades (5000rpm 5 min) i rentades amb 500 i 250 mL d'aigua MilliQ autoclavada a 4°C i 20mL de sorbitol 1M fred. Les cèl·lules es van resuspendre en 0.5mL de sorbitol 1M per ser electroporades. No és aconsellable congelar aquestes cèl·lules per usos posteriors. Tot el procés d'obtenció de cèl·lules electrocompetents es va realitzar en gel, sota flama i amb els reactius a 4°C.

10.2.- PREPARACIÓ DEL DNA

El DNA plasmídic a electroporar (els cDNAs de la CPT1 estudiada clonats en el vector pHOW10) va ser prèviament linealitzat. Es va utilitzar l'enzim de restricció AvrII que talla en un sol punt del promotor de la gliceraldehid-3-fosfat i permet la posterior integració del DNA introduït en el gen de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa per recombinació homòloga. 2-5µg de DNA plasmídic van ser digerits, precipitats amb etanol absolut-acetat amònic 3M pH 5.2 i resuspesos en aigua (10µL).

10.3.- ELECTROPORACIÓ

Les cèl·lules competents de llevat van ser transformades per electroporació. Una alíquota de la suspensió de cèl·lules electrocompetents (150µL) es va incubar en gel amb 5µL del DNA lineal a introduir (1µg) durant 5 min. L'electroporació es va realitzar amb un *Electro Cell Manipulator*[®] 600, (BTX Inc.), seguint les instruccions del fabricant (2,45 kV i 129 ohm per tal de generar un pols de 7,5 kV/cm i 5msec). Immediatament després, es va afegir a les mostres 1mL de sorbitol

1M. Les cèl·lules van ser plaquejades en medi sòlid selectiu YND i es van fer créixer les colònies a 30°C un mínim de 48-72h.

10.4.- SELECCIÓ DE TRANSFORMANTS

La selecció de recombinants es va fer per creixement de colònies en un medi selectiu deficient en aminoàcids. La integració en el genoma de *P.pastoris* del gen *his* del vector plasmídic pHWO10 per recombinació homòloga converteix aquestes cèl·lules en autòtrofes per histidina. Aquesta característica fa que les cèl·lules transformades puguin créixer en un medi deficient en aminoàcids que són essencials per la soca no transformada. Les colònies del medi selectiu van ser confirmades com a positives obtenint mitocondris i comprovant que els mitocondris aïllats expressaven la proteïna CPT1 (*Western Blot*) i que l'enzim tenia activitat.

11.- OBTENCIÓ DE MITOCONDRIS DE *Pichia pastoris*

L'obtenció de mitocondris de cèl·lules de *Pichia pastoris* transformades es va realitzar amb els objectius de comprovar l'expressió de CPT1 en els possibles clons positius de l'electroporació i d'assajar l'activitat de l'enzim, tant per comprovar que les colònies transformades expressaven un enzim funcional, com per caracteritzar cinèticament els enzims expressats.

Un inòcul de 500mL de YND es va fer créixer durant una nit (aproximadament 16h) fins a una OD₆₀₀ de 1-2, després de dos pre-inòculs menors anteriors (el primer de 16h i el segon de 8h). Els temps de creixement dels inòculs es van calcular tenint en compte que el temps de duplicació de la soca GS115 de *P. pastoris* és de 2h.

En assolir l'O.D desitjada, les cèl·lules van ser centrifugades (5000rpm 5min) a 4°C i rentades tres vegades amb aigua destil·lada (de Vries et al., 1997). Els sediments obtinguts van ser resuspesos en el mínim volum possible de tampó de boles de vidre i barrejats amb les boles de vidre (*unwashed glass beads 450-600µm*, Sigma, Ref.:G9268), segons la relació 2:1 (pes/pes) de boles de vidre i sediment de cèl·lules sec. Les cèl·lules van ser lisades amb 8-10 cicles 1min vòrtex/ 1 min gel i centrifugades (2800 rpm 20min) a 4°C. El sobrenedant obtingut va ser centrifugat a 15000 rpm durant 40min a 4°C per obtenir el sediment de mitocondris. Aquest sediment va ser resuspès en el tampó descrit, quantificat pel mètode de Bradford i conservat a -80°C (Zhu et al, 1997a).

Tot el protocol es va realitzar a 4°C. Les boles de vidre utilitzades van ser rentades amb àcid clorhídric i neutralitzades i assecades abans del seu ús.

Tampó de boles de vidre

HEPES pH 7.8	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM
Glicerol	10%
PMSF*	1 mM
Inhibidors de proteases 1000x*	1x

*El còctel d'inhibidors de proteases (Sigma) i el PMSF es van afegir en el moment d'utilitzar el tampó.

12.- ASSAIG D'ACTIVITAT CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA

L'activitat CPTI va ser assajada pel mètode de l'intercanvi directe utilitzant L-[³H]carnitina (Bremer et al., 1985). Les reaccions es van realitzar en un volum final de 500µL, tenint en compte el volum de mitocondris, el volum de malonil-CoA, o vehicle, en els assaigs d'inhibició i els diferents volums de palmitoïl-CoA o carnitina en els assaigs d'afinitat al substrat.

Mescla de reacció

HEPES pH 7.0	20 mM
Albúmina lliure d'àcids grassos	1%
Palmitoïl-CoA 2.5mM	80 µM
L-[³ H]carnitina 5mM	0.2-1 mM (≅ 5000 dpm/nmol)
KCl q.s.p	500 µL (40-75mM)

El clorur potàssic (KCl) es va utilitzar per ajustar el volum de reacció a 0.5mL. Es van preparar solucions de KCl a diferents concentracions per tal que, variant la concentració inicial, la seva concentració final sempre es mantingués entre 40-75mM. La concentració de L-[³H]carnitina va ser diferent segons l'enzim assajat. Els isotips hepàtics, per les seves característiques cinètiques d'alta afinitat per la carnitina, es van assajar a concentracions de 0.2mM. Els isotips musculars es van assajar amb concentracions superiors de carnitina (1mM), per presentar una baixa afinitat per aquest substrat. És important destacar que, excepte en les reaccions on s'estudiava l'afinitat per palmitoïl-CoA, en tots els casos es mantenia una relació molar constant entre palmitoïl-CoA i albúmina (0.61:1).

Les reaccions es van incubar a 30°C durant 3 minuts, a partir del moment en què s'afegien els mitocondris (100µg) sobre la mescla de reacció, i es van aturar amb 4mL d'àcid perclòric al 6%. Després de centrifugar les mostres (2000 rpm 5min), els sediments obtinguts van ser resuspendos en 1.6mL d'aigua freda (4°C). A continuació, es van afegir a cada tub 1mL de n-butanol, per extreure el producte de la reacció ([³H]palmitoïlcarnitina), i 0.4mL d'àcid perclòric al 6%. 0.5mL de la fase no aquosa van ser transferits a un vial de comptatge radioactiu, després de centrifugar les mostres (2000 rpm 3min).

12.1.- IC₅₀ PER MALONIL-CoA

La constant d'inhibició (IC₅₀) del malonil-CoA es va obtenir assajant mitocondris en presència de concentracions creixents de malonil-CoA. En aquests experiments es van mantenir constants les concentracions de palmitoïl-CoA (80µM) i de carnitina (0.2mM per isotips hepàtics i 1mM per isotips musculars).

El percentatge d'activitat es va representar en funció de la concentració de malonil-CoA. Es va considerar el 100% l'activitat de l'enzim en els punts d'assaig on no hi havia inhibidor. Les dades es van graficar com a corbes exponencials (escala lineal) o com a corbes de competició (escala logarítmica) per calcular la IC₅₀.

12.2.- K_m I V_{max} PER PALMITOÏL-CoA

La constant d'afinitat pel palmitoïl-CoA (K_m) es va obtenir assajant mitocondris en presència de concentracions creixents de palmitoïl-CoA, mantenint constant la concentració de carnitina (0.2mM per isotips hepàtics i 1mM per isotips musculars). La concentració d'albúmina lliure d'àcids grassos es va augmentar proporcionalment a la concentració de palmitoïl-CoA per tal de

mantenir la relació molar de 6.1:1 (palmitoïl-CoA: albúmina). Cal observar que en aquests assaigs aquesta relació molar és 10 vegades superior a la relació en les condicions estàndards de reacció (0.61:1).

L'activitat específica de cada punt d'assaig es va representar respecte la concentració de substrat (palmitoïl-CoA). Les dades es van representar en una corba hiperbòlica per obtenir els valors de K_m i V_{max} .

12.3.- K_m I V_{max} PER CARNITINA

La constant d'afinitat de la carnitina (K_m) es va obtenir assajant mitocondris en presència de concentracions creixents de carnitina. L'activitat específica de cada punt d'assaig es va representar respecte la concentració de substrat (carnitina). Les dades es van representar en una corba hiperbòlica per obtenir els valors de K_m i V_{max} .

La velocitat màxima (V_{max}) en els assaigs de palmitoïl-CoA va resultar superior a l'obtinguda en els assaigs de carnitina, tot i que teòricament la V_{max} d'una CPTI assajada hauria de ser la mateixa encara que variïn les concentracions dels substrats. Aquesta variació és deguda al canvi en la relació molar palmitoïl-CoA:albúmina que es dona en els assaigs de K_m per palmitoïl-CoA (6.1:1 vs 0.61:1) respecte als assaigs de K_m per carnitina. Aquest augment de deu vegades en la relació molar va fer que la concentració de palmitoïl-CoA lliure en aquestes reaccions fos superior i per tant la V_{max} també.

13.- MICROINJECCIÓ D'OÒCITS DE *Xenopus laevis*

L'extracció d'oòcits de *Xenopus laevis* la van realitzar a l'estabulari de la Facultat de Biologia membres del grup dels Doctors Manuel Palazín i Antonio Zorzano. La microinjecció es va fer a la Facultat de Biologia amb la col·laboració del Doctor Joan Bertran.

13.1.- OBTENCIÓ DE DNA DE CADENA SIMPLE. M13K07 HELPER PHAGE (Amersham Biosciences Ref.:27-1524)

Per tal d'obtenir DNAss es va clonar la regió promotora del gen humà de la CPT1B utilitzada al llarg d'aquest treball en el vector pBSSK (Materials, apartat 4.1). Els vectors pBSSK contenen una zona intergènica de 454bp del fag F1 que permet que aquests fagèmids siguin recuperats en una soca que tingui l'episoma F'. La recuperació del DNAss és possible gràcies a l'ajuda d'un fag ajudant (*helper phage*). Es va utilitzar el fag ajudant M13K07 i l'obtenció de DNAss es va fer seguint el protocol descrit per la casa comercial. La concentració de DNAss obtinguda es va determinar per espectrofotometria a 260nm tenint en compte que 1 O.D equival a 40µg/mL.

13.2.- MICROINJECCIÓ D'OÒCITS DE *Xenopus laevis*

Cada oòcit de *Xenopus laevis* va ser injectat amb 2ng de DNA, 0.6ng del promotor a estudiar fusionat al gen reporter *Luc*, com a DNA de cadena senzilla (DNAss) i els plasmidis d'expressió dels diferents factors de transcripció com a DNA de cadena doble (DNAds) (0.08-0.4ng). Com a control intern d'injecció i expressió es va afegir el plasmidi reporter de la renilla (*Renilla reniformis*) (0.02ng). En general es preparaven 20µL de mescla i es punxaven 20nL a cada oòcit.

MATERIALS I MÈTODES

Els oòcits extrets de l'ovari de l'animal van ser resuspendos en medi ORII i separats de les restes tissulars i els uns dels altres amb col·lagenasa. Es van incubar 12-16 hores a 18°C en medi BARTH'S i es van seleccionar, per injectar, els oòcits que es trobaven en estadi IV de desenvolupament. Els oòcits escollits van disposar-se en una placa de petri amb medi BARTH'S i van ser injectats en el pol animal (pol negre) amb un microinjector automàtic (20nL per oòcit).

Els oòcits injectats van ser incubats en medi BARTH'S a 18°C 72h i recollits i lisats amb el tampó de lisi passiva descrit pels assaigs de luciferasa (Mètodes, apartat 9.4). Els extractes obtinguts de la lisi van ser centrifugats i en els sobrenedants es va determinar l'activitat promotora de la construcció injectada per la luminescència emesa per la proteïna reportera luciferasa. Les mesures es van realitzar en un luminòmetre model Sirius de Berthold Detection Systems.

Medi ORII (Ajustat a pH 7.5 amb NaOH)

NaCl	82.5 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂ 6*H ₂ O	1 mM
Hepes pH7.5	5 mM

Medi BARTH's

KCl	1 mM
MgSO ₄	0.82 mM
CaCl ₂	0.41 mM
Ca(NO ₃) ₂	0.33 mM
NaHCO ₃	2.4 mM
Hepes pH7.5	10 mM
NaCl	88 mM
Gentamicina	20 mg/L
Tetraciclina	50 mg/L

RESULTATS

REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *CPT1B*

**1.- INTERACCIÓ FUNCIONAL ENTRE PPAR α I MEF-2C EN L'ACTIVACIÓ
TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *CPT1B* HUMÀ
(ARTICLE-1-)**

4742–4749 Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 16 doi:10.1093/nar/gkh806

**Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptors- α
and Mef-2C on human carnitine palmitoyltransferase 1b (*CPT1B*) gene
activation**

Ángel Baldán, Joana Relat, Pedro F. Marrero and Diego Haro*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona,
Avenue Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

Received as resubmission July 21, 2004; Accepted August 17, 2004

RESUM

L'enzim CPT1B és considerat el principal punt de control de la β -oxidació mitocondrial d'àcids grassos. Estudis previs havien identificat, en el promotor del gen humà, un element funcional de resposta a receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR) i un lloc d'unió a factors miogènics de la família MEF-2. Tenint en compte que el gen de la CPT1B s'expressa preferentment en múscul i que l'element de resposta a MEF-2 ha estat descrit en els promotors de nombrosos gens múscul-específics, ens vam plantejar caracteritzar el paper funcional d'aquestes seqüències sobre el promotor de la CPT1B.

Per tal d'estudiar els mecanismes de regulació transcripcional del gen *CPT1B* es van generar construccions reporterres amb els vectors pGL3basic i pGL3promoter i fragments del promotor humà, salvatge o mutat. Es van transfectar transitòriament cèl·lules C2C12 (musculars) i/o CV-1 amb aquestes construccions i amb els vectors d'expressió dels factors de transcripció PPAR α , RXR α i MEF-2C i es va analitzar l'activitat promotora de cada una d'elles. Per determinar la capacitat d'aquests elements de resposta d'unir els factors de transcripció descrits, es van realitzar experiments de retardació en gel (EMSA) amb sondes de DNA corresponents als elements MEF-2 i PPRE i proteïnes transcrites i traduïdes *in vitro*. Finalment, es va analitzar la interacció física entre PPAR α i MEF-2C amb experiments de GST-pull-down.

En iniciar aquest treball, i en base al PPRE funcional descrit, es van realitzar transfeccions transitòries de cèl·lules CV-1 i C2C12 amb la construcció reportera que contenia la regió del promotor de la CPT1B més llarga que hem estudiat (380bp) i els vectors d'expressió de PPAR α i RXR α . Els resultats van mostrar la diferent capacitat de transactivar de l'heterodímer PPAR α /RXR α segons el context cel·lular, indicant la presència, a les cèl·lules musculars, de proteïnes implicades en l'activació màxima del gen.

La funcionalitat de l'element de resposta a MEF-2 es va demostrar: (I) amb gels de retardació de la mobilitat electroforètica utilitzant el lloc d'unió a MEF com a sonda i la proteïna transcrita i traduïda *in vitro* i (II) amb experiments de transfecció transitòria de cèl·lules CV-1 i C2C12. Sobre cèl·lules CV-1, l'element MEF-2 clonat en pGL3promoter mostrava la capacitat transactivadora d'aquesta seqüència en presència de proteïna MEF-2C. Sobre cèl·lules C2C12, el promotor humà de la CPT1B clonat en pGL3Basic amb l'element de resposta a MEF-2 mutat no responia a MEF-2C. Paral·lelament, transfeccions transitòries de C2C12 amb la construcció reportera del promotor de la CPT1B amb l'element MEF-2 mutat, en presència o absència dels vectors d'expressió de PPAR α i RXR α , van indicar la necessitat de MEF-2C en l'activació transcripcional del gen per l'heterodímer PPAR α /RXR α .

A partir d'aquests resultats, es va generar una construcció reportera amb el gen *Luc* sota el control d'un promotor de la CPT1B on els elements de resposta a PPAR i a MEF-2 s'havien separat mitja volta de DNA (5bp). Els experiments de transfeccions transitòries de cèl·lules C2C12 amb aquesta construcció, en presència o absència dels vectors d'expressió de PPAR α i RXR α , van mostrar que l'activació transcripcional observada per l'heterodímer depèn de la disposició espacial del promotor. Els experiments de GST-*pull-down* van permetre descriure la interacció física *in vitro* entre PPAR α i MEF-2C.

En conclusió, podem dir que la combinació dels elements *cis* en el promotor del gen de la CPT1B indueix l'expressió màxima del gen en resposta a diferents senyals. La coexistència de senyals miogènics i metabòlics genera una conformació transcripcionalment permissiva del promotor, que el porta a una màxima activació en presència de lligants de PPAR α , en aquells teixits que expressen els corresponents factors de transcripció (PPAR α , RXR α i MEF-2C). La resposta del promotor humà de CPT1B a PPAR α depèn: del context cel·lular, de l'element de resposta a MEF-2 i de la disposició espacial d'aquest respecte al PPRE.

Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptors- α and Mef-2C on human carnitine palmitoyltransferase 1 β (CPT1 β) gene activation

Ángel Baldán, Joana Relat, Pedro F. Marrero and Diego Haro*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Avenue Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

Received as resubmission July 21, 2004; Accepted August 17, 2004

ABSTRACT

Muscle-type carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1 β) is considered to be the gene that controls fatty acid mitochondrial β -oxidation. A functional peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) responsive element (PPRE) and a myocyte-specific (MEF2) site that binds MEF2A and MEF2C in the promoter of this gene had been previously identified. We investigated the roles of the PPRE and the MEF2 binding sites and the potential interaction between PPAR α and MEF2C regulating the CPT1 β gene promoter. Mutation analysis indicated that the MEF2 site contributed to the activation of the CPT1 β promoter by PPAR in C2C12 cells. The reporter construct containing the PPRE and the MEF2C site was synergistically activated by co-expression of PPAR, retinoid X receptor (RXR) and MEF2C in non-muscle cells. Moreover, protein-binding assays demonstrated that MEF2C and PPAR specifically bound to one another *in vitro*. Also for the synergistic activation of the CPT1 β gene promoter by MEF2C and PPAR α -RXR α , a precise arrangement of its binding sites was essential.

INTRODUCTION

The incorporation of activated long-chain fatty acids into the mitochondria, which are then catabolized through β -oxidation, is carried out by the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase (CPT) system. CPT1 [reviewed in (1)], the outer membrane component of this system, is the main regulatory step in the β -oxidation pathway. CPT1 is thus a suitable site for the pharmacological control of fatty acid oxidation, potentially useful in situations such as diabetes (2) or heart disease (3). CPT1 is encoded by at least two genes known as L-CPT1 (or $-\alpha$) and M-CPT1 (or $-\beta$) on the basis of the tissues, liver (L-) or muscle (M-), where the expression of each one

was first described. However, CPT1 β is expressed, in addition to skeletal muscle, in heart, testis and brown and white adipose tissue, whereas CPT1 α has a more widespread distribution. CPT1 β expression increases in the heart after birth [in terms of V_{\max} , (4)] or after fasting [in terms of mRNA (5)] concomitant with an increase in circulating levels of fatty acids. This expression pattern may be of great significance since fatty acids are the major source of energy for heart, skeletal muscle and brown adipose tissue.

We (6), and others (5,7), had shown that CPT1 β is a target gene for the action of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), nuclear receptor transcription factors that are regulated by fatty acids and derivative metabolites (8–13), and had localized a PPAR responsive element (PPRE) upstream of the first exon of this gene. There are three related PPAR family members, PPAR α , PPAR γ and PPAR δ . According to several lines of evidence, PPAR α , through the regulation of CD36/FAT (14), acyl-CoA synthetase (15), CPT1 β (5–7), CPTII (16) and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (17) stimulates, respectively, fatty acid transport into the cell, its activation, import into the mitochondria and β -oxidation.

In the human CPT1 β gene promoter, the PPRE is flanked by one E-box motif and a myocyte-specific (MEF2) binding site; this organization is highly conserved in the mouse, sheep and rat CPT1 β gene (18). The MEF2 site of the CPT1 β gene binds MEF2A and MEF2C (19), which are members of the MADS family of transcription factors that have been implicated in the regulation of muscle-selective gene expression (20–25). The PPAR α -mediated regulation of the CPT1 β gene is enhanced by the PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) (26) that also interacts with MEF2C to up-regulate GLUT4 expression (27) or MEF2A to stimulate CPT1 β expression (28). To gain more insight into the tissue-specific control of CPT1 β gene expression, we examined the basis of the specific expression of this gene in muscle cells. We conclude that the activity of the CPT1 β promoter is controlled by a synergistic mechanism involving MEF2C and the heterodimer PPAR α -RXR α , through a physical interaction between PPAR and MEF2C in a distance-dependent manner with sequences closely localized upstream of exon 1A.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 93 403 45 00; Fax: +34 93 402 45 20; Email: dharo@ub.edu
Present address:

Ángel Baldán, Department of Medicine—Cardiology, David Geffen School of Medicine at UCLA 3230 MRL695, Los Angeles, CA 90095, USA

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

pCPTluc containing a 380 bp fragment of the human CPT1 β gene was constructed by PCR using a pair of oligonucleotide primers, CPTF2 and CPTR2 (for sequences of all oligonucleotides used in this work, see Table 1), corresponding to coordinates -905 to -883 and -525 to -541 from the translation origin, respectively, of the human CPT1 β gene, and pCPT-CAT (6) as template. After 10 cycles (94°C for 1 min; 58°C for 1 min and 72°C for 1.5 min), the amplified product was purified in a 1% agarose gel, and the KpnI-SmaI digest was cloned into pGL3Basic (Promega).

pCPTmutMEF, containing point mutations at the MEF-2 sequence, was obtained by site-directed mutagenesis overlapping extension PCR, as described previously (29), using the oligonucleotides CPT-F2, CPT-R2, and *mutMef-F* and *mutMef-R* (which introduce a mutation in MEF-2 site).

pCPT-B211, containing 46 bp flanking de PPPE upstream of exon 1A of the CPT1 β gene, was constructed by cloning in NheI-SmaI-digested pGL3Basic (Promega), two complementary oligonucleotides, CAS-F1 and CAS-R1. *pCPT-B211mut-MEF2* was generated by digesting pCPT-B211 with BstEII and XhoI and cloning the oligonucleotides CAS-F3 and CAS-R3.

pCPT-M5 and pCPT-M10, containing either 5 or 10 bp between the MEF2 and the PPPE sites, respectively, were obtained by site-directed mutagenesis overlapping extension PCR, as described in (29), using the oligonucleotides CPT-F2, CPT-R2, CPT-M5-F, CPT-M5-R, CPT-M10-F and CPT-M10-R

pMEF2, containing the putative MEF-2 site, was obtained by cloning a pair of oligonucleotides (Mef-F and Mef-R) into the NheI-XhoI-digested pGL3Promoter. To confirm the sequence, all constructs were automatically sequenced using the fluorescent terminator kit (Perkin-Elmer).

Table 1. Oligonucleotides used for EMSA and constructions (see Materials and Methods for details)

Oligonucleotide	Sequence
CPTF2	GGGGTACCTGCAGCTTAGAATAATAAATAC
CPTR2	TCCCCGGGCCACGTCCTTCAGGCCTA
Mef-F	AGCTTTTGGCTATTTTTAGCTCTAAAG
Mef-R	TCGACTTTAGAGCTAAAAATAGCCAAA
<i>mutMef-F</i>	AGCTTTTGGATCATTGTTGCTCTAAAG
<i>mutMef-R</i>	TCGACTTTAGAGCAATCAATGAACCCAAA
CAS-F1	CTAGCAGCAGCTGACACATCGGTGACCTTTT CCCTACATTTGGCTATTTTTAGC
CAS-R1	GCTAAAAATAGCCAAATGTAGGGAAAAGGT CACCGATGTGTCAGCTGCTG
CAS-F3	GTGACCTTTTCCCTACATTTGGATCATTGTTGC
CAS-R3	TCGAGCAACAATGATCCAAATGTAGGGAAAAG
CPT-M5-F	ACATTTGACGTCGCTATTTTTAGCTCTAATGC
CPT-M5-R	AATAGCGACGTCAAAATGTAGGGAAAAGGTC
CPT-M10-F	TTTGACGCTCTACGCTATTTTTAGCTCTAATGC
CPT-M10-R	AGCCTAGAGACGTCAAAATGTAGGGAAAAGGTC
PPAR-MEF-F	ATCGGTGACCTTTTCCCTACATTTGGCTATTTT TAGCTCTAA
PPAR-MEF-R	TTAGAGCTAAAAATAGCCAAATGTAGGGAAAAG GGTCACCGAT
PPAR-mutMEF-F	CGGTGACCTTTTCCCTACATTTGGATCATTG TTGCTC
PPAR-mutMEF-R	GAGCAACAATGATCCAAATGTAGGGAAAAG GTCACCG

pSG5-PPAR α , pJCXR α and pCDNA-MEF2C contained the cDNAs for mouse PPAR α , human RXR α and human MEF2C, respectively. *pRL-CMV* (Promega) contained the *Renilla* luciferase gene under the control of the cytomegalovirus (CMV) intermediate-early enhancer/promoter.

PGEXhPPAR α , producing a glutathione *S*-transferase (GST-full-length human PPAR α fusion protein), has been described previously (16).

Cell growth and differentiation

The CV-1 cells were cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Chinese hamster ovary (CHO) cells were cultured in Ham's F12 medium supplemented with 10% FBS. C2C12 myoblasts were grown in DMEM supplemented with 10% FBS (growth medium), and shifted to DMEM supplemented with 10% horse serum (HS) (differentiation medium) to allow acquisition of the myotube phenotype. All cells and subsequent experiments were maintained under 5% CO₂ at 37°C.

Transient transfection assays

Typically, 0.5–1 × 10⁵ cells (CV-1 and CHO) or 2.5–3 × 10⁵ cells (C2C12) were cotransfected in 6-well plates with 1.5 μ g of the reporter gene construct and 0.2 μ g (except when indicated) of effector plasmids expressing full-length cDNAs for PPAR α , RXR α , MEF2C or PGC-1; 40 ng of plasmid pRL-CMV was included as internal control. Cotransfections were carried out by the calcium phosphate method for CV-1 and CHO cells as described previously (30), and cells were harvested 48 h after transfection. For C2C12 cells, transfection FuGENE-6 reagent (Roche) was used, as indicated by the manufacturer; after 24 h in DMEM + 10% FBS, the medium was changed to DMEM + 10% HS to allow differentiation from myoblasts to myotubes, and 48 h later, cell extracts were obtained.

Firefly luciferase and *Renilla* luciferase assays

The cell extracts were prepared using the Passive Lysis Buffer method (Promega), and firefly and *Renilla* luciferase activities were determined in a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs) using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), according to the manufacturer's recommendations.

In vitro transcription and translation

MEF2C, PPAR α and RXR α were transcribed and translated by using commercially available kits according to the manufacturer's instructions (Promega).

Electrophoretic mobility shift assay

An aliquot of 2.5 μ l of each factor synthesized *in vitro* was preincubated on ice for 10 min in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 or 100 mM KCl for PPAR or MEF2C, respectively, 0.05% (v/v) Nonidet P-40, 6% glycerol, 1 mM dithiothreitol and 2 μ g of poly(dI-dC). The total amount of reticulocyte lysate was kept constant in each reaction through the addition of unprogrammed lysate. When indicated, 1.5 μ l of specific antibody (anti-MEF2 from SantaCruz Biotechnology) was added to the reaction mixture. Next, 2 ng of probe, ³²P-labeled by 5' end-labeling with T4 polynucleotide kinase, was added and the incubation was continued for 15 min at room temperature. The final volume for all the reactions was 20 μ l. Samples

were electrophoresed at 4°C on a 4.5% polyacrylamide gel in 0.5% TBE buffer [45 mM Tris, 45 mM boric acid and 1 mM EDTA (pH 8.0)], and the gel was dried and exposed to an autoradiographic film.

GST-pull down assay

GST and GST-PPAR α fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* and purified on glutathione-sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech) as described previously (31). Amounts and integrity of GST were checked by SDS-PAGE and Comassie Blue staining. ³⁵S-methionine labeled MEF2C (4 μ l) was incubated in the presence of equivalent quantities of immobilized GST or GST-PPAR α in 1 ml of binding buffer [NETN + 0.5% milk + protease inhibition cocktail (Sigma)] for 4 h at 4°C with agitation. Then the samples were centrifuged for 1 min at 2000 r.p.m. and the resin was washed twice with NETN at room temperature. After that the samples were boiled, mixed with 2 \times Laemli Buffer and resolved by SDS-PAGE. Labeled proteins were visualized by fluorography.

RESULTS

The response of CPT1 β promoter to PPAR α is cell line specific

In order to examine the responsiveness of the CPT1 β gene to PPAR α on different tissular contexts, we performed a series of transient transfections in several cell lines derived from different tissues: CV-1 (kidney), CHO (ovary) and C2C12 (muscle). pCPT luc , a plasmid containing a 380 bp fragment

of the human CPT1 β promoter (Figure 1A), was used as reporter. In all cells studied, the basal expression of the construct was similar (data not shown) but, unexpectedly, induction mediated by PPAR α /RXR α was higher in C2C12 myotubes, in which a 38-fold induction from basal activity was observed (Figure 1B). Analysis of the 5' flanking region of the human CPT1 β gene by the TFSEARCH routine showed the presence of a putative myogenic binding sequence (MEF-2 site) located at coordinates -759 to -744 from initial ATG, and neighboring the PPRE (Figure 1A). The higher PPAR α responsiveness in C2C12 cells was correlated with the presence of proteins able to bind to MEF2 sites in the C2C12 nuclear extracts (data not shown). The positive correlation between the presence of such myogenic proteins and the increase in the response to PPAR α observed in C2C12 suggested a mechanism of synergy between myogenic proteins and the heterodimer PPAR α /RXR α .

The MEF-2 sequence binds MEF2C: mutation of these sequences affects PPAR α responsiveness

We performed gel mobility shift assays to analyze whether MEF2C binds to the putative MEF2 site of the CPT1 β gene. Figure 2A shows how, when the wild-type sequence (lanes 1–3) was used as a probe in electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), *in vitro*-transcribed and *in vitro*-translated MEF2C was able to promote shifted bands, whereas the mutation of the MEF2 site (lanes 4 and 5) abolished such binding. Moreover, specific MEF2 antibodies promote a supershifted band (lane 3). To confirm the functional importance of this *cis*

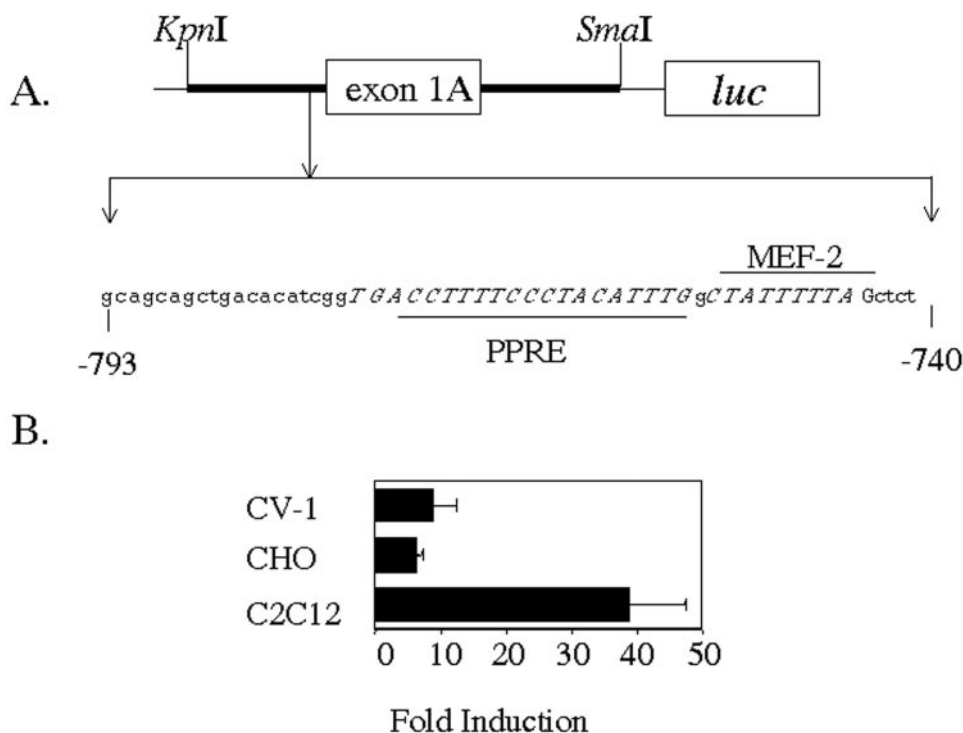


Figure 1. Increased response of the CPT1 β promoter to PPAR α in C2C12 cells. (A) Schematic diagram of pCPT luc reporter, which contains the gene *luc* under control of the 5' flanking region of the human CPT1 β gene. Sequences of interest are depicted in italics. (B) CV-1, CHO and C2C12 cells were transiently transfected with pCPT luc (1.5 μ g) in the absence or in the presence of PPAR α /RXR α , as indicated (0.2 μ g each). At 48 h (CV-1 and CHO) or 72 h (C2C12) after transfection, reporter activity was assayed in cell lysates after normalization with *Renilla* luciferase (internal control). Bars represent normalized means \pm SD of three independent experiments.

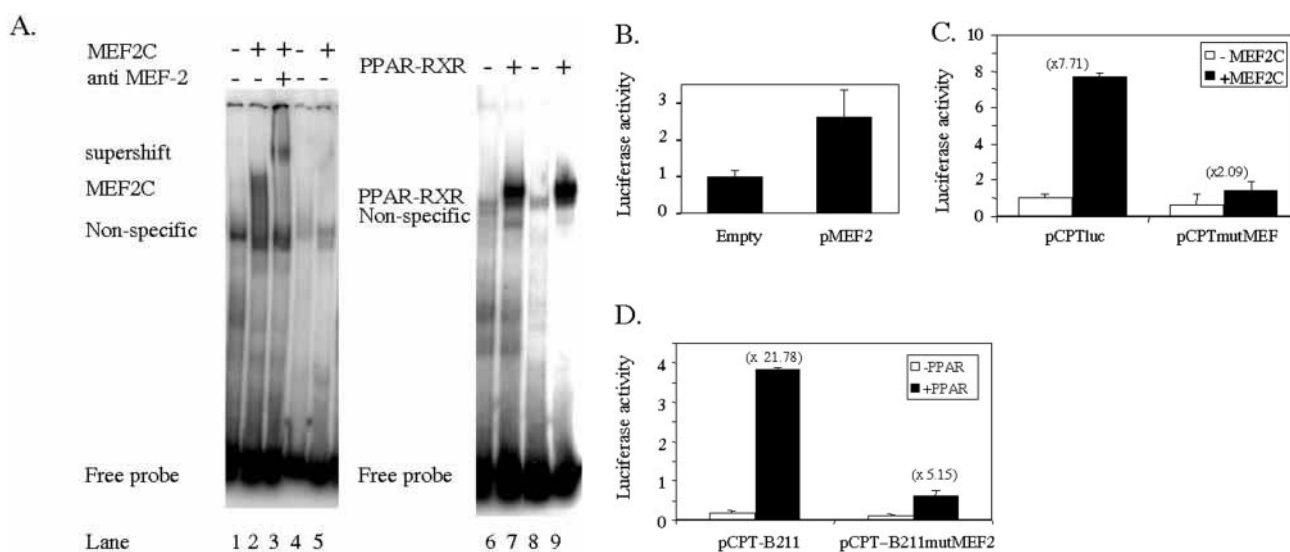


Figure 2. MEF-2 site bind MEF2C, and abolition of this sequence affects MEF2C responsiveness and PPAR α transactivation. (A) *In vitro*-translated MEF2C, PPAR α and RXR α were incubated with labeled probes containing the wild-type sequence (lanes 1–3, 6 and 7) (PPAR-MEF-F/R) or the wild-type PPRE sequence and a mutated version of the MEF2 site (lanes 4, 5, 8 and 9) (PPAR-mutMEF-F/R) (Table 1). When indicated, specific antibodies were added to the reaction mix. (B) The C2C12 cells were transiently transfected with plasmids containing one copy of the MEF-2 site upstream of an SV40-driven *luc* reporter, and basal activity of the constructs was assayed against the empty vector. (C) The CV-1 cells were transiently transfected with pCPTluc or pCPTmutMEF, a construct containing a mutated MEF2 site in the absence or in the presence of a MEF2C expression vector, as indicated. At 48 h after transfection, the reporter activity was assayed in the cell lysates after normalization with *Renilla* luciferase (internal control). Bars represent normalized means \pm SD of three independent experiments. (D) A 46 bp fragment of the 5' flanking region of the human CPT1 β gene was cloned in pGL3Basic and subsequent MEF-2 site scrambling was performed (see Materials and Methods for details), generating the indicated reporter constructs. The C2C12 cells were transfected with these plasmids in the absence or in the presence of 0.2 μ g of PPAR α , and 72 h later, the reporter activities were assayed in the cell lysates after normalization with *Renilla* luciferase (internal control). Bars represent normalized means \pm SD of three independent experiments.

element on the transcriptional activity of the CPT1 β promoter, we generated a construct in which one copy of the MEF-2 sequence was cloned upstream of an SV40-driven *luc* reporter and then transfected this plasmid in C2C12 cells. This plasmid showed an increased basal expression when compared to the empty vector (Figure 2B), thus identifying these sequence as a functional MEF2 binding site. To confirm the function of this site on the CPT1 β gene promoter activity, we analyzed the effect of the overexpression of MEF2C on the activity of a luciferase reporter construct driven either by the wild type or a MEF2 site mutant version of the CPT1 β promoter on CV-1 cells. Figure 2C shows how the response to MEF2C is eliminated by the mutation of the MEF2 site. To further investigate the synergy between MEF2C and PPAR α , a *luc* reporter construct was generated in which a 46 bp fragment of the CPT1 β gene promoter flanking the PPRE was cloned directly upstream of the *luc* gene (pCPT-B211). Furthermore, mutation of the MEF-2 site (pCPT-B211mutMEF2) was performed as well. When assaying relative basal activities for each plasmid in C2C12 cells (Figure 2D), we found that the mutation of the MEF-2 element, which did not affect the PPAR-RXR binding (Figure 2A; lanes 6–9), surprisingly, did not affect basal activity in C2C12 cells but, in contrast, dramatically reduced the activity observed in the presence of PPAR α /RXR α when compared to the wild-type promoter construct.

PPAR α /RXR α and MEF2C cooperate at the transcriptional level in the CPT1 β gene promoter

In order to check the synergy between MEF2C and the PPAR α /RXR α , we carried out transient transfections in

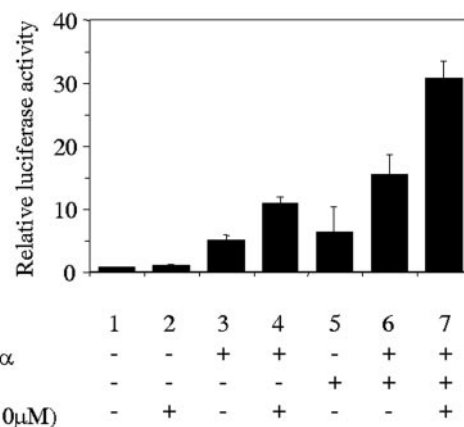


Figure 3. PPAR α /RXR α and MEF2C synergistically activate the human CPT1 β gene promoter. The CV-1 cells were transiently transfected with pCPTluc in the absence or in the presence of 0.2 μ g PPAR α , RXR α and 1 μ g of MEF2C expression vectors, as indicated. At 16 h after transfection, cells were changed to charcoal-stripped serum and 8 h later Wy-14643, a specific ligand for PPAR α , was added. At 48 h after transfection, the reporter activity was assayed in the cell lysates after normalization with *Renilla* luciferase (internal control). Bars represent normalized means \pm SD of three independent experiments.

CV-1 cells using pCPTluc as reporter and assaying the effect of cotransfection with expression vectors for PPAR α , RXR α and MEF2C. To analyze the effect of the presence of ligand, we performed these experiments using charcoal-stripped serum in combination with the presence or absence of a synthetic ligand for PPAR α . As shown in Figure 3,

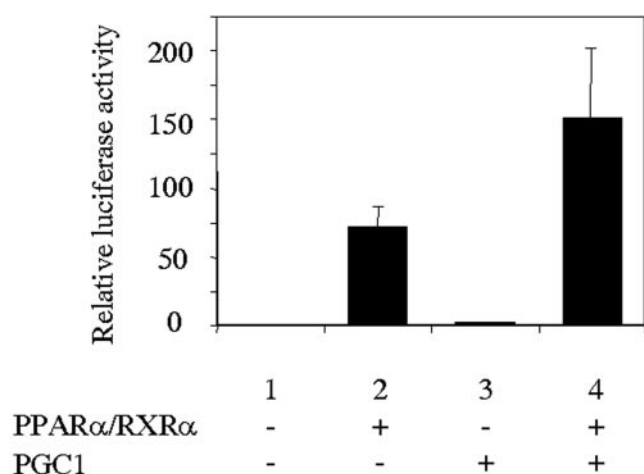


Figure 4. PGC-1 increases the response of the human CPT1 β gene promoter to PPAR in C2C12 cells. The C2C12 cells were transiently transfected with pCPT luc in the absence or in the presence of 0.2 μ g of PPAR α , RXR α and 1 μ g of PGC-1 expression vectors, as indicated. At 72 h after transfection, the reporter activity was assayed in the cell lysates after normalization with *Renilla* luciferase (internal control). Bars represent normalized means \pm SD of three independent experiments.

MEF2C induces the expression of CPT1 β promoter (lane 5), confirming the role of these proteins in muscle-specific transcription of this gene. It also promotes a synergistic activation when coexpressed with PPAR α /RXR α in the presence of ligand (compare lanes 4, 5 and 7). Taken together, results from Figures 1–3 confirm the existence of a synergy between MEF2C and the heterodimer PPAR α /RXR α . Because PGC-1 is known to interact with both PPAR and MEF2C, we examined whether PGC-1 might further augment the response of the CPT1 β promoter to PPAR in C2C12 cells. As shown in Figure 4, the presence of PGC-1 actually increases the response to PPAR.

MEF2C and PPAR α physically associate *in vitro*

The cooperative effects of PPAR and MEF2C on transcriptional activation raise the possibility that these two proteins physically interact with each other. The direct and specific physical interaction of PPAR α and MEF2C was examined by using *in vitro* protein-binding assays. Radioactive *in vitro*-translated MEF2C was incubated with GST-PPAR α . After incubation, proteins bound to the GST fusion protein were subjected to SDS-PAGE and fluorography. As shown in Figure 5A, the MEF2C band was observed when the products of the specific *in vitro* translation were incubated with GST-PPAR α but not with GST beads. In order to check whether this interaction was ligand dependent, we performed the same experiment with limiting amounts of the GST-PPAR α protein in the presence or in the absence of a PPAR α specific ligand. Figure 5B shows how this interaction is independent of the presence of the ligand.

Synergy between MEF2C and PPAR α is influenced by the separation between them

To further investigate the synergy between MEF2C and PPAR α , a collection of *luc* reporter constructs were generated

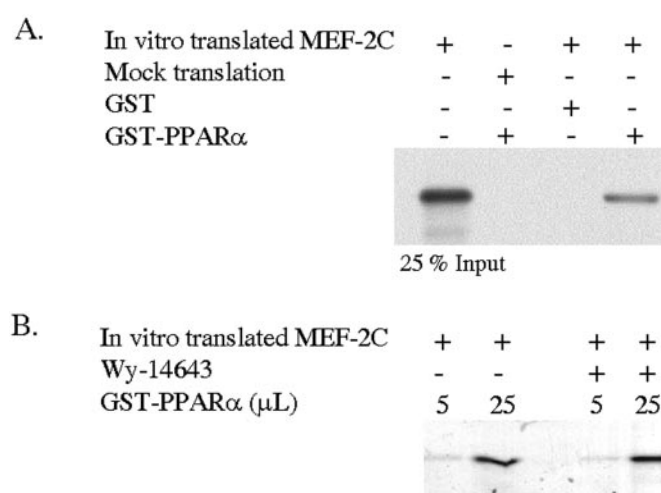


Figure 5. MEF2C and PPAR physically associate *in vitro*. (A) *In vitro*-transcribed and *in vitro*-translated 35 S-methionine-labeled MEF2C or the result of a mock translation with the empty vector were incubated with GST or GST-PPAR α fusion protein in the presence or in the absence of Wy-14643 as indicated. The bound proteins were subjected to SDS-PAGE and fluorography. (B) The *in vitro*-translated MEF2C (25% input) represents the fourth part of the total radiolabeled translated protein used in the pull down assay.

in which the mutation of the MEF-2 site that abolished the binding of MEF2C was performed in the context of the human CPT1 β gene promoter (*pCPTmutMEF*). We also made different versions in which either a sequence of 5 nt (half turn) (*pCPT-M5*) or 10 nt (a whole turn) (*pCPT-M10*) of DNA helix were introduced to separate the MEF2 site from the PPRE sequences in *pCPTluc*. While assaying relative basal activities for each plasmid in C2C12 cells (Figure 6A), we found that the mutation of the MEF2C responsive sequence produces a little decrease in basal activity and a clear reduction of the activity in the presence of PPAR.

Showing the functionality of the interaction between PPAR and MEF2C, only those constructs that maintained the natural spatial disposition of the binding sites for these proteins respect de DNA helix (*pCPT* and *pCPT-M10*) were able to show high PPAR α responsiveness, whereas those in which the spatial arrangement was disrupted (*pCPT-M5*) failed (Figure 6B). Taken together, these results demonstrate that the interaction and synergy between MEF2C and PPAR α /RXR α show a strong dependence on a precise arrangement of activator recognition sites.

DISCUSSION

Interaction between transcription factors that bind to different sequences within a promoter can lead to synergistic effects on transcriptional activation. In this report, we show a synergistic activation of the CPT1 β gene promoter by the heterodimer of nuclear receptors PPAR α -RXR α and the myogenic factor MEF2C. We and others had previously demonstrated that the human CPT1 β gene is a target for PPARs and had localized the PPAR responsive element (PPRE) upstream of the first exon (6–8). It has been previously shown that the CPT1 β gene promoter contains a MEF2 binding site upstream of exon 1A, flanking the PPRE (19). The vicinity of these DNA elements

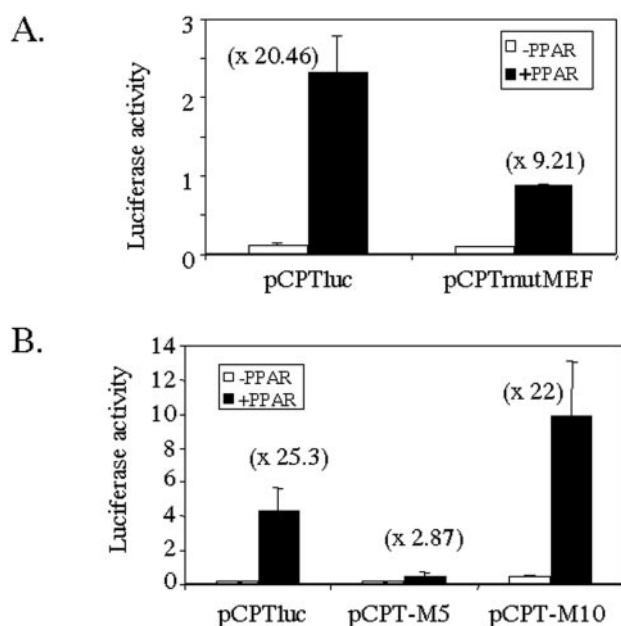


Figure 6. MEF-2 site contribution to muscle-specific expression of the human CPT1 β gene. The C2C12 cells were transiently transfected with (A) either pCPTluc or pCPTmutMEF, a construct containing a mutated MEF2 site, (B) mutated versions of pCPTluc, pCPT-M5 or pCPT-M10 containing, respectively, a half (5 nt) or a whole turn (10 nt) of DNA helix between the MEF2 site and the PPRE sequences. When indicated, 0.2 μ g of PPAR α and RXR α expression vectors were added. At 72 h after transfection, the reporter activities were assayed in the cell lysates after normalization with *Renilla* luciferase (internal control). Bars represent normalized means \pm SD of three independent experiments.

and the enhanced PPAR α responsiveness in muscle cells led us to assess the effect of this nuclear receptor in the presence of myogenic factors. Here, we show that MEF2C and PPAR interact to synergistically activate the CPT1 β gene expression. Mutation of the MEF2 binding site dramatically affects PPAR α responsiveness in C2C12 cells, or after the coexpression of MEF2C in non-muscle (CV-1) cells; the alteration of the natural arrangement of the PPAR and MEF2 binding sites also influences the response to PPAR.

It has been suggested recently that PPAR δ plays a pivotal role in the control of both the program for fatty acid oxidation and the CPT1 β promoter in the skeletal muscle (32,33). Although not shown in this paper, PPAR δ and PPAR γ are also able to physically interact with MEF2C *in vitro*, and therefore, this interaction could be physiologically relevant in different tissues with different levels of the PPAR isotypes.

The identity of the protein that binds to the MEF2 sequence of the CPT1 β gene in muscle cannot be entirely established. Till date, four different MEF2 proteins have been identified MEF2A, MEF2B, MEF2C and MEF2D. In skeletal muscle cells in culture, MEF2D has been reported to be expressed in proliferating myoblasts prior to the onset of differentiation, MEF2A protein appears as cells enter the differentiation pathway and MEF2C is expressed late in the differentiation program (34). In agreement with the expression patterns of MEF2 proteins in myotube culture and with previously published observations that both MEF2A and MEF2C bind to the CPT1 β MEF2 binding site (19), we believe that MEF2C is responsible for the activation of the CPT1 β gene.

PGC-1 is a coactivator of MEF2C and can control the level of endogenous GLUT4 gene expression in muscle (27). It has also been shown that PGC-1 and MEF2A synergistically activate the CPT1 β gene promoter (28). Our results point to the possibility of a simultaneous interaction between PPAR, MEF2C and PGC1 forming a ternary complex and creating a unique surface that interacts with the transcription machinery more efficiently than any of the individual factors alone. The localization of the regions involved in the interaction between PPAR and MEF2C will help us to solve this issue. Alternatively, the interaction of each of these factors could modify the chromatin structure, facilitating the action of the next. In this sense, Huang *et al.* (35) demonstrated that promoter context affects the transcriptional activation by MyoD through E-boxes, so that neighboring proteins can recruit different associated factors to the promoter, or influence the conformation of the promoter DNA and/or of the protein-E-box complex.

A number of studies have examined the transactivating properties of the MEF2 proteins, which were originally studied in their role as transcriptional regulators of myogenic cells, including interactions with other transcription factors such as myogenin and MyoD (36,37). In particular, several studies have reported the physical or functional interaction between myogenic proteins and members of the nuclear receptor superfamily. Thus, it has been demonstrated that MEF-2A and the TR receptor interact synergistically to activate the α -cardiac MHC gene expression (38). A functional cooperation between MyoD, MEF2 and TR α 1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription (39). The interaction between MyoD and RAR α has also been demonstrated (40) and a functional interaction between MyoD and PPAR proposed (41). The transcriptional coactivator PGC-1 mediates an increase in GLUT4 expression, by binding to and coactivating MEF2C (27). Other coactivators such as CBP/p300 (25) or the Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1 (GRIP-1) (42), which functions as a cofactor for several nuclear receptors, has been shown to physically interact with both MyoD and MEF-2. The particular spatial arrangement of PPAR-, MEF2- and MyoD-binding sequences along the human CPT1 β promoter is highly conserved in mouse, sheep and rat CPT1 β genes (18). Besides the interaction between PPAR α and MEF2C shown in this paper, interactions between RXR or PPAR and MyoD are probable, but they are yet to be demonstrated.

In summary, the combination of *cis* elements in the promoter of the CPT1 β gene maximally induces the expression of this gene in response to a combination of different signals. Thus, it seems likely that the concurrence of myogenic and metabolic signals generates a transcriptionally permissive conformation of the CPT1 β gene promoter that gives rise to a synergistic maximal transcription of the gene in those tissues containing the corresponding transcription factors (MEF2C, PPAR α /RXR α) and in the presence of the metabolic substrate of the enzyme, the fatty acids that activate PPAR α .

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Drs S. Green, R. M. Evans, E. N. Olson, and to B. M. Spiegelman for supplying the expression vectors

for PPAR α , RXR α , MEF2C and PGC-1. We are also grateful to Robin Rycroft of the Language Service for valuable assistance in the preparation of the English manuscript. This research was supported by Grants PB97-0958 and SAF2001-2923-C02-01 from Direcció General de Investigació Científica y Tècnica, a Grant from the FIS of the Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros RCMN (C03/08) and the Fundació la Marató de TV3. A.B. and J.R. were Predoctoral fellows from Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- McGarry, J.D. and Brown, N.F. (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.*, **244**, 1–14.
- Prentki, M. and Corkey, B.E. (1996) Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes*, **45**, 273–283.
- Corr, P.B. and Yamada, K.A. (1995) Selected metabolic alterations in the ischemic heart and their contributions to arrhythmogenesis. *Herz*, **20**, 156–168.
- Brown, N.F., Weis, B.C., Husti, J.E., Foster, D.W. and McGarry, J.D. (1995) Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8952–8957.
- Yu, G., Lu, Y. and Gulick, T. (1998) Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I beta gene promoters by fatty acid enzyme substrate. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32901–32909.
- Mascaró, C., Acosta, E., Ortiz, J.A., Marrero, P.F., Hegardt, F.G. and Haro, D. (1998) Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8560–8563.
- Brandt, J.M., Djouadi, F. and Kelly, D.P. (1998) Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Biol. Chem.*, **273**, 23786–23789.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M. and Lehmann, J.M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 4318–4323.
- Forman, B.M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G.J., Jr and Evans, R.M. (1997) The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 10588–10593.
- Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K. and Evans, R.M. (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 7355–7359.
- Schoonjans, K., Staels, B. and Auwerx, J. (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.*, **37**, 907–925.
- Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q. and Gustafsson, J.A. (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 4653–4657.
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C.B., Harding, H.P., Ravera, C.P., McMahon, G., Brown, M. and Lazar, M.A. (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23975–23983.
- Sato, O., Kuriki, C., Fukui, Y. and Motojima, K. (2002) Dual promoter structure of mouse and human FAT/CD36 genes and unique transcriptional activation by PPAR alpha and gamma ligands. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15703–15711.
- Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T. and Auwerx, J. (1995) Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19269–19276.
- Barrero, M.J., Camarero, N., Marrero, P.F. and Haro, D. (2003) Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element. *Biochem. J.*, **369**, 721–729.
- Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D.D. and Kelly, D.P. (1994) The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 11012–11016.
- Van Der Leij, F.R., Cox, K.B., Jackson, V.N., Huijkman, N.C., Bartelds, B., Kuipers, J.R., Dijkhuizen, T., Terpstra, P., Wood, P.A., Zammit, V.A. and Price, N.T. (2002) Structural and functional genomics of the CPT1B gene for muscle-type carnitine palmitoyltransferase I in mammals. *J. Biol. Chem.*, **277**, 26994–27005.
- Moore, M.L., Wang, G.-L., Belaguli, N.S., Schwartz, R.J. and McMillin, J.B. (2001) GATA-4 and serum response factor regulate transcription of the muscle-specific carnitine palmitoyltransferase I beta in rat heart. *J. Biol. Chem.*, **276**, 1026–1033.
- Edmonson, D.G. and Olson, E.N. (1993) Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Biol. Chem.*, **268**, 755–758.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D. and Lassar, A.B. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, **58**, 537–44.
- Lassar, A.B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D. and Weintraub, H. (1991) Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins *in vivo*. *Cell*, **66**, 305–315.
- Olson, E.N., Perry, M. and Schulz, R.A. (1995) Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.*, **172**, 2–14.
- Martin, J.F., Schwarz, J.J. and Olson, E.N. (1993) Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 5282–5286.
- Sartorelli, V., Huang, J., Hamamori, Y. and Kedes, L. (1997) Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 1010–1026.
- Vega, R.B., Huss, J.M. and Kelly, D.P. (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 1868–1876.
- Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelman, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P. and Spiegelman, B.M. (2001) Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 3820–3825.
- Moore, L.M., Park, E.A. and McMillin, J.B. (2003) Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-1 β expression by PGC-1. *J. Biol. Chem.*, **278**, 17263–17268.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51–59.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Associates/Wiley-Interscience, NY.
- Elbrecht, A., Chen, Y., Adams, A., Berger, J., Griffin, P., Klatt, T., Zhang, B., Menke, J., Zhou, G., Smith, R.G. and Moller, D. (1999) L-764406 is a partial agonist of human peroxisome proliferator-activated receptor γ . The role of Cys313 in ligand binding. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7913–7922.
- Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T. and Sakai, J. (2003) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 15924–15929.
- Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P. and Muscat, G.E. (2003) The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol. Endocrinol.*, **17**, 2477–2493.
- Black, B.L. and Olson, E.N. (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 167–196.

35. Huang,J., Blackwell,T.K., Kedes,L. and Weintraub,H. (1996) Differences between MyoD DNA binding and activation site requirements revealed by functional random sequence selection. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3893–3900.
36. Gossett,L.A., Kelvin,D.J., Sternberg,E.A. and Olson,E.N. (1989) A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5022–5033.
37. Kaushal,S., Schneider,J.W., Nadal-Ginard,B. and Mahdavi,V. (1994) Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science*, **266**, 1236–1240.
38. Lee,Y., Nadal-Ginard,B., Mahdavi,V. and Izumo,S. (1997) Myocyte-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2745–2755.
39. Santalucia,T., Moreno,H., Palacin,M., Yacoub,M.H., Brand,N.J. and Zorzano,A. (2001) A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J. Mol. Biol.*, **314**, 195–204.
40. Froesché,A., Alric,S., Kitzmann,M., Carnac,G., Auradé,F., Rochette-Egly,C. and Bonnieu,A. (1998) Retinoic acid receptors and muscle b-HLH proteins: partners in retinoid-induced myogenesis. *Oncogene*, **16**, 3369–3378.
41. Solanes,G., Pedraza,N., Iglesias,R., Giral,M. and Villarroya,F. (2003) Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. *Mol Endocrinol.*, **17**, 1944–1958.
42. Chen,S.L., Dowhan,D.H., Hosking,B.M. and Muscat,G.E. (2000) The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2 C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.*, **10**, 1209–1214.

2.- EFECTE DE PPAR δ I Sp1 SOBRE EL PROMOTOR DE LA CPT1B

Resultats previs del grup havien demostrat l'existència d'un PPRE funcional corrent amunt del promotor 1A/U del gen CPT1B (Mascaró et al., 1998). Aquest element de resposta era capaç d'unir els tres isotips de PPAR (PPAR α , PPAR γ i PPAR δ) i activar la transcripció del gen reporter CAT (cloramfenicol acetil transferasa) en transfeccions transitòries de construccions on aquest es trobava sota el control d'aquest PPRE.

Flanquejant aquest PPRE es van localitzar, per anàlisi informàtica de la regió 5' del promotor, seguint la rutina del TF-SEARCH, un element de resposta a factors de la família MyoD, (coordenades -789/-784, respecte a l'inici de traducció) i un element de resposta a factors de la família MEF-2 (coordenades -753/-744, respecte a l'inici de traducció). Aquests dos elements han resultat ser funcionals i el seu estudi ha permès descriure un mecanisme sinèrgic entre PPAR α , MEF-2C (Baldán et al., 2004) i MyoD (dades no publicades) en l'activació transcripcional del gen *CPT1B* humà.

2.1.- PPAR α i PPAR δ ACTIVEN LA TRANSCRIPCIÓ DE CPT1B EN CÈL·LULES DIFERENCIADES I NO DIFERENCIADES.

PPAR δ ha estat implicat en el control de l'expressió de gens vinculats al catabolisme lipídic i al desacoblament energètic (Dressel et al, 2003). Les seves funcions, sovint cavalcades a les de PPAR α , encara no semblen ben definides, però els resultats apunten a què, sent el principal isotip en el múscul esquelètic, el seu paper en el control transcripcional de gens múscul-específics sigui important.

Per tal d'aprofundir en el coneixement de PPAR δ com a factor de transcripció sobre gens implicats en el metabolisme lipídic, vam plantejar-nos estudiar el seu efecte sobre el promotor humà de la CPT1B. El PPRE descrit sabíem que era funcional i que responia, com a mínim fins al moment, a PPAR α i PPAR γ .

Utilitzant la construcció reportera pCPTluc que conté 380bp de la regió promotora del gen humà de la CPT1B fusionada al gen *Luc* (Figura 16) i els plasmidis d'expressió dels factors de transcripció PPAR α , PPAR δ i RXR α es van realitzar transfeccions transitòries de cèl·lules C2C12

no diferenciades (mioblasts) (Figura 17A) i diferenciades a miotubs (Figura 17B), en presència i absència de lligants específics de PPAR α (GW-7647) i PPAR δ (L-165.041).

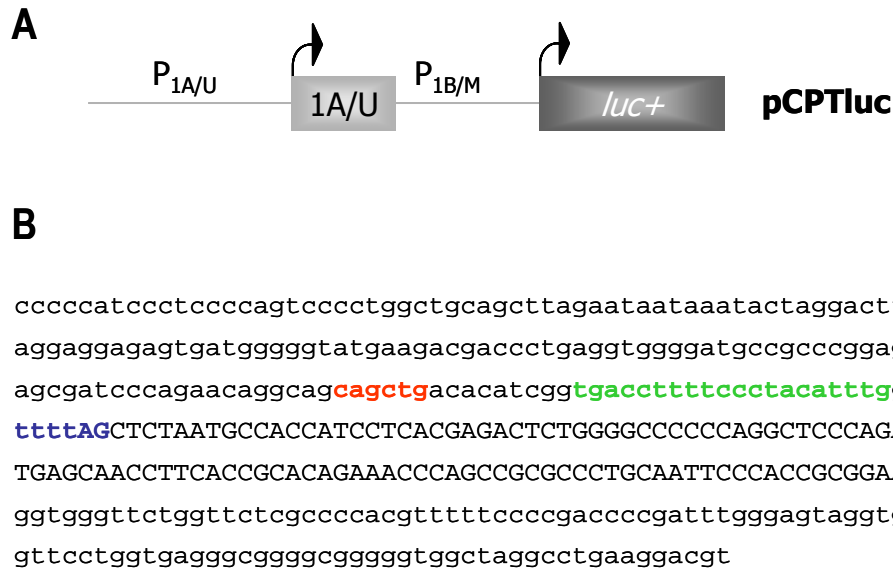


Figura 16.- Construcció promotora pCPTLUC. A.- Esquema de la construcció promotora pCPTLuc generada en el vector pGL3Basic. Aquesta construcció inclou els dos promotors, P_{1A/U} i P_{1B/M}, i l'exó 1A/U de la CPT1B humana fusionats al gen *Luc* que codifica per la proteïna Luciferasa de *Photinus pyralis*. **B.-** La seqüència promotora de la construcció pCPTLuc cobreix 380bp de la regió promotora del gen *CPT1B* humà. Aquest fragment inclou l'E-Box (vermell), el PPRE (verd) i l'element de resposta a MEF-2 (blau). En majúscules es mostra la seqüència exònica.

En cèl·lules no diferenciades, l'efecte de PPAR α transfectat sobre el promotor de la CPT1B és molt superior a l'efecte del PPAR δ transfectat, en absència i en presència de lligant (Figura 17A). En les cèl·lules diferenciades, part de la capacitat transactivadora del PPAR α transfectat es perd, assolint-se nivells d'activació més pròxims als del PPAR δ transfectat (Figura 17B). Els valors de transactivació de PPAR δ no varien per l'estat de diferenciació de les cèl·lules.

En absència dels PPAR transfectats, aquests efectes canvien, tant en cèl·lules diferenciades com en no diferenciades. Quan es transfecta únicament la construcció pCPTLuc i es tracten les cèl·lules amb lligants de PPAR α (GW-7647) i PPAR δ (L-165.041), l'efecte del lligant de PPAR δ sobre la construcció reportera és superior a l'efecte provocat pel lligant de PPAR α en les mateixes condicions (Figures 17A i 17B). Aquests resultats correlacionen amb les dades publicades que indiquen que els nivells de proteïna PPAR δ en teixit muscular són superiors als de PPAR α (Braissant et al., 1996).

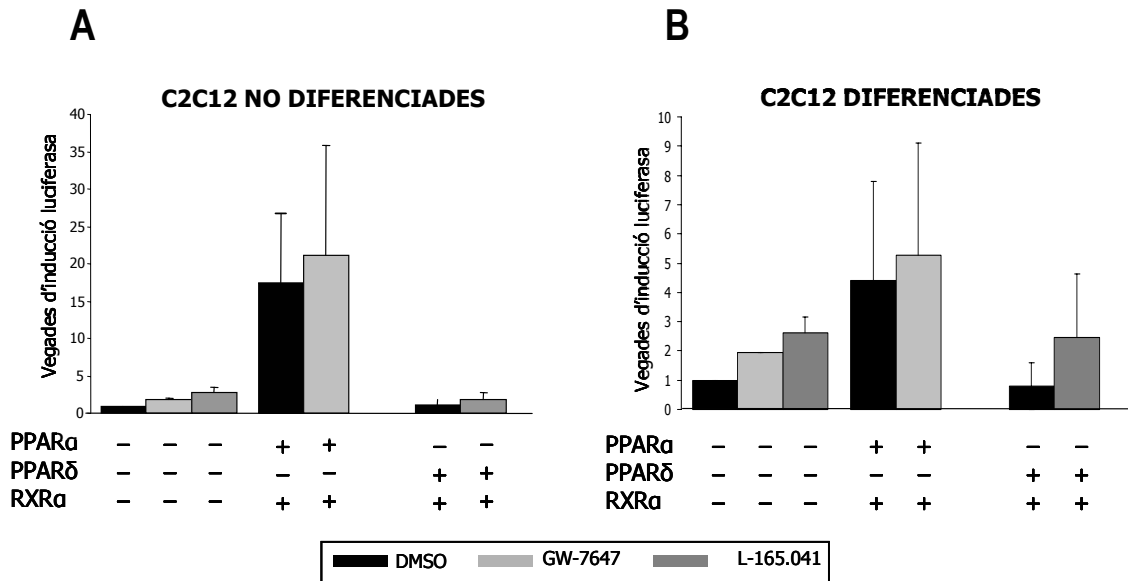


Figura 17.- Efectes de PPAR α i PPAR δ sobre CPT1B. Cèl·lules musculars C2C12 ($\approx 3 \times 10^5$ cèl·lules/punt) van ser transfectades amb pCPTluc (1.5 μ g), en presència i absència de pSG5-PPAR α , pSG5-PPAR δ i pJCXR (RXR α) (0.2 μ g, respectivament), segons s'indica. Es va utilitzar, com a control intern de transfecció, pRL-CMV (40ng). El tractament amb els lligants (10 μ M) es va realitzar 24h abans de recollir les cèl·lules i lisar-les. En aquells punts on no s'hi afegia lligant, es van tractar les cèl·lules amb DMSO. **A.-** Les cèl·lules C2C12 no diferenciades es van plaquejar 24h abans de la transfecció en plaques de 35mm ($\approx 3 \times 10^5$ cèl·lules/punt). Es van incubar en medi de manteniment (DMEM 10%FBS) fins moments abans de la transfecció en què es va canviar el medi a medi de diferenciació (DMEM 10%HS). Passades 24h de la transfecció es van fer els tractaments i 24h després es van recollir i lisar les cèl·lules. Els extractes es van analitzar per quimioluminescència i el gràfic representa la mitja i desviació estàndard de tres experiments independents normalitzats. **B.-** Les cèl·lules C2C12 diferenciades es van plaquejar en plaques de 35mm 5 dies abans de la transfecció ($\approx 3 \times 10^5$ cèl·lules/punt), es van començar a diferenciar 24h després (80-90% confluència) i es van transfectar després de 4 dies de diferenciació seguint el protocol descrit per les no diferenciades. Els tractaments es van realitzar 24h abans de recollir els extractes i els extractes es van analitzar per quimioluminescència. El gràfic representa la mitja i desviació estàndard de tres experiments independents normalitzats.

2.2.- CONTROL DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE CPT1B PER Sp1

L'anàlisi per TF-SEARCH de la zona promotora de la CPT1B humana estudiada també va indicar la presència d'una regió rica en GC en el promotor 1B/M, que va ser reconeguda com a possible element d'unió a proteïnes de la família Sp (Figura 18). Experiments d'EMSA van demostrar que aquesta regió era capaç, *in vitro*, d'unir Sp1 i Sp3. Experiments de transfeccions transitòries amb construccions reporteress del gen *Luc*, sota control del promotor de la CPT1B salvatge o d'un promotor amb aquesta caixa GC mutada, van mostrar que aquest element és fonamental per l'expressió basal del gen (dades no publicades).

RESULTATS

```
ccccatccctccccagtccccctggctgcagcttagaataataaataactaggacttggggagga  
ggagagtgatgggggtatgaagacgaccctgaggtggggatgccgcccggagcaccagcgatc  
ccagaacagggcagcagctgacacatcggtagacctttccctacatttggtatTTTTAGCTCT  
AATGCCACCATCCTCACGAGACTCTGGGGCCCCCAGGCTCCCAGACCTTTGAGCAACCTTCA  
CCGCACAGAAACCCAGCCGCGCCCTGCAATTCACCGCGGAAGgtgggtgggttctggttct  
cgccccacgtttttccccgaccccgatttgggagtaggtgtcaggttctggtgagggcgggg  
cgggggtggctaggcctgaaggacgt
```

Figura 18.- CAIXA GC. Element de resposta a Sp1. La seqüència promotora del gen *CPT1B* clonada en pGL3Basic per generar pCPTluc inclou l'element de resposta a Sp1 (caixa GC) mostrat per l'anàlisi informàtica. Aquesta regió es troba indicada a la figura de color taronja.

2.2.1.- L'ELEMENT G/C ÉS IMPORTANT PER L'ACTIVITAT BASAL DE *CPT1B* I PER L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN PER PPAR α , PERÒ NO PER PPAR δ

En base als resultats previs, vam decidir aprofundir més en l'efecte de Sp1 i de l'element G/C en la regulació transcripcional del gen *CPT1B*. Es van realitzar transfeccions transitòries de cèl·lules C2C12 amb la construcció pCPTluc, en presència i absència dels factors de transcripció PPAR α , PPAR δ , RXR α i de DNSp1, un dominant negatiu de Sp1 incapaç d'activar la transcripció, però que s'uneix a les seqüències GC, impeding la unió de Sp1 (Figura 19).

Els resultats d'aquests experiments indiquen que aquest element G/C descrit en el promotor humà del gen *CPT1B* és important per l'activitat basal gen. La presència d'un dominant negatiu de Sp1 (DNSp1), que impedeix la unió d'aquest al seu element de resposta, fa que l'activitat promotora de la construcció pCPTluc caigui un 73%. Aquest element de resposta a Sp1 és també important per la transactivació del gen per PPAR α (Figura 17A). En presència del dominant negatiu de Sp1 l'efecte de PPAR α disminueix a la meitat (15.4 vs 7.0).

Pel que fa a PPAR δ (Figura 17B), els resultats mostren que el seu efecte no depèn de l'element G/C del promotor. En presència del dominant negatiu de Sp1, tot i disminuir l'activitat basal de la construcció, l'efecte transactivador de PPAR δ és el mateix (2.4 vs 2.3).

RESULTATS

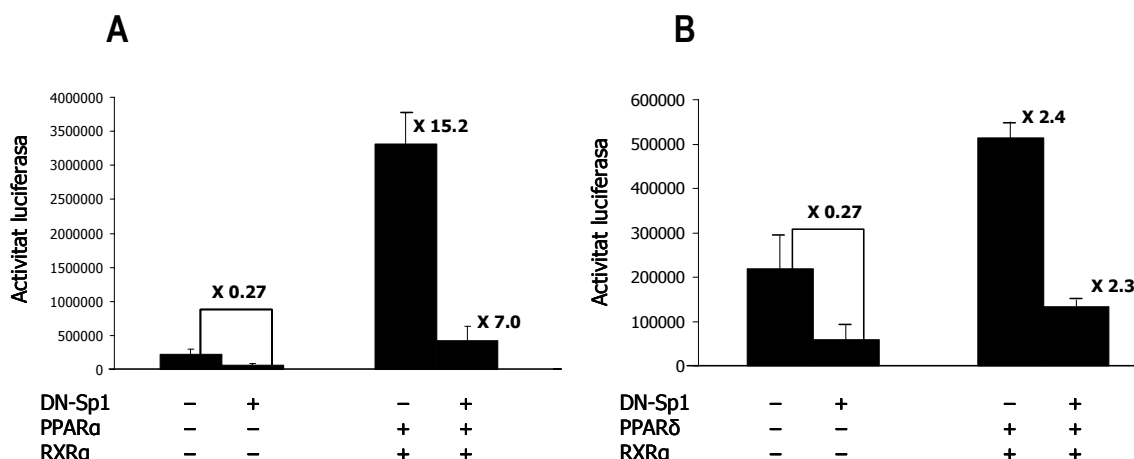


FIGURA 19.- L'ELEMENT G/C DEL PROMOTOR ÉS IMPORTANT PER L'ACTIVAT BASAL DEL GEN I PER L'ACTIVACIÓ PER PPARα PERÒ NO PER PPARδ. Cèl·lules musculars C2C12 ($\approx 3 \times 10^5$ cèl·lules/punt) van ser transfectades amb pCPTluc (1.5µg) en presència o absència de **(A)** pSG5-PPARα o **(B)** pSG5-PPARδ, pJCXR (RXRα) (0.2µg, respectivament) i pM-DNSp1 (0.5µg), segons s'indica. Es va utilitzar, com a control intern de transfecció pRL-CMV (40ng). Les cèl·lules van ser plaquejades 24h abans de la transfecció en plaques de 35mm i es van transfectar pel mètode del Fugene®6. 24h després de la transfecció se'ls va canviar el medi de manteniment (DMEM 10%FBS) per medi de diferenciació (DMEM 10%HS). Els extractes cel·lulars es van obtenir 72h després de la transfecció, temps que correspon a 48h de diferenciació. El gràfic representa la mitja i desviació estàndard de tres experiments independents normalitzats.

2.2.2- PPARα i PPARδ INTERACCIONEN AMB AFINITATS DIFERENTS AMB Sp1

Degut a la importància del factor de transcripció Sp1 en la transactivació per PPARα del gen CPT1B (Figura 19A), ens vam plantejar que PPARα pogués estar interaccionant físicament amb la proteïna Sp1. A més a més, vam voler comprovar si existia una diferent interacció entre PPARα i PPARδ amb el factor Sp1 que potser expliqués la transactivació de PPARα dependent de l'element G/C, respecte de la independent de PPARδ.

2.2.2.1.- PPARα INTERACCIONA AMB MÉS AFINITAT QUE PPARδ AMB EL TnT DE Sp1

Es van realitzar experiments de GST-pull-down amb les proteïnes de fusió GST-PPARα i GST-PPARδ expressades i purificades de cultius de *E.coli* BL21 i proteïna Sp1 transcrita i traduïda *in vitro* (TnT).

La figura 20A mostra la diferent interacció de PPARα i PPARδ amb el factor de transcripció Sp1, davant quantitats creixents de proteïna GST-PPAR (GST-PPARα, carrils 3, 4 i 5; GST-

PPAR δ , carrils 7, 8 i 9). PPAR α interacciona fortament amb la proteïna Sp1 transcrita i traduïda *in vitro*. En el cas de PPAR δ , el gel mostra una banda molt tènue que podria indicar una interacció molt dèbil o que podria ser fruit de les condicions del propi assaig.

En qualsevol cas, la interacció entre PPAR α i Sp1 és específica tal i com indiquen, la presència d'un TnT inespecífic que no interacciona amb GST-PPAR α (Figura 20A, carril 2) i els assaigs amb proteïna GST purificada i proteïna Sp1 que mostren que la interacció no depèn de la fracció GST de la proteïna de fusió (Figura 20B, carril 2).

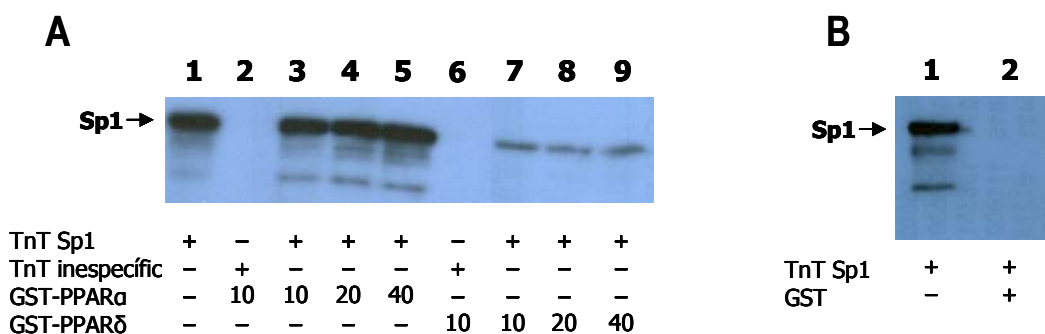


FIGURA 20.- PPAR α i PPAR δ presenten afinitats diferents per la proteïna Sp1 transcrita i traduïda *in vitro*. A.- Proteïna Sp1 transcrita i traduïda *in vitro* i marcada radioactivament amb S-35, o un TnT inespecífic, van ser incubats amb quantitats creixents (10 μ g, 20 μ g, 40 μ g) de proteïna GST-PPAR α (carril 2 pel TnT inespecífic i 3, 4 i 5 per Sp1) o GST-PPAR δ (carril 6 pel TnT inespecífic i 7, 8 i 9 per Sp1). Després de 4h d'incubació a 4°C i la purificació amb sefarsa de les proteïnes unides, aquestes van ser resoltes en un gel de poliacrilamida i revelades per fluorografia. B.- Proteïna Sp1 transcrita i traduïda *in vitro* i marcada radioactivament amb S-35 va ser incubada amb proteïna GST purificada (10 μ g). Després de 4h d'incubació a 4°C i la purificació amb sefarsa de la proteïna unida, aquesta va ser resolta en un gel de poliacrilamida i revelada per fluorografia. En ambdós casos, la quantitat de TnT resolta en absència de proteïnes GST correspon a un 25% de la quantitat de TnT incubada amb proteïnes GST (Figures A i B, carril 1).

2.2.2.2.- EXTRACTES NUCLEARS DE C2C12 MOSTREN UNA DIFERENT INTERACCIÓ DE PPAR α i PPAR δ AMB Sp1 SEGONS L'ESTAT DE DIFERENCIACIÓ

A partir dels resultats obtinguts amb proteïna transcrita i traduïda *in vitro* vam plantejar-nos descriure aquesta interacció amb extractes de cèl·lules musculars en cultiu. Es van realitzar els experiments de GST-pull-down amb extractes nuclears de cèl·lules C2C12 no diferenciades i de cèl·lules C2C12 diferenciades. L'objectiu era determinar si existien diferències en la interacció entre PPAR α i Sp1 segons l'estat de diferenciació de la cèl·lula, que poguessin explicar la diferent capacitat transactivadora de PPAR α observada en els assaigs de transfecció transitòria

RESULTATS

(Figura 19). La publicació sorgida en el moment de realitzar aquests experiments que mostrava els nivells d'expressió de Sp1 durant la diferenciació muscular d'aquesta línia cel·lular (De León et al., 2005) donava suport a aquesta idea. Els nivells de Sp1 queien dràsticament a les 72h de diferenciació.

Per realitzar aquests experiments, es van obtenir extractes nuclears de cèl·lules C2C12 no diferenciades i de cèl·lules C2C12 després de 6 dies de diferenciació i proteïnes de fusió GST-PPAR α i GST-PPAR δ . La Figura 21 mostra la interacció de PPAR α i PPAR δ amb Sp1, en les diferents condicions d'assaig.

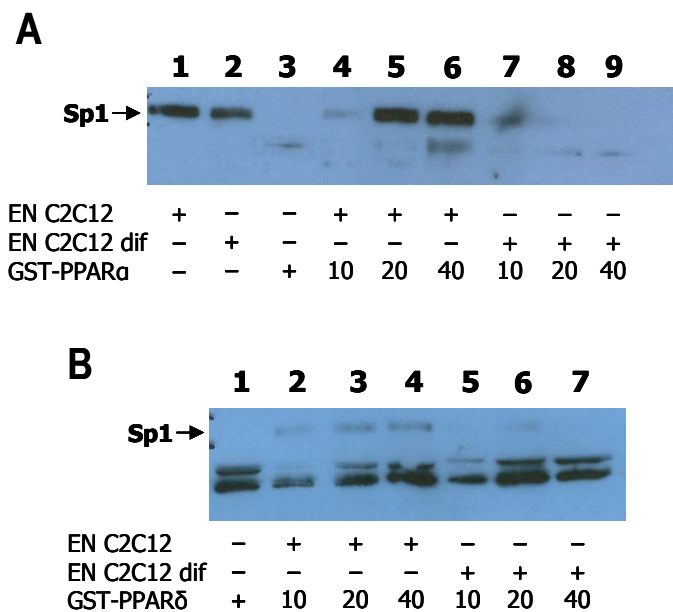


FIGURA 21.- PPAR α i PPAR δ interaccionen de manera diferent amb Sp1 segons l'estat de diferenciació de les cèl·lules Extractes nuclears de C2C12 (EN C2C12) (20 μ g) i extractes nuclears de C2C12 diferenciades (EN C2C12 dif) (20 μ g) van ser incubats amb quantitats creixents (10 μ g, 20 μ g, 40 μ g) de proteïna GST-PPAR α (**A**) o GST-PPAR δ (**B**), tal com s'indica. Després de 4h d'incubació a 4°C i la purificació amb sefarsa de les proteïnes unides, aquestes van ser resoltes en un gel de poliacrilamida i revelades per *Western Blot* amb anticòs anti-Sp1 (sc:59X) (Materials, apartat 6). En el panell A de la Figura s'inclouen dos carrils (1,2), que corresponen als extractes nuclears (5 μ g) en absència de proteïna de fusió GST. En ambdós casos, la quantitat d'extractes resolta en absència de proteïnes GST correspon a un 25% de la quantitat d'extractes incubada amb proteïnes GST. A la Figura també s'inclou un carril amb la proteïna de fusió GST-PPAR α i GST-PPAR δ en absència d'extractes nuclears (Figura 21A, carril 3 i Figura 21B, carril 1, respectivament).

Els resultats obtinguts indiquen que la interacció entre Sp1 i PPAR α depèn de l'estat de diferenciació de les cèl·lules (Figura 21A). En els experiments amb extractes nuclears de cèl·lules C2C12 diferenciades no es detecta la interacció descrita anteriorment amb proteïna Sp1

RESULTATS

transcrita i traduïda *in vitro* (Figura 20). Aquesta interacció sí que es detecta amb extractes nuclears de cèl·lules C2C12 no diferenciades. Com que no s'observen diferències en la quantitat de proteïna Sp1 present en els extractes nuclears de cèl·lules C2C12 diferenciades, respecte als de cèl·lules C2C12 no diferenciades (Figura 21A, carrils 1 i 2), cal pensar en modificacions del perfil proteic de les cèl·lules, segons el seu estat de diferenciació, que afavoreixi o no la interacció entre aquestes proteïnes.

Respecte a PPAR δ , la dèbil banda observada en els experiments amb proteïna Sp1 transcrita i traduïda *in vitro* es detecta aquí en els experiments amb extractes nuclears de cèl·lules C2C12 no diferenciades, però no en els d'extractes nuclears de cèl·lules C2C12 diferenciades. Aquests resultats indiquen que la dèbil interacció que pugui existir entre PPAR δ i Sp1 també depèn de l'estat de diferenciació de les cèl·lules

3.-CONTROL TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *CPT1B* HUMÀ EN OÒCITS DE *Xenopus laevis*

L'ús de *Xenopus laevis* en els laboratoris inclou tècniques de treball molt diverses. Aquests animals són un bon recurs en àrees crítiques de l'estudi de vertebrats. En el camp de la biologia cel·lular, els estudis amb *Xenopus laevis* han obert vies en el coneixement de la replicació cromosòmica, l'ensamblatge nuclear i cromatínic i els mecanismes de transducció de senyals.

En el nostre cas, vam pensar en la utilització d'oòcits de *Xenopus laevis* en substitució de les cèl·lules en cultiu i dels experiments de transfecció transitòria. Es tractava de treballar amb un sistema capaç d'estructurar el DNA introduït de manera el més similar possible al DNA cromosòmic eucariota. En els experiments de transfecció transitòria, els efectes estudiats fan referència sempre a un DNA plasmídic no integrat en el genoma.

El protocol, com ja s'ha explicat amb detall en els materials i mètodes, va consistir en microinjectar, en el nucli de l'oòcit (pol animal), una construcció reportera com a DNAss, juntament amb els plasmidis d'expressió dels diferents factors de transcripció com a DNAds. 72h després de la injecció, els oòcits eren recollits, lisats i assajats per quimioluminescència (Figura 22).

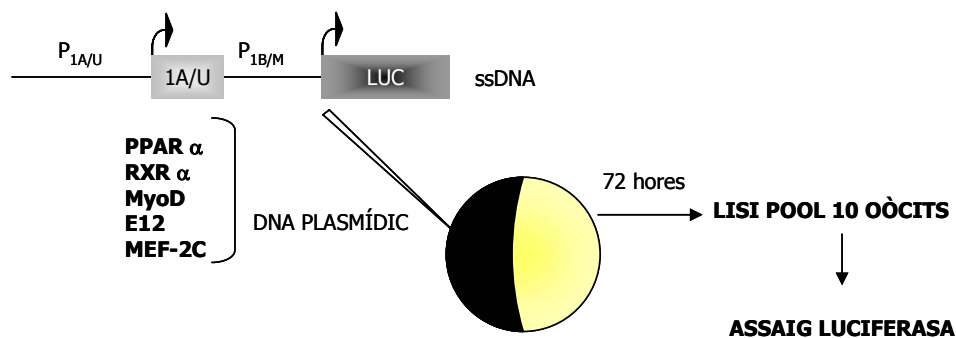


Figura 22.- Esquema del procés de microinjecció d'oòcits de *Xenopus laevis*. El DNA va ser injectat al pol animal dels oòcits de *Xenopus laevis* seleccionats amb un microinjector. La mescla de DNA contenia la construcció reportera com a DNAss i els diferents factors de transcripció estudiats com a DNA plasmídic. Els oòcits injectats van ser recollits a les 72 hores, lisats i assajats mesurant la luminescència emesa per la luciferasa produïda.

RESULTATS

Els resultats obtinguts indiquen que la resposta del promotor del gen *CPT1B* a PPAR α és màxima en presència dels factors de transcripció miogènics MyoD i MEF-2C (Figura 23).

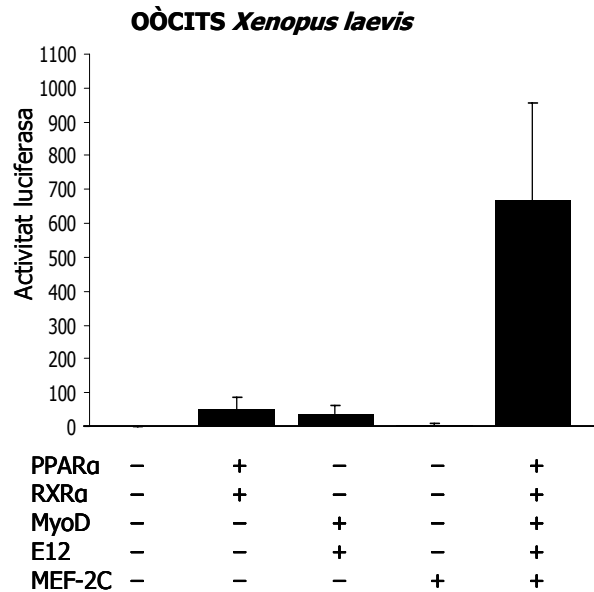


Figura 23.- Efecte sinèrgic de PPAR α i els factors miogènics MyoD i MEF-2C sobre el promotor de la *CPT1B*.

2ng (20nL) de DNA van ser injectats al pol animal dels oòcits de *Xenopus laevis*. La mescla de DNA contenia, la construcció reportera pCPTluc (0.06ng) com a DNAss, en presència i absència de pSG5-PPAR α , pJCXR (RXR α) (0.08ng, respectivament), pCDNA3-MEF-2C, pSG5-MyoD, pE12 (0.4ng, respectivament). Com a control d'injecció es va incloure pRL-CMV (0.02ng) a la mescla de DNA. Els oòcits injectats van ser recollits a les 72 hores, lisats i assajats mesurant la luminescència emesa per la luciferasa produïda.

Tal i com s'havia observat en transfeccions transitòries de cèl·lules en cultiu, existeix un efecte sinèrgic entre PPAR α i els factors miogènics en l'activació transcripcional del gen *CPT1B*.

REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE CPT

**1.- CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1A DE PORC.
ESTUDIS AMB CONSTRUCCIONS QUIMÈRIQUES.
(ARTICLE-2-)**

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 277, No. 12, Issue of March 22, pp. 10044–
10049, 2002

**Pig Liver Carnitine Palmitoyltransferase CHIMERA STUDIES SHOW THAT BOTH THE N-
AND C-TERMINAL REGIONS OF THE ENZYME ARE IMPORTANT FOR THE UNUSUAL HIGH
MALONYL-CoA SENSITIVITY***

Carine Nicot‡, Joana Relat‡, Gebre Woldegiorgis§, Diego Haro‡, and Pedro F. Marrero‡¶

From the ‡Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of
Barcelona, 08028 Barcelona, Spain and the §Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Oregon Graduate Institute School of Science and Engineering, Oregon Health and Science
University, Beaverton, Oregon 97006 8921

Received for publication, October 16, 2001, and in revised form, January 9, 2002 Published, JBC
Papers in Press, January 14, 2002, DOI 10.1074/jbc.M109976200

RESUM

Els isotips hepàtics de l'enzim carnitina palmitoïltransferasa de porc (PLCPT1) i de rata (RLCPT1) presenten afinitats similars als substrats palmitoïl-CoA i carnitina, però difereixen clarament en la sensibilitat al seu inhibidor fisiològic malonil-CoA. En aquest punt, la PLCPT1 (IC₅₀: 141nM) s'aproxima més a un isotip muscular (IC₅₀:69nM) que a un isotip hepàtic (IC₅₀: 2000nM). La CPT1A de porc es comporta, de manera natural, com una quimera entre els isotips A i B de les CPT1 (Nicot et al., 2001), fet que la converteix en una eina ideal per l'estudi de les relacions estructura-funció d'aquestes proteïnes.

Per tal d'aprofundir en l'elucidació de les regions de la proteïna importants per la sensibilitat al malonil-CoA i per la seva activitat enzimàtica ens vam plantejar la construcció de quimeres entre la CPT1A de rata i la CPT1A de porc i la construcció i caracterització cinètica de mutants delecionats en els primers 18 (Δ1-18) i 28 (Δ1-28) aminoàcids de la CPT1A de porc.

RESULTATS

Es van fer cinc construccions quimèriques entre la CPT1A de rata i la CPT1A de porc, intercanviant els extrems carboxils per una banda (Porc/Rata i Rata/Porc) i substituint regions petites de la regió carboxil de la CPT1A de rata, per la zona corresponent de la CPT1A de porc (Rata/Porc-A; Rata/Porc-B i Rata/Porc-C), per una altra. Els cinc enzims van resultar actius i amb afinitats pel palmitoïl-CoA i la carnitina equivalents a les dels enzims salvatges, indicant un plegament i una disposició del centre actiu similar a les proteïnes parenterals. Pel que fa a la sensibilitat a malonil-CoA, les construccions quimèriques presentaven valors de IC_{50} que corresponien a l'enzim del qual tenien la regió C-terminal. Excepte Porc/Rata, la resta tenien sensibilitats a l'inhibidor pròximes a l'enzim CPT1A de porc.

Paral·lelament, es van generar dues construccions mutants de CPT1A de porc delecionant els primers 18 ($\Delta 1-18$) i 28 ($\Delta 1-28$) aminoàcids i dues construccions iguals a partir de la quimera Porc/Rata. La caracterització cinètica d'aquests enzims mostra que tots ells són molt insensibles a malonil-CoA (IC_{50} de l'ordre de 100 μM), però existeixen diferències estadístiques entre ($\Delta 1-18$) de porc o ($\Delta 1-18$) de Porc/Rata respecte ($\Delta 1-28$) de porc o ($\Delta 1-28$) de Porc/Rata, sent aquestes últimes menys insensibles (més sensibles).

Dels resultats obtinguts en aquest estudi es dedueix que l'extrem C-terminal de les proteïnes CPT1A es comporta com un únic domini que marca el grau de sensibilitat a malonil-CoA d'aquests enzims. Alhora, veient que la delecio dels primers 18 aminoàcids de PLCPT1 o de la quimera Porc/Rata genera enzims amb IC_{50} similars se suggereix que existeix una interacció entre els primers 18 aminoàcids de la proteïna i l'extrem C-terminal, sent aquesta interacció la que realment determina la sensibilitat a l'inhibidor dels enzims CPT1A. Com que els 18 primers aminoàcids de les CPT1A de porc i de rata són idèntics, cal pensar que aquesta interacció depèn de l'estructura primària i secundària que adopta la regió carboxil de les diferents proteïnes.

Pig Liver Carnitine Palmitoyltransferase

CHIMERA STUDIES SHOW THAT BOTH THE N- AND C-TERMINAL REGIONS OF THE ENZYME ARE IMPORTANT FOR THE UNUSUAL HIGH MALONYL-CoA SENSITIVITY*

Received for publication, October 16, 2001, and in revised form, January 9, 2002
Published, JBC Papers in Press, January 14, 2002, DOI 10.1074/jbc.M109976200

Carine Nicot‡, Joana Relat‡, Gebre Woldegiorgis§, Diego Haro‡, and Pedro F. Marrero‡¶

From the ‡Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain and the §Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Graduate Institute School of Science and Engineering, Oregon Health and Science University, Beaverton, Oregon 97006 8921

Pig and rat liver carnitine palmitoyltransferase I (L-CPTI) share common K_m values for palmitoyl-CoA and carnitine. However, they differ widely in their sensitivity to malonyl-CoA inhibition. Thus, pig L-CPTI has an IC_{50} for malonyl-CoA of 141 nM, while that of rat L-CPTI is 2 μ M. Using chimeras between rat L-CPTI and pig L-CPTI, we show that the entire C-terminal region behaves as a single domain, which dictates the overall malonyl-CoA sensitivity of this enzyme. The degree of malonyl-CoA sensitivity is determined by the structure adopted by this domain. Using deletion mutation analysis, we show that malonyl-CoA sensitivity also depends on the interaction of this single domain with the first 18 N-terminal amino acid residues. We conclude that pig and rat L-CPTI have different malonyl-CoA sensitivity, because the first 18 N-terminal amino acid residues interact differently with the C-terminal domain. This is the first study that describes how interactions between the C- and N-terminal regions can determine the malonyl-CoA sensitivity of L-CPTI enzymes using active C-terminal chimeras.

The outer mitochondrial membrane enzyme carnitine palmitoyltransferase I (CPTI)¹ catalyzes the conversion of long-chain acyl-CoAs to acylcarnitines in the presence of L-carnitine. This is the initial step in the entry of long-chain fatty acids into the mitochondrial matrix, where they undergo β oxidation. This is also the first rate-limiting step in fatty acid oxidation in all tissues and is highly regulated by its physiological inhibitor, malonyl-CoA (1). Inhibition of CPTI by malonyl-CoA, the first intermediate in fatty acid synthesis, allows the cell to coordinate fatty acid oxidation and synthesis (2). Understanding the regulation of CPTI by malonyl-CoA is important since this enzyme is a potential pharmacological target in type 2 diabetes, where excessive fatty acid oxidation is undesirable and must be controlled.

There are two isotypes of CPTI: a liver (L-CPTI) and a muscle (M-CPTI) isotype. Both genes encode for proteins,

which share a high degree of identity but that differ markedly in their kinetic characteristics. L-CPTI has a much lower K_m for carnitine and a higher IC_{50} for malonyl-CoA inhibition than the muscle isotype (1). These kinetic characteristics of the liver and muscle enzymes are also retained when the cDNAs are expressed in a heterologous system (3–6). CPTI is an integral membrane protein that has two α -helical hydrophobic transmembrane domains, the amino and most of the carboxyl regions being exposed to the cytosolic face of the membrane (7).

It has been shown that the first 18 N-terminal amino acids of L-CPTI play a critical role in malonyl-CoA sensitivity since deletion of this region leads to loss of inhibition by malonyl-CoA (8). Further work demonstrated that this region acts as a positive determinant of malonyl-CoA sensitivity, while amino acids 19–30 act as a negative determinant (9). Interestingly, although the first 18 amino acids of rat L-CPTI and M-CPTI are identical, the role of the M-CPTI N-terminal residues in determining malonyl-CoA sensitivity is different (10). Pig L-CPTI encodes for a 772-amino acid protein that shares 86 and 63% identity with rat L-CPTI and human M-CPTI, respectively. When expressed in the yeast *Pichia pastoris*, the pig L-CPTI enzyme shows kinetic characteristics similar to human or rat L-CPTI (11). However, the pig enzyme, unlike the rat liver enzyme, shows a much higher sensitivity to malonyl-CoA inhibition that is characteristic of human or rat M-CPTI enzymes (10, 11). Therefore, pig L-CPTI behaves like a natural chimera of the L- and M-CPTI isotypes, which makes it a useful model to study the structure-function relationships of the CPTI enzymes (11). Because the sequence identity between the pig and rat L-CPTIs is high, we predicted that chimeric proteins that combine segments of the C-terminal domain from pig and rat L-CPTIs would be active. Thus, in this study, we focused our attention on changes in malonyl-CoA sensitivity observed in chimeric pig and rat L-CPTI enzymes. In addition, we also studied the presence of positive and negative determinants of malonyl-CoA sensitivity in the N-terminal region of pig L-CPTI and the putative role of such determinants in the observed aberrant kinetic behavior of this enzyme.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of Expression Plasmids—Pig L-CPTI and rat L-CPTI were subcloned into pHW010, generating PLCPTI/pHW010 and RL-CPTI/pHW010 as previously described (11, 12). To generate the chimeras, a *Hind*III site (shown in italics in the primer sequence below) was introduced into the cDNAs of both enzymes by overlap extension. Both cDNAs were modified using the same strategy: two independent PCRs (15 cycles each) were performed with primers A (5'-CTCCCTGAAGCT-TCTGCTCTCTAC-3') and B (5'-CGTAGTTGCTGTTCACC-3'), and primers C (5'-GCCTTTCAGTTCACGGTAC-3') and D (5'-GTAG-GAGAGCAGAAGCTTCAGGGAG-3') using the pig and rat L-CPTI cDNAs as templates. In the subsequent overlap extension reaction, 200 ng of each PCR product was annealed and reamplified for a further 15

* This research was supported by the Fundació la Marató de TV3 (to P. M.), the Direcció General de Investigació Científica y Tècnica Grant PB97-0958 (to D. H.), and National Institutes of Health Grant HL52571 (to G. W.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Departament de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona., Av. Diagonal, 643, Barcelona 08028, Spain. Tel.: 34-93-403-45-00; Fax: 34-93-402-18-96; E-mail: pmar@farmacia.far.ub.es.

¹ The abbreviations used are: CPTI, carnitine palmitoyltransferase I; L-CPTI, liver isotype of CPTI; M-CPTI, muscle isotype of CPTI; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

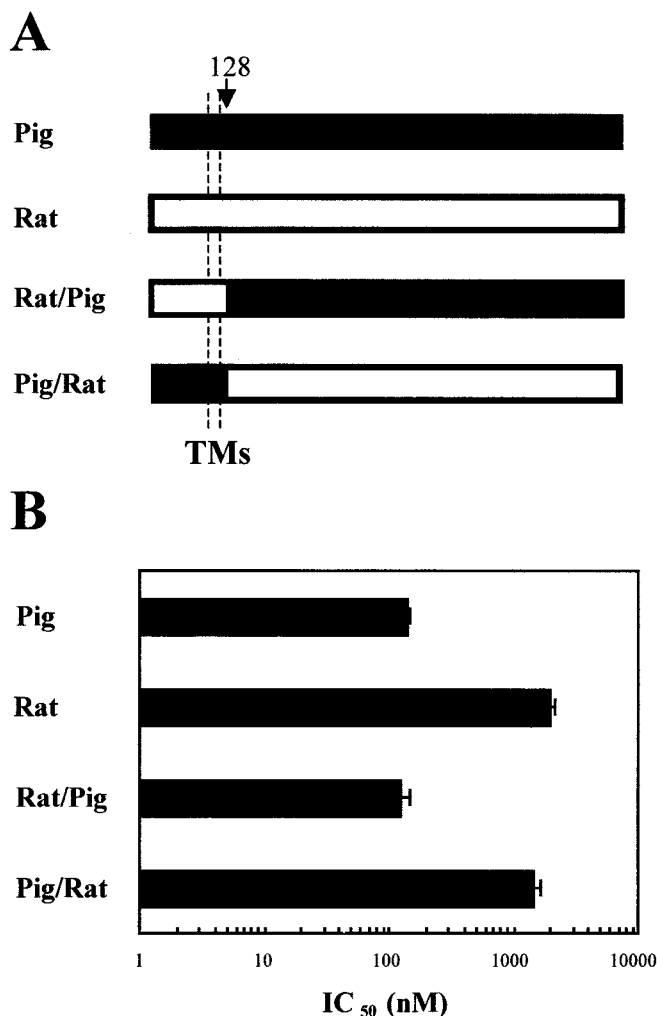


FIG. 1. Role of the C-terminal region in determining the IC₅₀ for malonyl-CoA. A, schema of pig and rat L-CPTI chimeras. The number over the vertical arrow indicates the amino acid number at which both proteins were recombined. TMs indicates the position of the two transmembrane domains. B, isolated mitochondria were assayed for CPT activity in the presence of increasing concentrations of malonyl-CoA, as described under "Experimental Procedures." Each construct was assayed at least three times with at least two independent mitochondrial preparations.

cycles of PCR using primers A and D. The resulting PCR products were digested with *Bgl*II and cloned into either *Bgl*II-cut PLCPTI/pHW010 or *Bgl*II-cut RLCPTI/pHW010, generating Pig- and Rat-V128L/pHW010. This resulted in the introduction of a point mutation, valine to leucine, at position 128. This mutation did not affect the kinetic characteristics of the enzymes (results not shown).

To construct the pig/rat and rat/pig L-CPTI chimeras, Pig- and Rat-V128L/pHW010 were digested with *Eco*RI to remove the inserts that were subcloned into *Eco*RI-cut BSSK⁺. The resulting plasmids, Pig- and Rat-V128L/BSSK⁺ were digested with *Hind*III. The restriction enzyme *Hind*III cuts Pig- and Rat-V128L/pHW010 before the ATG start codon of the insert, and the pig and rat cDNA inserts at position 384 after the ATG start codon. The insert from the digested Pig-V128L/BSSK⁺ was ligated into *Hind*III-cut Rat-V128L/BSSK⁺ and vice versa, resulting in Pig/Rat and Rat/Pig inserts in BSSK⁺. The two inserts were then released and subcloned into *Eco*RI-cut pHW010.

A Rat/Pig-A L-CPTI chimera was generated from Pig-V128L/BSSK⁺. Pig-V128L/BSSK⁺ was digested with *Kpn*I that cuts before the ATG start codon of the insert and the pig L-CPTI cDNA at position 660. This insert was subcloned into *Kpn*I-cut Rat-V128L/BSSK⁺, resulting in the plasmid Pig/Rat3/BSSK⁺. Rat-V128L/BSSK⁺ was cut with *Hind*III. *Hind*III cuts Rat-V128L/BSSK⁺ before the ATG start codon of the insert and the rat L-CPTI cDNA at position 384. This insert was purified and subcloned in the correct orientation into *Kpn*I-cut Pig/Rat3/BSSK⁺, resulting in Rat/PigA/BSSK⁺. The insert from Rat/PigA/BSSK⁺ was

excised by digestion with *Eco*RI and ligated in the correct orientation into *Eco*RI-cut pHW010, resulting in Pig/Rat-A L-CPTI in pHW010.

Rat/Pig-B was generated from Pig-V128L/BSSK⁺. Pig-V128L/BSSK⁺ was cut with *Xho*I and *Stu*I. *Xho*I cuts Pig-V128L/BSSK⁺ before the ATG start codon, and *Stu*I cuts the insert at position 1770 after the start codon. This insert was purified and cloned in the correct orientation into *Xho*I/*Stu*I-cut Rat-V128L/BSSK⁺, resulting in Pig/Rat2/BSSK⁺. Rat-V128L/BSSK⁺ was cut with *Kpn*I that cuts Rat-V128L/BSSK⁺ before the ATG start codon of the insert and the rat cDNA at position 660. This insert was purified and cloned in the correct orientation into *Kpn*I-cut Pig/Rat2/BSSK⁺, generating Rat/PigB in BSSK⁺. The insert from Rat/PigB/BSSK⁺ was excised with *Eco*RI and ligated in the correct orientation into *Eco*RI-cut pHW010, resulting in Rat/Pig-B L-CPTI cDNA in pHW010.

Rat/Pig-C was generated from Rat-V128L/BSSK⁺. Rat-V128L/BSSK⁺ was cut with *Xho*I and *Stu*I. *Xho*I cuts Rat-V128L/BSSK⁺ before the ATG start codon, and *Stu*I cuts the insert at position 1770 after the start codon. This insert was purified and subcloned in the correct orientation into *Xho*I/*Stu*I-cut Pig-V128L/BSSK⁺, resulting in Rat/Pig-C in BSSK⁺. The insert from Rat/Pig-C in BSSK⁺ was excised with *Eco*RI and ligated in the correct orientation into *Eco*RI-cut pHW010, resulting in Rat/Pig-C in pHW010.

To generate Δ 18Pig, the pig L-CPTI cDNA was amplified with the primers Δ 18fwd (5'-GACATCGAATTCATGATCGACCTTCGAATGAGC-3') and primer D. An ATG start codon (shown in bold) was added immediately after the *Eco*RI site (shown in italics). The PCR product was cloned into *Eco*RV-cut BSSK⁺, resulting in the plasmid Δ 18/BSSK⁺. Pig-V128L/BSSK⁺ was cut with *Aat*II and *Not*I. *Aat*II cuts the insert at position 508, and *Not*I cuts Pig-V128L/BSSK⁺ after the stop codon. The resulting plasmid, Δ 18Pig/BSSK⁺, was digested with *Eco*RI, and the insert was cloned into *Eco*RI-cut pHW010, generating Δ 18Pig/pHW010. Δ 28Pig was generated in the same way but using the primer Δ 28fwd (5'-GACATCGAATTCATGAGGCAGATCTATCTGTCT-3') instead of Δ 18fwd. Δ 18Pig/Rat and Δ 28Pig/Rat were generated following the same strategy and using as template Δ 18Pig/BSSK⁺ and Δ 28Pig/BSSK⁺, respectively. Both plasmids were amplified with the primers T7 and primer D. The resulting PCR products were digested with *Hind*III and *Eco*RV and cloned into *Eco*RV/*Hind*III-cut Pig/Rat/BSSK⁺, resulting in Δ 18 Pig/Rat and Δ 28 Pig/Rat in BSSK⁺. The insert from Δ 18 Pig/Rat and Δ 28 Pig/Rat in BSSK⁺ were excised with *Eco*RI and ligated in the correct orientation into *Eco*RI-cut pHW010, resulting in Δ 18Pig/Rat and Δ 28Pig/Rat in pHW010.

P. pastoris Transformation—All constructs were linearized in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP) gene promoter by digestion with *Pag*I and integrated into the GAP gene promoter locus of *P. pastoris* GS115 by electroporation (13). Histidine prototrophic transformants were selected on YND (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI)) plates and grown on YND medium. Mitochondria were isolated by disrupting the yeast cells with glass beads as previously described (12, 14).

CPT Assay—CPT activity was assayed by the forward exchange method using L-[³H]carnitine as previously described (12). The standard assay reaction mixture contained in a total volume of 0.5 ml: 200 mM L-[³H]carnitine (~10,000 dpm/nmol), 80 μ M palmitoyl-CoA, 20 mM HEPES (pH 7.0), 1% fatty acid-free albumin, and 40–75 mM KCl with or without malonyl-CoA as indicated. Incubations were performed for 3 min at 30 °C. The *K_m* for palmitoyl-CoA was determined by varying the palmitoyl-CoA concentration in the presence of a fixed molar ratio (6.1:1) of palmitoyl-CoA:albumin as previously described (13).

Western Blot Analysis and DNA Sequencing—Proteins were separated by SDS-PAGE in a 6% gel and transferred onto nitrocellulose membranes as previously described (12). Pig L-CPTI-specific antibody was obtained as previously described (11) and used at a 1:1000 dilution. Proteins were detected using the ECL chemiluminescence system (Amersham Biosciences). DNA sequencing was performed using the Big Dye™ kit (Applied Biosystems, PerkinElmer Life Sciences) according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

Generation of Mutant CPT Proteins for Expression in P. pastoris—All constructions were performed as described in "Experimental Procedures." Sequences were confirmed by DNA sequencing. *P. pastoris* was chosen as an expression system because it does not have endogenous CPT activity and because other CPT proteins have been successfully expressed using this system (4, 11, 12). All constructs were subcloned in the vector

TABLE I
Activity and malonyl-CoA sensitivity for yeast-expressed wild type and mutant L-CPTI constructs

Mitochondria (100 μ g) from the yeast strains expressing wild-type or L-CPTI chimeras were assayed for CPT activity and kinetic parameters as described under "Experimental Procedures." Each construct was assayed at least three times with at least two independent mitochondrial preparations.

Strain	Activity	Carnitine	Palmitoyl-CoA
	nmol/min/mg	K_m (μ M)	K_m (μ M)
Wild-type			
Pig L-CPTI	5.2 \pm 0.6	126.3 \pm 4.3	35.4 \pm 2.0
Rat L-CPTI	7.8 \pm 0.5	100.3	43.0
Mutants			
Pig/Rat	7.1 \pm 1.2	147.6 \pm 33.6	31.5 \pm 4.1
Rat/Pig	18.2 \pm 1.9	104.6 \pm 7.3	52.0 \pm 7.0
Rat/Pig-A	5.5 \pm 0.5	107.0 \pm 35.5	60.0 \pm 12.0
Rat/Pig-B	4.8 \pm 0.5	111.0 \pm 29.0	43.3 \pm 8.0
Rat/Pig-C	6.5 \pm 0.7	110.7 \pm 28.0	45.1 \pm 9.0
Δ 18	12.3 \pm 1.3	82.7 \pm 8.1	63.0 \pm 5.4
Δ 28	12.7 \pm 0.7	97.0 \pm 10.3	61.8 \pm 14.2
Δ 18 Pig/Rat	8.5 \pm 0.6	123.6 \pm 9.3	49.7 \pm 6.2
Δ 28 Pig/Rat	8.7 \pm 1.2	101.7 \pm 8.7	47.4 \pm 5.3

pHW010 and expressed under the control of the GAP gene promoter (6). Yeast transformants were grown as previously described (12). No CPT activity was found in the control yeast strain with the empty vector (data not shown).

Chimeric Proteins—Pig/Rat and Rat/Pig L-CPTI were constructed as shown in Fig. 1A by ligating pig and rat L-CPTI together just after the second transmembrane domain. These two chimeras have similar affinity for carnitine and palmitoyl-CoA as the parental wild-type enzymes (Table I). The IC_{50} of the Pig/Rat L-CPTI construct was similar to that of rat L-CPTI, while the IC_{50} of the Rat/Pig construct was similar to that of the wild-type pig L-CPTI (Fig. 1B). We previously showed that pig L-CPTI migrates anomalously faster than its predicted molecular weight on SDS-PAGE. Western blot analysis of Pig/Rat and Rat/Pig L-CPTI shows that it is the C-terminal region that dictates the migration pattern of L-CPTI proteins (Fig. 2).

To construct carboxyl-end chimeras, the C-terminal region was divided into three discrete regions: region A, from the second transmembrane domain (amino acid 128) to amino acid 220; region B, from amino acid 220–590; and region C, from amino acid 590 to the end. The three carboxyl-end chimeras were based on rat L-CPTI in which regions A, B, or C were substituted by the corresponding region of pig L-CPTI, generating Rat/Pig-A, Rat/Pig-B and Rat/Pig-C (Fig. 3A). Rat/Pig-A, -B, and -C were expressed in *P. pastoris*, and mitochondria were isolated from the yeast strains expressing each construct and tested for activity and malonyl CoA sensitivity. The chimeras were all active, with similar specific CPT activities and similar affinity for carnitine and palmitoyl-CoA as the parental wild-type enzymes (Table I). Fig. 3B shows that Rat/Pig-A, -B, and -C were all sensitive to malonyl-CoA inhibition, indicating that all these chimeras have a functional malonyl-CoA binding site. Fig. 3B also shows that, surprisingly, the three C-terminal region chimeras had malonyl-CoA sensitivity similar to that of wild-type pig L-CPTI. Statistical analysis showed that the difference in malonyl-CoA sensitivity between pig L-CPTI, Rat/Pig-A, Rat/Pig-B, and Rat/Pig-C were not statistically different ($p = 0.118$).

Fig. 4 shows that two of the C-terminal region chimeras, Rat/Pig-A and -C, migrated on SDS-PAGE gels according to their molecular weights, while Rat/Pig-B chimera migrated faster than expected from the predicted molecular weight. Thus, in our hands, Rat/Pig-A and -C are the first CPTI analyzed chimeras in which there is not a direct correlation between an anomalous protein migration pattern on SDS-PAGE with a high degree of enzyme sensitivity to malonyl-CoA inhibition (Fig. 3B).

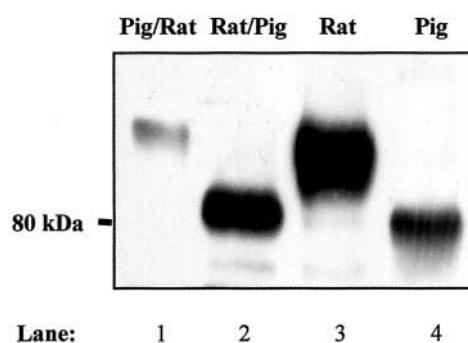


FIG. 2. Immunoblot showing expression of chimeras and wild-type L-CPTI enzymes in the yeast *P. pastoris*. Mitochondria (10 μ g of protein) were separated on a 6% SDS-PAGE. The immunoblot was performed as described under "Experimental Procedures." Lane 1, Pig/Rat chimera; lane 2, Rat/Pig chimera; lane 3, wild-type rat L-CPTI; and lane 4, wild-type pig L-CPTI.

N-terminal Deletion Mutants—Four N-terminal deletion mutants, Δ 18 Pig, Δ 18 Pig/Rat, Δ 28 Pig, and Δ 28 Pig/Rat, were expressed in *P. pastoris*. Mitochondria isolated from the yeast strains expressing each of the deletion mutants (Fig. 5A) had specific activity of 12.3 \pm 1.3, 8.5 \pm 0.6, 12.7 \pm 0.7, and 8.7 \pm 1.2 nmol/min/mg of protein, respectively. The four deletion mutants were highly insensitive to malonyl-CoA inhibition (Fig. 5B), but statistical difference was observed in regards to malonyl-CoA sensitivity between Δ 18 or Δ 18 Pig/Rat versus Δ 28 or Δ 28 Pig/Rat (Fig. 5). They migrated on SDS-PAGE gels according to their molecular weight (Fig. 6), taking into account the anomalous migration pattern of the parental protein in the case of Δ 18 Pig and Δ 28 Pig (Fig. 6).

DISCUSSION

The C-terminal Region of L-CPTI Behaves As a Single Domain—Pig L-CPTI and rat L-CPTI have the same K_m values for carnitine and palmitoyl-CoA but differ markedly in regards to their malonyl-CoA sensitivity: pig L-CPTI has an IC_{50} value of 141 nM (10), while that of rat L-CPTI is 2 μ M (8). To date all studies using chimeric proteins have been performed using combinations of L-CPTI and M-CPTI (9, 10, 15). Interpretation of such studies has often been difficult because the liver and muscle isotype have only 62% sequence identity, and they differ in both their affinity for carnitine and sensitivity to malonyl-CoA inhibition. Moreover, chimeric proteins of the 197 N-terminal amino acid residues between rat L-CPTI and human M-CPTI were reported to be inactive (10), probably because of the low degree of identity (62%) between the L-CPTI and M-CPTI isotypes.

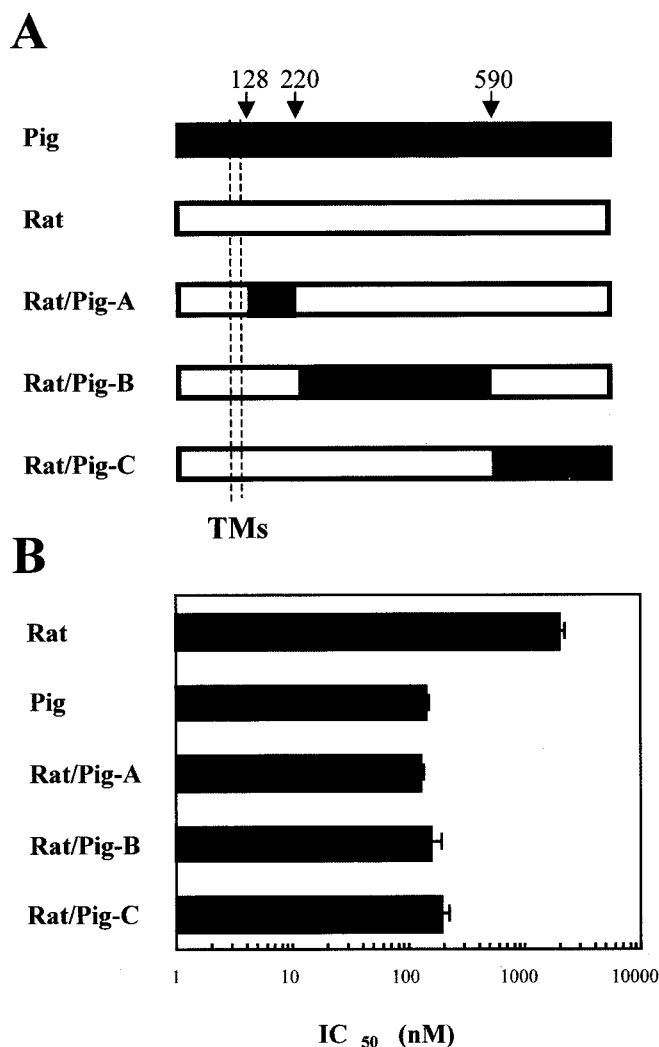


FIG. 3. The C-terminal region behaves as a single domain with respect to the sensitivity to malonyl-CoA inhibition. *A*, schema of pig and rat L-CPTI chimeras. The numbers over the vertical arrows indicate the amino acid number at which the proteins were recombined. *TMs* indicate the position of the two transmembrane domains. *B*, isolated mitochondria were assayed for CPT activity in the presence of increasing concentrations of malonyl-CoA, as described under "Experimental Procedures." Each construct was assayed at least three times with at least two independent mitochondrial preparations.

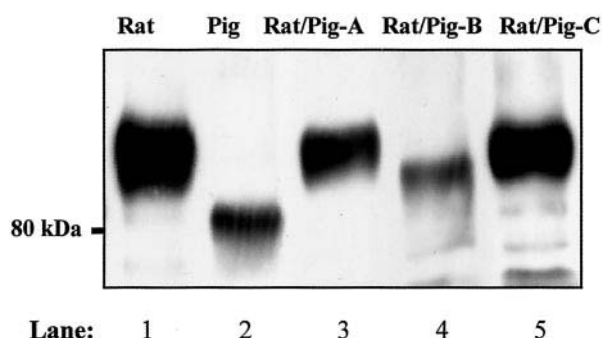


FIG. 4. Immunoblot showing expression of wild-type and chimeric L-CPTI enzymes in the yeast *P. pastoris*. Mitochondria (10 μ g of protein) were separated on a 6% SDS-PAGE. The immunoblot was performed as described under "Experimental Procedures." Lane 1, wild-type rat L-CPTI; lane 2, wild-type pig L-CPTI; lanes 3, 4, and 5 represent Rat/Pig-A, Rat/Pig-B, and Rat/Pig-C chimeras, respectively.

To perform a functional study of the C-terminal domain of L-CPTI proteins, we constructed chimeric proteins between pig and rat L-CPTI proteins. We predicted these chimeras would

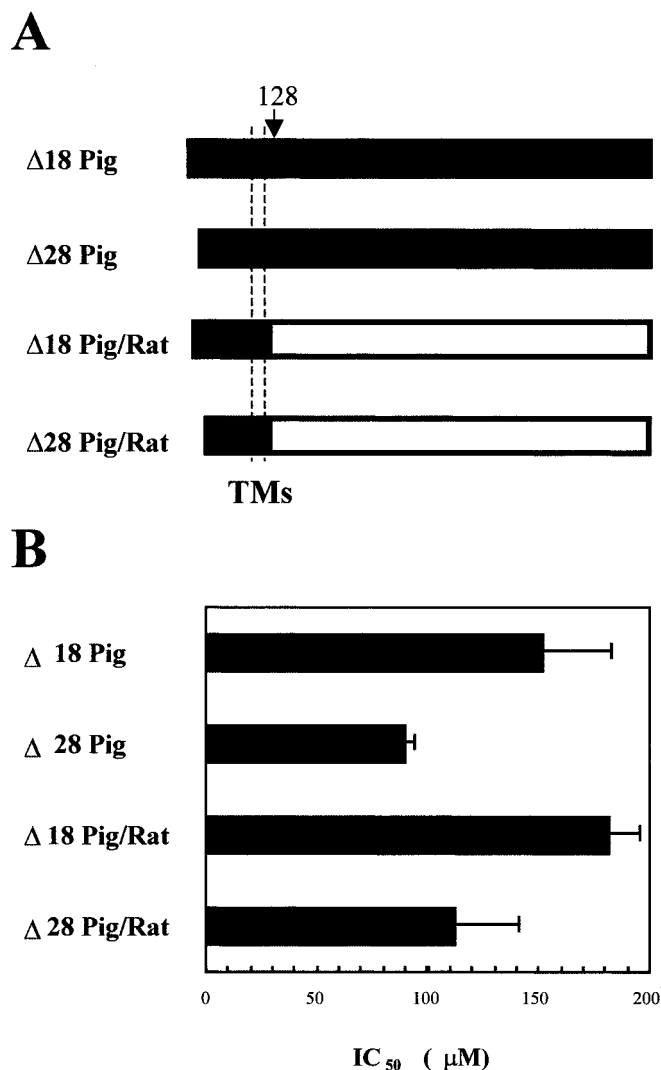


FIG. 5. The C-terminal domain determines the degree of sensitivity to malonyl-CoA inhibition through its interaction with the N-terminal end. *A*, schema of N-terminal deletion mutants obtained from pig or pig/rat L-CPTI. The number over the vertical arrow indicates the amino acid number at which both proteins were recombined. *TMs* indicates the position of the two transmembrane domains. *B*, isolated mitochondria were assayed for CPT activity in the presence of increasing concentrations of malonyl-CoA, as described under "Experimental Procedures." Each construct was assayed at least three times with at least two independent mitochondrial preparations. Statistical analysis, using one-way analysis of variance, indicated that the average IC₅₀ value of the Δ 18 deletion mutant was significantly different from that of the Δ 28 deletion mutants ($p > 0.05$). The average IC₅₀ value of the construct Δ 18 Pig/Rat was also significantly different from that of Δ 28 Pig/Rat ($p > 0.05$). However, there was no significant difference between the average IC₅₀ values of Δ 18 versus Δ 18 Pig/Rat and Δ 28 versus Δ 28 Pig/Rat ($p > 0.05$).

be active because pig and rat L-CPTI share a high degree of identity (86%) compared with 62% identity between rat L-CPTI and human/rat M-CPTI, making it more likely that the resulting C-terminal chimeras would be active. Moreover, pig and rat L-CPTI only differ in their degree of malonyl-CoA sensitivity, which makes a chimeric protein between the two proteins a good tool to study the regulation of L-CPTI by malonyl-CoA.

Pig/Rat and Rat/Pig L-CPTI chimeras have the same K_m values for carnitine and palmitoyl-CoA as the parental proteins, which predicts that the active site of these chimeric proteins is similar to that of the parental proteins (Table I), thus suggesting that they adopt a similar active site conformation as the corresponding wild-type enzymes. The IC₅₀ values

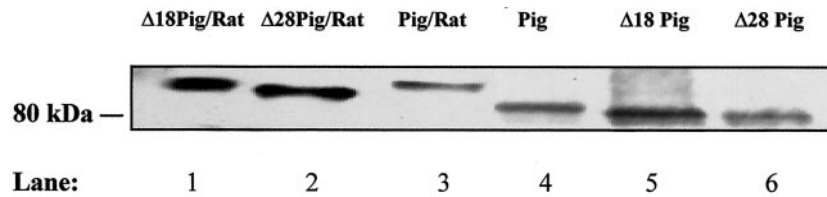


FIG. 6. Immunoblots showing expression of wild-type and deletion mutants L-CPTI enzymes in the yeast *P. pastoris*. Mitochondria (10 μ g of protein) were separated on a 6% SDS-PAGE. The immunoblot was performed as described under "Experimental Procedures." Lanes 1 and 2, Δ 18 Pig/Rat and Δ 28 Pig/Rat, respectively; lane 3, Pig/Rat chimera; lane 4, wild-type pig L-CPTI; and lanes 5 and 6 represent Δ 18 Pig and Δ 28 Pig deletion mutants, respectively.

for malonyl CoA inhibition of these two constructs shows that the C-terminal region dictates the degree of malonyl-CoA sensitivity of the overall enzyme (Fig. 1B). This is in agreement with the results obtained from chimeric proteins between rat L-CPTI and human/rat M-CPTI (9, 10, 15).

Human/rat M-CPTI (4, 16) and pig L-CPTI (11) migrate faster on SDS gel electrophoresis than their predicted molecular weight. Since, these proteins maintain their anomalous migration pattern when produced *in vitro*, it is predicted that this phenomenon stems from intrinsic differences in the primary sequence of the two proteins. Western blot analysis of the Pig/Rat and Rat/Pig chimeras showed that the C-terminal region dictates the migration pattern of CPTI proteins, since they migrate according to their C-terminal region (Fig. 2). We predict that differences in the primary sequence of the C-terminal region of these proteins makes them adopt a conformation resistant to denaturation by SDS and thus causes the proteins to migrate faster than their predicted molecular weight.

The three carboxyl end chimeric proteins, Rat/Pig-A, Rat/Pig-B, and Rat/Pig-C, were active, allowing kinetic determination of C-terminal region chimeric proteins. Surprisingly, substitution of small rat L-CPTI fragments with the corresponding pig L-CPTI fragment (92, 370, and 183 amino acid residues for Rat/Pig-A, -B, and -C, respectively) was sufficient to confer high malonyl-CoA sensitivity to the rat L-CPTI (Fig. 3B). This result suggests the following. (i) None of the A, B, or C region is by itself uniquely responsible for the degree of malonyl-CoA sensitivity of the enzyme. Substitution of any of these regions of pig L-CPTI with the corresponding region of rat L-CPTI generates enzymes with malonyl-CoA sensitivity similar to that of the wild-type pig L-CPTI enzyme. This indicates that the C-terminal region of L-CPTI proteins behave as a single domain, which dictates the malonyl-CoA sensitivity of the enzyme. (ii) None of the chimeric proteins studied had a malonyl-CoA sensitivity value intermediate between that of wild-type pig and rat L-CPTI. All of them behaved like one of the parental (pig or rat) L-CPTI proteins, suggesting that the L-CPTI C-terminal region adopts two distinct structures: a low and a high malonyl-CoA sensitivity state. The high malonyl-CoA sensitivity state seems to be more susceptible to change into the low malonyl-CoA sensitivity state but not vice versa.

The finding that the entire C-terminal region of L-CPTI behaves as a single domain is in agreement with previous proteolytic studies with intact rat liver mitochondria. Early studies (17) showed that trypsin/chymotrypsin treatment of membrane-bound L-CPTI lead to a rapid decrease of activity but that this effect was partially overcome by malonyl-CoA binding. When L-CPTI was subjected to trypsin/chymotrypsin treatment in the presence of malonyl-CoA, the enzyme remained active, although a single 8-kDa fragment was liberated. The authors concluded that this 8-kDa fragment was not essential for catalytic function; however, at that stage further interpretation of these results was not possible. Using the current knowledge on L-CPTI structure and our results, we predict that the 8-kDa fragment liberated upon trypsin/chymo-

trypsin treatment is probably the extreme N-terminal region of L-CPTI (the first \sim 70 N-terminal amino acid residues) and that binding of malonyl-CoA to the enzyme may further tighten the highly folded state of the C-terminal domain, thus rendering it more inaccessible to trypsin/chymotrypsin treatment. Other studies showed that L-CPTI is highly resistant to proteolytic digestion at low, non-membrane disrupting concentrations of the proteases, suggesting that CPTI, and more specifically the C-terminal region, is highly folded (7, 18).

Previous reports by others and us correlated high sensitivity to malonyl-CoA inhibition of M-CPTI and pig L-CPTI with the anomalous SDS migration pattern of the enzyme (4, 11, 16). However, chimeras that share the carboxyl end of pig or rat L-CPTI (Rat/Pig-A and Rat/Pig-C) show a high degree of sensitivity to malonyl-CoA inhibition with a normal SDS migration pattern (Figs. 3B and 4). These results suggest that the primary structure of the enzyme plays a role in determining the sensitivity to malonyl-CoA inhibition independently of its role in the overall structure.

The C-terminal Domain Determines the Degree of Sensitivity to Malonyl-CoA Inhibition through Its Interaction with the N-terminal End—The fact that Δ 18 Pig is more sensitive to malonyl-CoA inhibition than the Δ 28 Pig provides evidence that the extreme N-terminal region of pig L-CPTI contains positive (amino acids 1–18) and negative (amino acids 19–28) determinants of malonyl-CoA sensitivity, like rat L-CPTI (19). Hence, although pig L-CPTI is highly sensitive to malonyl-CoA inhibition like rat/human M-CPTI that do not have the negative determinant of malonyl-CoA sensitivity, its N-terminal region appears to have the same function as the low malonyl-CoA sensitive rat L-CPTI.

Interestingly, while Pig and Pig/Rat L-CPTI have different malonyl-CoA sensitivity, deletion of the first 28 N-terminal amino acid residues from these two constructs generates enzymes, Δ 28 Pig and Δ 28 Pig/Rat L-CPTI, which have similar malonyl-CoA sensitivity (Fig. 5B). This suggests that the first 28 amino acid residues determine the difference in malonyl-CoA sensitivity between pig and rat L-CPTIs. The same result was obtained when only the first 18 N-terminal amino acids were deleted (Δ 18 Pig and Δ 18 Pig/Rat L-CPTI), which suggests that the first 18 N-terminal amino acids are sufficient to determine the difference in malonyl-CoA sensitivity between pig and rat L-CPTIs.

In summary, our data demonstrate that (i) the C-terminal end of L-CPTI is a single domain that dictates the degree of malonyl-CoA sensitivity of L-CPTI enzymes and (ii) deletion of the first 18 N-terminal amino acid residues of pig and Pig/Rat L-CPTIs generates enzymes with similar IC_{50} values. This suggests that the first 18 N-terminal amino acid residues and the C-terminal domain interact and that it is this interaction that determines the degree of malonyl-CoA sensitivity of L-CPTI. Since the first 18 N-terminal amino acid residues are identical in pig and rat L-CPTIs, what determines the nature of this interaction is the primary and secondary structure of the C-terminal domain.

REFERENCES

1. McGarry, J. D., and Brown, N. F. (1997) *Eur. J. Biochem.* **244**, 1–14
2. Zammit, V. A. (1999) *Biochem. J.* **343**, 505–515
3. Brown, N. F., Esser, V., Foster, D. W., and McGarry, J. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26438–26442
4. Zhu, H., Shi, J., de Vries, Y., Arvidson, D. N., Cregg, J. M., and Woldegiorgis, G. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **347**, 53–61
5. Zhu, H., Shi, J., Cregg, J. M., and Woldegiorgis, G. (1997) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **239**, 498–502
6. Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., and Cregg, J. M. (1997) *Gene* **186**, 37–44
7. Fraser, F., Corstorphine, C. G., and Zammit, V. A. (1997) *Biochem. J.* **323**, 711–718
8. Shi, J., Zhu, H., Arvidson, D. N., Cregg, J. M., and Woldegiorgis, G. (1998) *Biochemistry* **37**, 11033–11038
9. Jackson, V. N., Cameron, J. M., Fraser, F., Zammit, V. A., and Price, N. T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 19560–19566
10. Shi, J., Zhu, H., Arvidson, D. N., and Woldegiorgis, G. (2000) *Biochemistry* **39**, 712–717
11. Nicot, C., Hegardt, F. G., Woldegiorgis, G., Haro, D., and Marrero, P. F. (2001) *Biochemistry* **40**, 2260–2266
12. de Vries, Y., Arvidson, D. S., Waterham, H. R., Cregg, J. M., and Woldegiorgis, G. (1997) *Biochemistry* **36**, 5285–5292
13. Shi, J., Zhu, H., Arvidson, D. N., and Woldegiorgis, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9421–9426
14. Dai, J., Zhu, H., Shi, J., and Woldegiorgis, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 22020–22024
15. Swanson, S. T., Foster, D. W., McGarry, J. D., and Brown, N. F. (1998) *Biochem. J.* **335**, 513–519
16. Esser, V., Brown, N. F., Cowan, A. T., Foster, D. W., and McGarry, J. D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6972–6977
17. Esser, V., Britton, C. H., Weis, B. C., Foster, D. W., and McGarry, J. D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5817–5822
18. Cohen, I., Kohl, C., McGarry, J. D., Girard, J., and Prip-Buus, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 29896–29904
19. Jackson, V. N., Zammit, V. A., and Price, N. T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 38410–38416

**2.- CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1B DE PORC AMB UNA BAIXA K_m
PER LA CARNITINA I UNA BAIXA SENSIBILITAT A LA INHIBICIÓ PER
MALONIL-CoA TÉ CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES SIMILARS A LA
CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1A DE RATA
(ARTICLE-3-)**

Biochemistry 2004, 43, 12686-12691

Pig Muscle Carnitine Palmitoyltransferase I (CPT1B), with Low K_m for Carnitine and Low Sensitivity to Malonyl-CoA Inhibition, Has Kinetic Characteristics Similar to Those of the Rat Liver (CPT1R) Enzyme†

Joana Relat,‡ Carine Nicot,‡ Mar Gacias,‡ Gebre Woldegiorgis,§ Pedro F. Marrero,* ,‡ and Diego Haro‡

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain, and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, Oregon 97006-8921.

Received June 3, 2004; Revised Manuscript Received July 22, 2004.

RESUM

L'enzim carnitina palmitoïltransferasa 1 catalitza la transesterificació dels acils-CoA amb carnitina permetent l'entrada dels àcids grassos de cadena llarga al mitocondri per la seva posterior β -oxidació. Existeixen tres isotips descrits CPT1A, CPT1B i CPT1C dels quals, A i B han estat àmpliament estudiats. Per norma general, les característiques cinètiques que defineixen els isotips hepàtics de les CPT1 són una alta afinitat per la carnitina i una baixa sensibilitat al malonil-CoA. Per contra, els isotips musculars acostumen a presentar una baixa afinitat per la carnitina i una alta sensibilitat al malonil-CoA. Anterior a aquest treball, l'estudi cinètic de la CPT1A de porc va mostrar el primer enzim que no complia aquestes dades. Es tracta d'un enzim amb característiques d'ambdós isotips que mostra una alta afinitat per la carnitina, pròpia de les CPT1A, i una alta sensibilitat al malonil-CoA, típica de les CPT1B.

RESULTATS

Partint d'aquests resultats previs ens vam plantejar clonar i caracteritzar l'isotip muscular de la CPT1 de porc. El cDNA de la CPT1B de porc va ser aïllat a partir de RNA muscular obtingut de porcs de dues setmanes de vida. Es tracta d'un cDNA que codifica per una proteïna de 772 aminoàcids amb una elevada identitat amb les seqüències aminoàcides de les CPT1B humana (88%), de rata (85%) i de ratolí (86%) i una molt menor identitat amb les de les CPT1A.

La proteïna CPT1B de porc va ser expressada en el sistema heteròleg de llevats (*Pichia pastoris*) per tal de determinar-ne les seves constants cinètiques i la seva mobilitat electroforètica en un gel SDS-PAGE.

La CPT1B de porc ha resultat ser un enzim amb característiques cinètiques particulars que no són compartides, ni pel seu homòleg en humans, ni pel seu homòleg en rata. Es tracta d'una CPT1B amb característiques cinètiques pròximes a les dels enzims CPT1A. Mostra una elevada afinitat per la carnitina (K_m :197 μ M) i una baixa sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA (IC_{50} : 906nM), lluny dels valors descrits per la CPT1B humana (K_m carnitina: 666 μ M; IC_{50} per malonil-CoA: 69nM). Pel que fa a la seva mobilitat electroforètica, la proteïna CPT1B de porc, amb un pes molecular predit de 88KDa, migra, segons un pes aparent de 82KDa, una mica més ràpid, fins i tot, que la proteïna CPT1B humana.

Aquestes característiques de les CPT1 de porc podrien explicar, en part, els seus nivells de β -oxidació hepàtica, poc eficient per ser fàcilment inhibible per malonil-CoA, i muscular, molt efectiva per la poca sensibilitat de la CPT1B al malonil-CoA.

Independentment del sentit fisiològic d'aquestes característiques especials del enzim CPT1 del porc, el que sí és cert és que aquesta condició de diferència els converteixen en un bon model d'estudi de les relacions estructura-funció de les CPT1.

Pig Muscle Carnitine Palmitoyltransferase I (CPTI β), with Low K_m for Carnitine and Low Sensitivity to Malonyl-CoA Inhibition, Has Kinetic Characteristics Similar to Those of the Rat Liver (CPTI α) Enzyme[†]

Joana Relat,[‡] Carine Nicot,[‡] Mar Gacias,[‡] Gebre Woldegiorgis,[§] Pedro F. Marrero,^{*,‡} and Diego Haro[‡]

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain, and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, Oregon 97006-8921

Received June 3, 2004; Revised Manuscript Received July 22, 2004

ABSTRACT: The outer mitochondrial membrane enzyme carnitine palmitoyltransferase I (CPTI) catalyzes the initial and regulatory step in the β -oxidation of long-chain fatty acids. There are two well-characterized isoforms of CPTI: CPTI α (also known as L-CPTI) and CPTI β (also known as M-CPTI) that in human and rat encode for enzymes with very different kinetic properties and sensitivity to malonyl-CoA inhibition. Kinetic hallmarks of the CPTI α are high affinity for carnitine and low sensitivity to malonyl-CoA inhibition, while the opposite characteristics, low affinity for carnitine and high sensitivity to malonyl-CoA, are intrinsic to the CPTI β isoform. We have isolated the pig CPTI β cDNA which encodes for a protein of 772 amino acids that shares extensive sequence identity with human (88%), rat (85%), and mouse (86%) CPTI β , while the degree of homology with the CPTI α from human (61%), rat (62%), and mouse (60%) is much lower. However, when expressed in the yeast *Pichia pastoris*, pig CPTI β shows kinetic characteristics similar to those of the CPTI α isoform. Thus, the pig CPTI β , unlike the corresponding human or rat enzyme, has a high affinity for carnitine ($K_m = 197 \mu\text{M}$) and low sensitivity to malonyl-CoA inhibition ($\text{IC}_{50} = 906 \text{ nM}$). Therefore, the recombinant pig CPTI β has unique kinetic characteristics, which makes it a useful model to study the structure–function relationship of the CPTI enzymes.

Short- and medium-chain fatty acids freely diffuse from the cytosol to the mitochondrial matrix. However, the mitochondrial inner membrane is impermeable to long-chain acyl-CoAs. Translocation of long-chain acyl-CoAs across the mitochondrial membrane requires a specific transport system, referred to as the carnitine palmitoyltransferase (CPT) shuttle system, composed of three enzymes, namely, CPTI,¹ carnitine/acylcarnitine translocase, and CPTII. CPTI catalyzes the initial step of this process by converting long-chain acyl-CoAs into acylcarnitine esters in the presence of L-carnitine. Acylcarnitine esters are transported across the inner mitochondrial membrane in exchange for carnitine by the carnitine/acylcarnitine translocase. Finally, CPTII catalyzes the transfer of the acyl group from acylcarnitine to CoA and regenerates the long-chain acyl-CoAs, thus providing sub-

strate for β -oxidation. Because CPTI catalyzes the first rate-limiting step in fatty acid oxidation, it is tightly regulated by its physiological inhibitor, malonyl-CoA (*1*).

CPTI is encoded by at least three structural genes referred to as CPTI α , CPTI β , and CPTI-C. The expression of CPTI-C seems to be restricted to the central nervous system, and to date, expression of the cDNA for CPTI-C in yeast has resulted in no enzyme activity (*2*). While CPTI α is widely expressed in most tissues, CPTI β is only expressed in muscle, adipose tissue, heart, and testis (*1*). Studies performed with cDNAs isolated from a variety of mammals (*3–9*) have shown that both enzymes differ markedly in their kinetic characteristics, namely, the K_m for carnitine and the sensitivity to malonyl-CoA inhibition. CPTI α exhibits a low K_m for carnitine and decreased sensitivity to malonyl-CoA inhibition (higher IC_{50}), while CPTI β exhibits a high K_m for carnitine and increased sensitivity to inhibition by malonyl-CoA (lower IC_{50}). Splice variation in the coding region of the CPTI β gene was proposed to play a major role in the expression of CPTI enzymes with altered malonyl-CoA sensitivity, but the involvement of splice variation in the modulation of malonyl-CoA sensitivity of CPTI β has now been ruled out (*10*). However, the cloning of pig CPTI α (*11, 12*) clearly provided evidence that not all CPTI α have a high IC_{50} for malonyl-CoA inhibition, because pig CPTI α was found to be extremely sensitive to malonyl-CoA inhibition (IC_{50} 141 nM) when compared with rat CPTI α (IC_{50} 1900 nM). The high malonyl-CoA sensitivity observed could be due to the low

[†] This project was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2001-2923, Programa Nacional de Biomedicina), from the FIS of the Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros RCMN from the Ministerio de Sanidad (C03/08), and from the Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya (2001SGR 00432) and by NIH Grant HL52571 (to G.W.).

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 34-93-403 45 00. Fax: 34-93-402 45 20. E-mail: pedromarrero@ub.edu.

[‡] University of Barcelona.

[§] Oregon Graduate Institute of Science and Technology.

¹ Abbreviations: EST, expressed sequence tags; CPTI, carnitine palmitoyltransferase I; CPTII, carnitine palmitoyltransferase II; L-CPTI, liver isoform of CPTI (CPTI α); M-CPTI, heart/skeletal muscle isoform of CPTI (CPTI β); ORF, open reading frame; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RT-PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction.

malonyl-CoA levels in this tissue as a result of low rates of hepatic lipogenesis (13).

There is very little information about porcine CPTI β . We previously showed using heterologous probes that CPTI β is expressed in muscle and heart of pig (11). Studies performed with mitochondria isolated from pig muscle showed that, in this tissue, CPTI activity has an affinity for carnitine intermediate between that of rat CPTI α and human CPTI β described to date (14) and that this activity is not very sensitive to malonyl-CoA inhibition (15). Hence, we decided to clone the pig CPTI β and determine its kinetic characteristics to get a better understanding of the structure–function relationships of the CPTI enzymes and of the peculiar porcine lipid metabolism.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Amplification of a Pig CPTI β cDNA Probe by RT-PCR. Total muscle RNA obtained from 2-week-old pigs was used as a template in a reverse transcriptase reaction performed with M-MuLV polymerase and with 0.1 μ g of random hexamers. A cDNA fragment, from nucleotide +21 to +726 (using adenine of the start codon as nucleotide +1), of pig CPTI β was then amplified by PCR from the RT reaction products by using two degenerated primers: OCD1 (5'-GCNGTNGCNTTYCAGTTTAC) and OCD2 (5'-AGGTAGAYRTAYTCYCCACCAGTC). These primers were kindly provided by Dr. Feike R. Van Der Leij (Department of Pediatrics, University of Groningen, The Netherlands) and were previously useful to amplify ovine CPTI (9). The PCR product was cloned in the pGEM-T vector (Promega), and the resulting plasmid was sequenced. BLAST analysis showed that this cDNA shares extensive identity with human (83%) or rat (84%) CPTI β , while the degree of identity with human (55%) or rat (53%) CPTI α is much lower. In addition, subsequent database search showed this sequence to have 99.8% identity with a yet unpublished clone (gi: 27414164) characterized as pig M-CPTI. This sequence was used as a probe in the northern blot analysis and also for primer design in the PCR cloning of the ORF of pig CPTI β .

Northern Blotting. Total RNA was isolated from testis and heart of piglets from different ages and subjected to northern blot analysis as previously described (16). The membranes were probed with random-primed [³²P]dCTP-labeled CPTI α (11) or CPTI β probes. A 596 bp fragment of the human β -actin probe (E00829) was obtained from CaCo-2 cell line RNA by using the primers actin-F (5'-ACCAACTGGGACGACATGGAC) and actin-R (5'-TCGTGGATGCCACAGGACTCC). Transcript size was determined using 0.28–6.58 kb of RNA marker (Promega).

cDNA Extension by SMART RACE (Clontech). This technique was used according to the manufacturer's instructions to amplify the 3' end of pig CPTI- β using the forward primer PMCPTI-F701 [5'-CAAGTCATGGTGGGCGACTAACTATGTG (+676 to +701)] and poly(A) mRNA from pig muscle (2 μ g) as template. The PCR product (1743 bp) was cloned in the vector pGEM-T (Promega) and sequenced. The generated plasmid, p3PMCPTI β GEMT, contains the pig CPTI β cDNA from position +676 to +2419.

Pig CPTI β cDNA Cloning. PMCPTI-F1 (5'-CTGACTAAACCCAGGATG, a "guess-mer" forward primer corresponding to coordinates -15 to +3) and PMCPTI-R1 (5'-

GTATTCCTCGTCATCCAG, a reverse primer corresponding to coordinates +604 to +586) were used to amplify a 619 bp fragment of the pig CPTI β 5'cDNA. The RT-PCR product sequence was used to design the forward primer PMCPTI-F6 needed in the cloning strategy. Then the 5' end of the cDNA was amplified by RT-PCR using the primers PMCPTI-F6 [5'-CAAATTGAATTCATGGCGGAAGCGCAC-CAG (+1/+18)] and PMCPTI-R7 [5'-GCTGTCTGTGAG-GTGGTG (+1000/+979)]. The primer PMCPTI-F6 introduces an *Eco*RI restriction site (italicized and bolded in the primer sequence) just before the ATG start codon. This PCR product was digested with *Eco*RI and *Bam*HI (which cuts the pig MCPTI cDNA at position +950) and cloned into BSSK+, forming p5PMCPTI/BSSK+.

The RACE 3' product was excised from p3PMCPTIGEMT by digestion with *Sac*I and *Aat*II (present in the pGEM-T polylinker), and the ends were filled in with Klenow DNA polymerase and cloned into *Eco*RV-cut BSSK+. The insert was released by digestion with *Bam*HI and ligated into *Bam*HI-cut 5PMCPTI/BSSK+, resulting in the plasmid pPMCPTI/BSSK+. This plasmid contains the pig CPTI β cDNA sequence from position +1 to +2419. This plasmid was further manipulated to remove most of the 3' UTR sequence of pig CPTI β cDNA. pPMCPTI/BSSK+ was used as a template in a PCR reaction with Pigfw [5'-CGTGAAAGCAGACCTGCAAG (+1872 to +1892)] and Pigrv [ACTGGAATTCGCCCTTAGCTGTCAGCTTTGGGAAC (+2323 to +2298)] to generate a 925 bp product, in which an *Eco*RI site (bolded in the Pigrv primer sequence) was introduced downstream of the stop codon (underlined in the Pigrv sequence). The PCR product was subcloned in the vector p-GEM-T and sequenced. The plasmid was digested with *Not*I and *Bgl*II, generating a 444 bp product, and subcloned in *Not*I–*Bgl*II-cut PMCPTI/BSSK, yielding pPMCPTISTOP/BSSK+, which contains the ORF of the pig CPTI β (from +1 to +2323) flanked by two *Eco*RI sites.

Construction of Plasmids for CPT Expression in *Pichia pastoris*. The ORF of pig CPTI β cDNA was cloned into the unique *Eco*RI site, located 3' of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter (*GAPp*), in the pHW010 plasmid (8, 17), to produce the expression plasmid pPMCPTI- β /pHW010. This construct was linearized in the *GAP* gene promoter by digestion with *Avr*II and integrated into the *GAPp* locus of *P. pastoris* GS115 by electroporation (18). Histidine prototrophic transformants were selected on YND plates and grown on YND medium. Mitochondria were isolated by disrupting the yeast cells with glass beads as previously described (8, 19). Previously reported expression plasmids [pig CPTI α (11), human CPTI β (4), and rat CPTI α (8)] were processed in a similar way to obtain a mitochondrial preparation expressing the respective recombinant enzyme.

CPT Assay. CPT activity was assayed by the forward exchange method using L-[³H]carnitine as previously described (8). In a total volume of 0.5 mL, the standard enzyme assay mixture contained 0.2 mM L-[³H]carnitine (~5000 dpm/nmol), 80 μ M palmitoyl-CoA, 20 mM HEPES (pH 7.0), 1% fatty acid-free albumin, and 40–75 mM KCl, with or without malonyl-CoA as indicated. Reactions were initiated by addition of isolated intact yeast mitochondria. The reaction was linear up to 4 min, and all incubations were done at 30 °C for 3 min. Reactions were stopped by addition of 6%

perchloric acid and were then centrifuged at 2000 rpm for 7 min. The resulting pellet was suspended in water, and the product [^3H]palmitoylcarnitine was extracted with butanol at low pH. After centrifugation at 2000 rpm for 2 min, an aliquot of the butanol phase was transferred to a vial for radioactive counting.

K_m for Carnitine and Palmitoyl-CoA. The K_m for carnitine was obtained by assaying mitochondria in the presence of increasing carnitine concentrations: 50–1500 μM for pig CPTI β , 50–2000 μM for human CPTI β , and 25–1000 μM for CPTI α isotype assays. Determination of the K_m for palmitoyl-CoA was performed at fixed carnitine concentration (0.2 and 1 mM for CPTI α and CPTI β isotypes, respectively) by varying the palmitoyl-CoA concentration from 0 to 500 μM . The fatty acid-free albumin concentration was increased proportionally to the palmitoyl-CoA concentration to maintain a fixed molar ratio of palmitoyl-CoA:albumin of 6.1:1 as previously described (18).

IC_{50} for Malonyl-CoA. The IC_{50} value was determined by assaying mitochondria in the presence of increasing concentrations of malonyl-CoA (from 0 to 50 μM for rat CPTI α or pig CPTI β and from 0 to 15 μM for human CPTI β or pig CPTI α). The activity (in percent) was plotted against the malonyl-CoA concentration, with 100% representing the CPT activity in the absence of malonyl-CoA. Data were fitted to exponential decay curves (linear scale) or to competition curves (logarithmic scale) for IC_{50} calculation.

Western Blot Analysis. Proteins were separated by SDS-PAGE in a 7.5% gel and transferred onto nitrocellulose membranes as previously described (8). A 1:2000 dilution of the anti-pig CPTI α antibody previously obtained in our laboratory (11) was used. This antibody also recognizes other CPT proteins (11, 12). Proteins were detected using the ECL chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech). Western blot analysis in urea gels was performed by adding 9 M urea in the SDS-PAGE gel.

DNA Sequencing. DNA sequencing was performed using the Big Dye kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

Pig CPTI β Cloning. The cDNA for pig M-CPTI was obtained by PCR-derived methods (RT-PCR and SMART RACE). Since PCR products and not isolated clones were sequenced, the risk of taking into account any mutation introduced by the PCR was negligible. Moreover, several overlapping PCR products were independently generated and sequenced to select those in which the sequence was coincident with the PCR products.

This approach allowed determination of the sequence of full-length pig CPTI β (GenBank accession number AY642381). Database search showed this sequence to have 99.8% identity with a GenBank reported clone (AY181062) characterized as pig M-CPTI. The pig CPTI β cDNA encodes a protein of 772 amino acids with a predicted molecular mass of 88.2 kDa. The predicted amino acid sequence shares extensive sequence identity with human (88%), rat (85%), and mouse (86%) CPTI β , while the degree of identity with human (61%), rat (62%), pig (61%), and mouse (60%) CPTI α is much lower. The hydropathy plot of pig CPTI β (TMpred program) predicted that pig CPTI β retains a folding

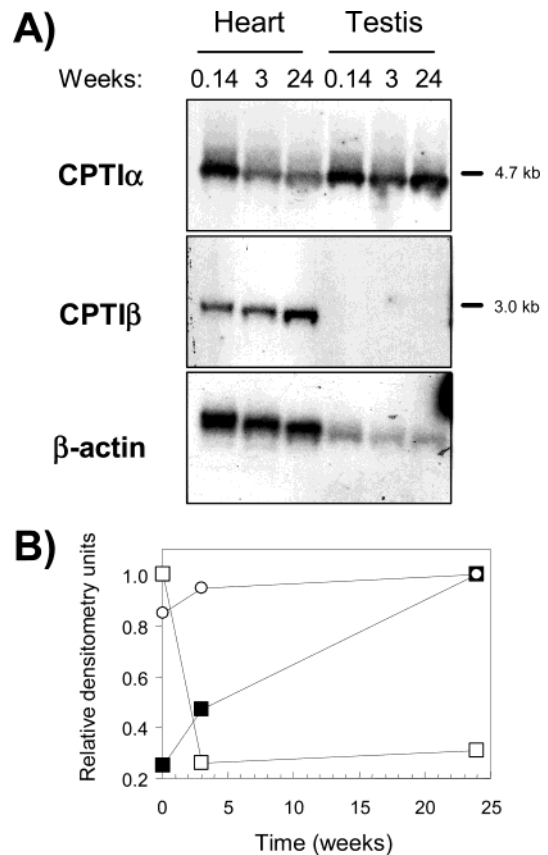


FIGURE 1: Liver and muscle CPTI expression pattern in pig heart and testis during development. (A) Northern blot showing tissue-specific expression of pig liver (CPTI α) and muscle (CPTI β). Total RNA samples obtained from 0.14-, 3-, or 24 week-old pigs were analyzed for CPTI α and CPTI β mRNA abundance. Equal loading of the sample in each lane was confirmed by use of the human β -actin probe. (B) mRNA levels were determined by densitometer scanning of the blot and normalized against β -actin (the highest mRNA level of each gene was normalized to a value of 1.0). Key: open squares, CPTI α expression in heart; closed squares, CPTI β expression in heart; open circles, CPTI β expression in testis.

pattern within the outer mitochondrial membrane similar to that previously described for CPTI proteins (data not shown).

Pig CPTI β Expression Pattern. We previously showed that, in 3-week-old piglets, CPTI β is expressed in muscle and heart but not in kidney, duodenum, and testis (11). Figure 1 shows the expression pattern of CPTI α and CPTI β in heart and testis during development. In heart, the expression of both isotypes follows a pattern observed with other mammals (20), since CPTI α expression was high at birth and decreased during development, while the CPTI β isotype followed the inverse pattern. This has been interpreted in terms of differences in affinity for the substrate by the enzymes, thus correlating with the low carnitine levels at birth in this tissue. However, this interpretation is not applicable for the pig model since CPTI β has a low K_m for carnitine (197 μM), similar to that of the rat (100 μM) and pig (126 μM) CPTI α (see below). Figure 1 also shows that, irrespective of the age of the animal, the liver isotype but not the muscle isotype is expressed in pig testis.

Recombinant Pig CPTI β Expression. Pig CPTI β was expressed using the yeast *P. pastoris*, since other CPT proteins have been successfully expressed in this system (4, 8, 9, 11). Figure 2 shows a western blot analysis of different recombinant CPTI enzymes using a pig CPTI α antibody.

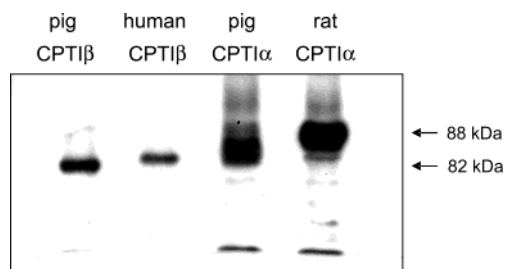


FIGURE 2: Mobility of CPTI proteins. Immunoblot showing the expression and migration patterns of yeast-expressed CPTI proteins. Mitochondria isolated from the yeast strain expressing the CPTI constructs were separated on a 7.5% SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane. Approximately 10 μ g of protein was applied in each lane, and the immunoblot was developed using pig L-CPTI-specific antibodies.

Pig CPTI β migrates as an 82-kDa protein while its predicted molecular mass is 88.2 kDa. The same phenomenon is observed for human CPTI β and pig CPTI α , while rat CPTI α migrates as expected from its predicted molecular weight. Since human CPTI β and pig CPTI α are both highly sensitive to malonyl-CoA inhibition (4, 11), we previously correlated the unexpected higher mobility of pig CPTI α with the high sensitivity to malonyl-CoA inhibition (11). However, this correlation is not observed for the CPTI β , because the enzyme with the higher mobility shows a lower sensitivity to malonyl-CoA inhibition (see below). Since *in vitro* transcribed and translated proteins retain the same anomalous fast migration pattern, this anomalous migration pattern cannot be due to posttranslational modifications (11). However, proteins run on gel containing 9 M urea migrate in the same fashion (data not shown), which strongly suggests that the anomalous migration pattern is not due to incomplete protein denaturation.

Pig CPTI β Kinetic Characteristics. No CPT activity was found in the control yeast strain with the empty vector. Isolated mitochondria from the pig CPTI β expression strain had a high level of malonyl-CoA-sensitive CPT activity [2.17 \pm 0.4 nmol min⁻¹ (mg of protein)⁻¹]. Yeast-expressed pig CPTI β exhibited normal saturation kinetics with respect to its two substrates, palmitoyl-CoA and carnitine, as shown in Figure 3A,B. The K_m for palmitoyl-CoA was 82.58 \pm 15.28 μ M. The K_m for carnitine was 197.58 \pm 42.46 μ M. Thus, pig CPTI β has unique kinetic characteristics, since it has the very lowest affinity for palmitoyl-CoA of any characterized CPTI and the highest affinity for carnitine of all reported β isotypes (4, 9, 21). With regard to malonyl-CoA inhibition, recombinant pig CPTI β exhibited a low sensitivity to malonyl-CoA, with an IC₅₀ of 906.33 \pm 135.02 nM (Figure 3C). Thus, the kinetic characteristics of the pig CPTI β with respect to carnitine and malonyl-CoA are very similar to those of the rat CPTI α isotype (see Figure 4A,B).

DISCUSSION

In pig, a very low rate of long-chain fatty acid oxidation has been reported in liver (22), while an effective β -oxidation process has been observed in muscle (15). The main control point of the fatty acid oxidation flux has been postulated to be the CPTI enzyme and its inhibition by malonyl-CoA, a physiological substrate produced mainly but not exclusively in lipogenic tissues (1). Altered malonyl-CoA sensitivity, presented by the different pig CPTI isotypes, agrees with

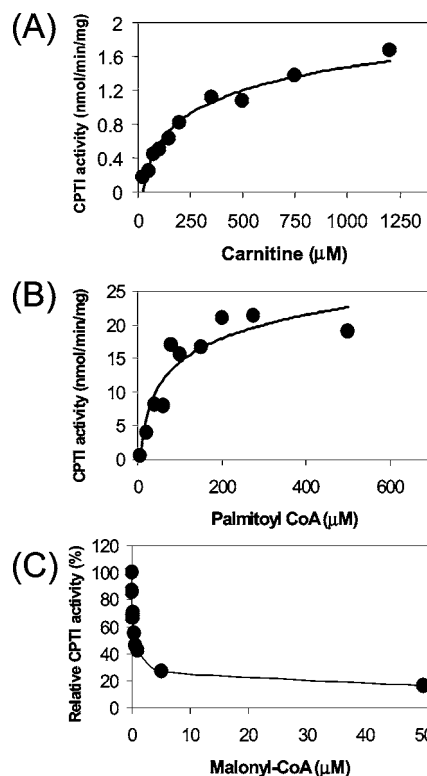


FIGURE 3: Kinetic analysis of pig M-CPTI. Mitochondria obtained from the yeast strain expressing pig M-CPTI were assayed for CPTI activity in the presence of increasing concentrations of carnitine (A), palmitoyl-CoA (B), and malonyl-CoA (C). Assays were done with 100 μ g of mitochondrial protein as described in the Experimental Procedures section. Results are an average of three separate experiments with at least two independent mitochondrial preparations.

this model of long-chain fatty acid oxidation regulation by malonyl-CoA. Thus, in pig liver, CPTI α is inhibited at low malonyl-CoA levels (11), and consequently, the fatty acid oxidation rate is slowed. On the contrary, pig muscle CPTI β is less sensitive to malonyl-CoA inhibition, and consequently, the fatty acid oxidation rate is high (see Figure 4A). Therefore, species-specific variations in malonyl-CoA sensitivity of CPTI enzymes are in agreement with the rate of fatty acid oxidation observed in the whole animal.

When expressed in *P. pastoris*, recombinant CPTI shows kinetic characteristics similar to those observed in different tissues from different species (3–7, 11, 12). Figure 4A shows that the pig CPTI β reported here has a low sensitivity to malonyl-CoA inhibition (IC₅₀ of 906 nM) when compared with the human CPTI β (IC₅₀ of 69 nM). Figure 4A also shows that this decreased sensitivity to malonyl-CoA inhibition is characteristic of the liver isotypes of the enzyme (i.e., rat CPTI α has an IC₅₀ of 1900 nM). The high IC₅₀ obtained here agrees with previous data reported for pig muscle mitochondria and could explain the effective β -oxidation process observed in muscle (15). However, the substrate K_m obtained here are unique. Thus, pig CPTI β has a lower affinity for palmitoyl-CoA (K_m of 82.58 μ M) than recombinant human (K_m of 43 μ M) or rat (K_m of 57 μ M) CPTI β isotypes (4, 21), while the carnitine K_m of pig CPTI β (197 μ M) that was obtained is lower than previously reported (14) and closer to the K_m of the α isotypes (ranging between 100 and 126 μ M) rather than the β isotype (ranging between 666 and 800 μ M; see Figure 4B).

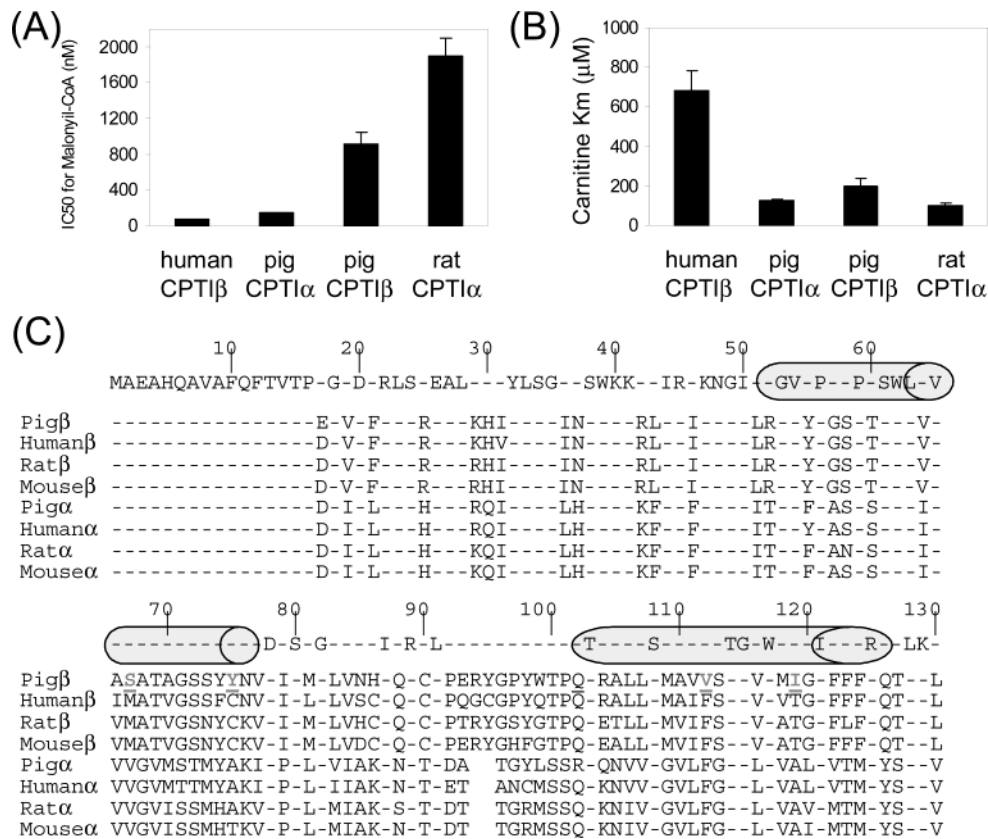


FIGURE 4: Kinetic characteristics and N-terminal alignment of different CPTI isotypes. (A) IC₅₀ for malonyl-CoA inhibition of the different isotypes of CPTI. (B) K_m for carnitine for the same isotypes of CPTI. (C) Alignment of the N-terminal and the transmembrane domain sequences of the enzymes studied. In the top of the alignment are depicted the residues shared among all CPTI isotypes; nonidentical residues are only depicted in the respective sequences. Underlined are the four characteristic residues of pig CPTIβ (Ser⁶⁷, Tyr⁷⁵, Val¹¹¹, and Ile¹¹⁹). The two transmembrane domains, TM1 and TM2, are also indicated.

Diet-induced changes in carnitine K_m have been reported in pig liver CPTI, but the CPTIβ isotype expressed in muscle is not sensitive to these types of changes (14). Nevertheless, the low carnitine K_m observed with the recombinant enzymes agrees with recent data in which carnitine supplementation does not accelerate the kinetics of triacylglycerol utilization by colostrum-deprived newborn pigs (23). In addition, this result suggests that the recombinant pig CPTIβ isotype is a muscle isotype with kinetics characteristics of the rat liver isotype, i.e., low K_m for carnitine and high IC₅₀ (low malonyl-CoA sensitivity). The residues responsible for the unique α isotype kinetic characteristics of the pig CPTIβ probably reside in the N-terminus of the enzyme.

N-Terminal deletion experiments (18, 24–26), site-directed mutagenesis (27–29), and analysis of natural or recombinant chimeras (12, 21) have been important in revealing the role of the N-terminus in the kinetic behavior of the CPTI enzymes. Thus, it is generally agreed that the N-terminus of the CPTI enzymes plays an important role in determining the kinetic characteristics of the enzymes such as the IC₅₀ for malonyl-CoA inhibition or the K_m for the substrate. Interestingly, the N-terminus of the enzymes is highly conserved between different CPTI isotypes that show different kinetic parameters, which indicates that the interaction between the cytosolic N- and C-terminal regions of the enzyme is an important determinant of the overall kinetics of both CPTIα and CPTIβ isotypes (12, 27).

In accordance with its role in malonyl-CoA sensitivity, the N-terminus of the CPTIα enzyme can be divided into

two different domains that constitute the positive (residues 1–18) and negative (residues 19–30) determinants of malonyl-CoA sensitivity of the enzyme (24, 26). Site-directed mutagenesis studies of the second domain suggest that Ser²⁴ and Gln³⁰ may be responsible for the effect on malonyl-CoA sensitivity (lower IC₅₀) (29). All CPTIβ isotypes have Ser²⁴ but have His³⁰ instead of Gln³⁰ (see Figure 4C). In addition, this second domain (negative determinant) appears to be absent in the CPTIβ isotype (26), which can be correlated with the high malonyl-CoA sensitivity observed with this isotype until now (4). Therefore, it could be hypothesized that the absence of the negative malonyl-CoA determinant in CPTIβ gives rise to an enzyme more sensitive to malonyl-CoA inhibition. Interestingly, our studies with the pig CPTIβ demonstrate that the enzyme has low sensitivity to malonyl-CoA inhibition when compared with the rat or human CPTIβ enzymes but still has higher sequence homology to CPTIβ (His³⁰) than CPTIα (Gln³⁰) isotypes (Figure 4A,C). Studies to determine the presence of a putative negative determinant in the N-terminal of pig CPTIβ are currently being carried out in our laboratory.

The sequence alignment shown in Figure 4C may also shed light into our understanding of the kinetic parameters such as the K_m for carnitine of CPTI. Previous studies suggest that the interaction between the two putative transmembrane domains of CPTI enzymes (TM1 and TM2) is important in determining the K_m for carnitine (18, 21). The behavior of pig CPTIβ, with a low K_m for carnitine, narrows down the putative amino acids involved in this kinetic parameter to a

few residues, since its transmembrane domains are more similar to CPTI β (with high K_m for carnitine) than CPTI α (with low K_m for carnitine) isotypes.

In summary, the cloning and kinetic characterization of pig CPTI β reported here show that it has kinetic properties similar to those of rat CPTI α (8) rather than the CPTI β enzyme from human heart (4). Therefore, the pig CPTI β sequence may be useful in our understanding of the kinetic behavior of different CPTI isotypes.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Feike R. Van Der Leij (Department of Pediatrics, University of Groningen, The Netherlands) for kindly supplying the ODC1 and ODC2 primers.

REFERENCES

- McGarry, J. D., and Brown, N. F. (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis, *Eur. J. Biochem.* 244, 1–14.
- Price, N., van der Leij, F., Jackson, V., Corstorphine, C., Thomson, R., Sorensen, A., and Zammit, V. (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I, *Genomics* 80, 433–442.
- Brown, N. F., Esser, V., Foster, D. W., and McGarry, J. D. (1994) Expression of a cDNA for rat liver carnitine palmitoyltransferase I in yeast establishes that catalytic activity and malonyl-CoA sensitivity reside in a single polypeptide, *J. Biol. Chem.* 269, 26438–26442.
- Zhu, H., Shi, J., de Vries, Y., Arvidson, D. N., Cregg, J. M., and Woldegiorgis, G. (1997) Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I, *Arch. Biochem. Biophys.* 347, 53–61.
- Zhu, H., Shi, J., Cregg, J. M., and Woldegiorgis, G. (1997) Reconstitution of highly expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 498–502.
- Swanson, S. T., Foster, D. W., McGarry, J. D., and Brown, N. F. (1998) Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues, *Biochem. J.* 335, 513–519.
- Esser, V., Britton, C. H., Weis, B. C., Foster, D. W., and McGarry, J. D. (1993) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function, *J. Biol. Chem.* 268, 5817–5822.
- de Vries, Y., Arvidson, D. N., Waterham, H. R., Cregg, J. M., and Woldegiorgis, G. (1997) Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*, *Biochemistry* 36, 5285–5292.
- Price, N. T., Jackson, V. N., van der Leij, F. R., Cameron, J. M., Travers, M. T., Bartelds, B., Huijkman, N. C., and Zammit, V. A. (2003) Cloning and expression of the liver and muscle isoforms of ovine carnitine palmitoyltransferase I: residues within the N-terminus of the muscle isoform influence the kinetic properties of the enzyme, *Biochem. J.* 372, 871–879.
- van der Leij, F. R., Cox, K. B., Jackson, V. N., Huijkman, N. C., Bartelds, B., Kuipers, J. R., Dijkhuizen, T., Terpstra, P., Wood, P. A., Zammit, V. A., and Price, N. T. (2002) Structural and functional genomics of the CPT1B gene for muscle-type carnitine palmitoyltransferase I in mammals, *J. Biol. Chem.* 277, 26994–27005.
- Nicot, C., Hegardt, F. G., Woldegiorgis, G., Haro, D., and Marrero, P. F. (2001) Pig liver carnitine palmitoyltransferase I, with low K_m for carnitine and high sensitivity to malonyl-CoA inhibition, is a natural chimera of rat liver and muscle enzymes, *Biochemistry* 40, 2260–2266.
- Nicot, C., Relat, J., Woldegiorgis, G., Haro, D., and Marrero, P. F. (2002) Pig liver carnitine palmitoyltransferase. Chimera studies show that both the N- and C-terminal regions of the enzyme are important for the unusual high malonyl-CoA sensitivity, *J. Biol. Chem.* 277, 10044–10049.
- Gondret, F., Ferre, P., and Dugail, I. (2001) ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species, *J. Lipid Res.* 42, 106–113.
- Heo, K., Lin, X., Odle, J., and Han, I. K. (2000) Kinetics of carnitine palmitoyltransferase-I are altered by dietary variables and suggest a metabolic need for supplemental carnitine in young pigs, *J. Nutr.* 130, 2467–2470.
- Schmidt, I., and Herpin, P. (1998) Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) activity and its regulation by malonyl-CoA are modulated by age and cold exposure in skeletal muscle mitochondria from newborn pigs, *J. Nutr.* 128, 886–893.
- Adams, S. H., Alho, C. S., Asins, G., Hegardt, F. G., and Marrero, P. F. (1997) Gene expression of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in a poorly ketogenic mammal: effect of starvation during the neonatal period of the piglet, *Biochem. J.* 324, 65–73.
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., and Cregg, J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, *Gene* 186, 37–44.
- Shi, J., Zhu, H., Arvidson, D. N., and Woldegiorgis, G. (2000) The first 28 N-terminal amino acid residues of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I are essential for malonyl CoA sensitivity and high-affinity binding, *Biochemistry* 39, 712–717.
- Dai, J., Zhu, H., Shi, J., and Woldegiorgis, G. (2000) Identification by mutagenesis of conserved arginine and tryptophan residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I important for catalytic activity, *J. Biol. Chem.* 275, 22020–22024.
- Brown, N. F., Weis, B. C., Husti, J. E., Foster, D. W., and McGarry, J. D. (1995) Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart, *J. Biol. Chem.* 270, 8952–8959.
- Jackson, V. N., Cameron, J. M., Fraser, F., Zammit, V. A., and Price, N. T. (2000) Use of six chimeric proteins to investigate the role of intramolecular interactions in determining the kinetics of carnitine palmitoyltransferase I isoforms, *J. Biol. Chem.* 275, 19560–19566.
- Duee, P. H., Pegorier, J. P., Quant, P. A., Herbin, C., Kohl, C., and Girard, J. (1994) Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity, *Biochem. J.* 298, 207–212.
- Heo, K. N., Lin, X., Han, I. K., and Odle, J. (2002) Medium-chain fatty acids but not L-carnitine accelerate the kinetics of [14C]-triacylglycerol utilization by colostrum-deprived newborn pigs, *J. Nutr.* 132, 1989–1994.
- Shi, J., Zhu, H., Arvidson, D. N., Cregg, J. M., and Woldegiorgis, G. (1998) Deletion of the conserved first 18 N-terminal amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA sensitivity and binding, *Biochemistry* 37, 11033–11038.
- Woldegiorgis, G., Shi, J., Zhu, H., and Arvidson, D. N. (2000) Functional characterization of mammalian mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*, *J. Nutr.* 130, 310S–314S.
- Jackson, V. N., Zammit, V. A., and Price, N. T. (2000) Identification of positive and negative determinants of malonyl-CoA sensitivity and carnitine affinity within the amino termini of rat liver- and muscle-type carnitine palmitoyltransferase I, *J. Biol. Chem.* 275, 38410–38416.
- Shi, J., Zhu, H., Arvidson, D. N., and Woldegiorgis, G. (1999) A single amino acid change (substitution of glutamate 3 with alanine) in the N-terminal region of rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA inhibition and high affinity binding, *J. Biol. Chem.* 274, 9421–9426.
- Zhu, H., Shi, J., Treber, M., Dai, J., Arvidson, D. N., and Woldegiorgis, G. (2003) Substitution of glutamate-3, valine-19, leucine-23, and serine-24 with alanine in the N-terminal region of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl CoA inhibition and binding, *Arch Biochem Biophys.* 413, 67–74.
- Jackson, V. N., Price, N. T., and Zammit, V. A. (2001) Specificity of the interactions between Glu-3, Ser-24, and Gln-30 within the N-terminal segment of rat liver mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase (L-CPT I) in determining the malonyl-CoA sensitivity of the enzyme, *Biochemistry* 40, 14629–14634.

**3.- C75 ACTIVA ELS COMPONENTS SENSIBLES I INSENSIBLES A MALONIL-CoA DEL SISTEMA CPT
(ARTICLE-4-)**

Biochemical and Biophysical Research Communications 325 (2004) 660–664

**C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components
of the CPT system**

Carine Nicot^a, Laura Napal^{a,1}, Joana Relat^{a,1}, Silvia González^b, Amadeu Llebaria^b, Gebre Woldegiorgis^c, Pedro F. Marrero^{a,*}, Diego Haro^a

a Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

b RUBAM (Research Unit on BioActive Molecules), Department of Biological Organic Chemistry, IIQAB-CSIC, E-08034 Barcelona, Spain

c Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR 97006-8921, USA

Received 11 October 2004 Available online 5 November 2004

RESUM

El sistema carnitina palmitoiltransferasa està integrat per tres proteïnes: carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT) i carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2), i finament regulat a través del malonil-CoA, que inhibeix de manera reversible l'enzim CPT1.

Els nivells de malonil-CoA intracel·lular són controlats fisiològicament, s'incrementen en situacions d'ingesta i disminueixen amb el dejú, reprimint o activant el catabolisme lipídic, respectivament. Alguns tractaments farmacològics, com el C75, també impliquen variacions en la concentració intracel·lular de malonil-CoA.

RESULTATS

El C75 és un inhibidor de la sintasa d'àcids grassos (FAS) que, com a tal, provoca un increment de malonil-CoA intracel·lular, però que, paradoxalment, lluny d'inhibir la β -oxidació activa el sistema CPT.

L'objectiu d'aquest treball va ser identificar la diana exacta del C75 en el sistema CPT. Es van expressar els enzims CPT1A, CPT1B i CPT2 en el sistema heteròleg de *Pichia pastoris* i es va analitzar el comportament de cada una d'aquestes proteïnes recombinants davant el tractament amb C75, mesurant l'activitat de l'enzim. L'estudi es va complementar amb l'anàlisi de les activitats CPT1 i CPT2 a cèl·lules de mamífer en cultiu (CHO i Cos-7) tractades amb C75 o vehicle (DMSO).

Els resultats d'aquests experiments indiquen que el C75 actua directament sobre el sistema CPT activant, de manera similar, CPT1A, CPT1B i CPT2. I, apunten a què aquesta inhibició és independent de malonil-CoA.



C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system

Carine Nicot^a, Laura Napal^{a,1}, Joana Relat^{a,1}, Silvia González^b, Amadeu Llebaria^b, Gebre Woldegiorgis^c, Pedro F. Marrero^{a,*}, Diego Haro^a

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

^b RUBAM (Research Unit on BioActive Molecules), Department of Biological Organic Chemistry, IIQAB-CSIC, E-08034 Barcelona, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR 97006-8921, USA

Received 11 October 2004

Available online 5 November 2004

Abstract

Carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I) and II (CPT-II) enzymes are components of the carnitine palmitoyltransferase shuttle system which allows entry of long-chain fatty acids into the mitochondrial matrix for subsequent oxidation. This system is tightly regulated by malonyl-CoA levels since this metabolite is a strong reversible inhibitor of the CPT-I enzyme. There are two distinct CPT-I isotypes (CPT-I α and CPT-I β), that exhibit different sensitivity to malonyl-CoA inhibition. Because of its ability to inhibit fatty acid synthase, C75 is able to increase malonyl-CoA intracellular levels. Paradoxically it also activates long-chain fatty acid oxidation. To identify the exact target of C75 within the CPT system, we expressed individually the different components of the system in the yeast *Pichia pastoris*. We show here that C75 acts on recombinant CPT-I α , but also on the other CPT-I isotype (CPT-I β) and the malonyl-CoA insensitive component of the CPT system, CPT-II.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: C75; Malonyl-CoA; CPT system; Fatty acid oxidation

C75 was initially synthesized as a chemically stable inhibitor of mammalian fatty acid synthase (FAS) [1]. FAS catalyzes long-chain fatty acid synthesis through the condensation of acetyl-CoA and malonyl-CoA. Malonyl-CoA is a potent inhibitor of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I), a component of the CPT system, which controls the entry of long-chain fatty acids into the mitochondria [2]. Thus, it could be expected that FAS inhibition would increase malonyl-CoA levels that in turn would down-regulate fatty acid β -oxidation through CPT-I inhibition. However, it has been shown that C75 increases fatty acid oxidation in diet induced obesity [3].

C75 exerts its actions through several mechanisms. In the hypothalamus, C75 causes suppression of food intake by preventing fasting-induced up-regulation of the orexigenic neuropeptides NPY and AgRP, and down-regulation of the anorexigenic neuropeptides POMC and CART [4–6]. In the peripheral tissues C75 acts on two key steps of lipid metabolism: FAS and CPT. As a result of FAS inhibition, lipid synthesis is down-regulated and malonyl-CoA level increases. However, in vitro studies using primary rat hepatocytes and cell line models showed that C75-mediated increase of malonyl-CoA concentration does not cause inhibition of fatty acid oxidation as predicted but on the contrary revealed that C75 is able to activate the CPT system in the presence of inhibitory concentrations of malonyl-CoA [3]. Altogether, these mechanisms of action are responsible for the loss of appetite, the reduction of

* Corresponding author. Fax: +34934024520.

E-mail address: pedromarrero@ub.edu (P.F. Marrero).

¹ These two authors contributed equally to this work.

adipose mass [4], and fatty liver [5] observed after C75 treatment.

The CPT system is involved in the translocation of long chain acyl-CoA across the mitochondria membrane and is composed of three enzymes: CPT-I, carnitine/acylcarnitine translocase, and CPT-II. The CPT-I activity catalyzes the initial step of the process by converting the acyl-CoA into acylcarnitine esters in the presence of L-carnitine. The carnitine/acylcarnitine translocase promotes the transit of acylcarnitine esters across the mitochondrial inner membrane and, finally, the CPT-II enzyme regenerates the long-chain acyl-CoA from the acylcarnitine esters, hence providing substrates for β -oxidation. Because CPT-I catalyzes the first rate-limiting step in the carnitine shuttle system and because of its tight regulation by its physiological inhibitor malonyl-CoA, it is considered the most critical step in controlling fatty acid flux through the β -oxidation pathway [2]. However, at the transcriptional level CPT-I is not the sole enzyme regulated since it has been showed that CPT-II is regulated by starvation [7] and peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) [8].

Two main isotypes of CPT-I exist: CPT-I α and CPT-I β . CPT-I α is highly expressed in liver and in a wide variety of tissues. CPT-I β is only expressed in muscle, adipose tissue, heart, and testis. Both enzymes differ markedly in their kinetic characteristics, namely the K_m for carnitine and the sensitivity to malonyl-CoA inhibition. CPT-I α shows a lower K_m for carnitine and a low sensitivity to malonyl-CoA inhibition (higher IC_{50}), while CPT-I β has a high K_m for carnitine and a higher sensitivity to malonyl-CoA (lower IC_{50}) [2]. These kinetic characteristics are preserved by the recombinant enzymes when expressed in *Pichia pastoris* [9–11]. The differences between both isotypes are not universally conserved since it has been recently showed that porcine CPT-I isotypes behave as natural chimera of CPT-I isotypes: pig CPT-I α has a high affinity for carnitine but also high sensitivity to malonyl-CoA inhibition [12,13] while pig CPT-I β has a low affinity for carnitine and a low sensitivity to malonyl-CoA inhibition [14].

Thupari et al. [3] concluded that C75 stimulates CPT-I activity. However, considering the experimental approach used, the action of C75 on the malonyl-CoA insensitive component of the CPT system cannot be discarded, since under the assay conditions both CPT-I and CPT-II catalyze the same reaction, the formation of palmitoylcarnitine from carnitine and palmitoyl-CoA [11,15].

Moreover, Thupari et al. [3] worked with different cellular systems—primary hepatocytes, NCF-7 human breast cells cancer line, and with mouse 3T3-L1 adipocytes—that all express the α isotype of CPT-I (mouse 3T3-L1 adipocytes, unlike other adipocytes, express the α isotype [16]). Hence, they could not investigate the effects of C75 on CPT-I β , the isotype expressed in

adipose tissue, one of the tissues of major interest with regard to β -oxidation.

To distinguish between CPT-I and CPT-II activities, and also to study the β isotype, we expressed individually the different CPT enzymes in the yeast *P. pastoris*, devoid of endogenous CPT activity, and analyzed the effect of C75. This study was complemented with experimental setups in mammalian cell lines that allowed distinction between CPT-I and CPT-II activities.

Materials and methods

Construction of plasmids for CPT expression in *P. pastoris*. All expression plasmids used for the expression of rat CPT-I α [11], pig CPT-I α [12], human CPT-I β [9], and CPT-II [11] were constructed in a similar way in which an *EcoRI* site was introduced immediately upstream of the ATG start codon to enable cloning into the unique *EcoRI* site located 3' of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter (*GAPp*) in pHW010 plasmid [11,17]. The constructs were linearized in the *GAPp* gene promoter by digestion with *AvrII* and integrated into the *GAPp* locus of *P. pastoris* GS115 by electroporation [18]. Histidine prototrophic transformants were selected on YND plates and grown on YND medium. Mitochondria were isolated by disrupting the yeast cells with glass beads as previously described [11,19].

Carnitine palmitoyltransferase assay in *P. pastoris* mitochondria. CPT activity was assayed by the forward exchange method using L-[3 H]carnitine as previously described [11]. In a total volume of 0.5 mL, the standard enzyme assay mixture contained 0.2 mM (for pig CPT-I α , rat CPT-I α , and rat CPT-II) or 1 mM (for human CPT-I β) of L-[3 H]carnitine (\sim 5000 dpm/nmol) 80 μ M palmitoyl-CoA, 20 mM Hepes (pH 7.0), 1% fatty acid-free albumin, and 40–75 mM KCl, with or without 10 μ M malonyl-CoA and/or 200 μ M C75 (Alexis Biochemicals) as indicated. Reactions were initiated by addition of 0.1 mg of isolated intact yeast mitochondria. The reaction was linear up to 4 min, and all incubations were done at 30 °C for 3 min. with or without malonyl-CoA and/or C75, as indicated. Reactions were stopped by addition of 6% perchloric acid and were then centrifuged at 2000 rpm for 7 min. The resulting pellet was suspended in water, and the product [3 H]palmitoylcarnitine was extracted with butanol at low pH. After centrifugation at 2000 rpm for 2 min, an aliquot of the butanol phase was transferred to a vial for radioactive counting.

Carnitine palmitoyltransferase assay in mammalian cell lines. Cells were grown to confluence and collected in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were collected by centrifugation, resuspended in buffer A (KCl 150 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7.2), and broken with 10 cycles of glass homogenizer (tight-fitting pestle). Mitochondria were collected by centrifugation (16,000g, 5 min at 4 °C) and resuspended in buffer A. At this step mitochondria could either be used for total CPT activity assay or processed for CPT-II activity determination by freezing and thawing, and then incubated for 30 min at 4 °C in the presence of 1% octylglucoside. This treatment inhibits CPT-I activity [20] and hence, once the membrane debris are removed by centrifugation (16,000g, 2 min at 4 °C) allows direct measurement of CPT-II activity.

For both total CPT and CPT-II assays, 100 μ g of protein was used for the enzymatic assay. The CPT assay was performed using the same protocol as for *P. pastoris* mitochondria. To ensure that the CPT-II assay worked correctly an alternative protocol was developed: before harvest, cells were treated for 2 h with etomoxir or vehicle (DMSO) in order to irreversibly inhibit CPT-I activity. Cells were then collected and processed as for total CPT or CPTII assay. Etomoxir inhibition of CPT-I activity gave the same results as those measured by octylglucoside treatment of mitochondrial preparations, which validated the assay (results not shown).

Results and discussion

To study the effect of C75 on the CPT system, recombinant rat CPT-I α and human CPT-I β were expressed in *P. pastoris*. As shown in Figs. 1A and B, C75 activates rat CPT-I α (23.18%) and human CPT-I β (33.02%) recombinant enzymes. The stimulatory effect of C75 is maintained when the CPT-I activity is measured in the presence of 10 μ M malonyl-CoA: rat CPT-I α is activated 23.35% and human CPT-I β 44.44%. We also

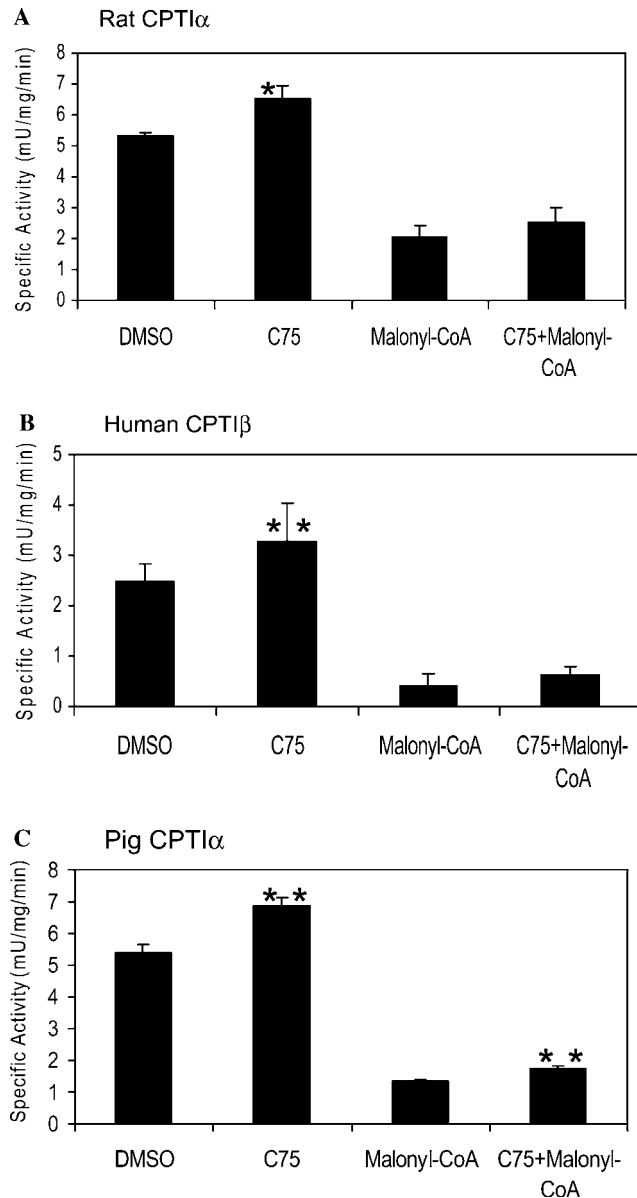


Fig. 1. C75 activates recombinant CPT-I α and CPT-I β . *P. pastoris* were transformed with the plasmids encoding for the rat CPT-I α (A), human CPT-I β (B), or pig CPT-I α (C). Mitochondria isolated from these strains were assayed for CPT activity in the presence of DMSO (vehicle), 200 μ M C75, or 10 μ M malonyl-CoA, as described in under Materials and methods. Results are an average of at least three separate experiments with at least two independent mitochondrial preparations. * $p < 0.005$, ** $p < 0.05$.

expressed pig CPT-I α , since this enzyme is a natural chimera which has a K_m for carnitine characteristic of the α isotype but a sensitivity to malonyl-CoA inhibition characteristic of the β isotype [12]. Fig. 1C shows that C75 activates pig CPT-I α in the absence (23.88%) or in the presence of malonyl-CoA 10 μ M (28.88%).

The increase in the activity of CPT-I α by C75, even in the presence of inhibitory concentration of malonyl-CoA, has been used as an argument to explain the C75 paradox, in which this compound is able to simultaneously stimulate fatty acid β -oxidation and malonyl-CoA accumulation [3]. However, the total activity of CPT-I, in the presence of C75 and malonyl-CoA, still remains lower than the activity in the absence of malonyl-CoA (Fig. 1), questioning such explanation in physiologic conditions.

C75 stimulation of CPT-I activity was lower than that reported in primary culture cells [3], and appears unrelated with the different sensibility to malonyl-CoA of the recombinant enzymes. Therefore, we studied the effect of C75 on CPT-II activity. Fig. 2A shows that C75 stimulates recombinant CPT-II activity (30.73%)

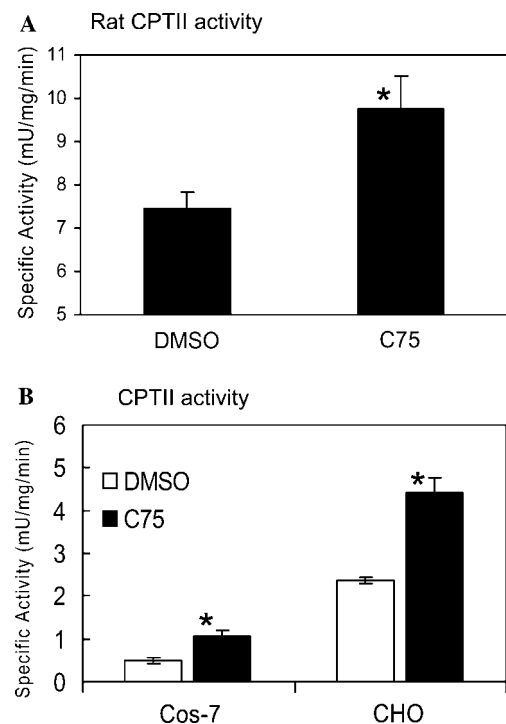


Fig. 2. C75 activates CPT-II. (A) *P. pastoris* were transformed with the plasmid encoding for the rat CPT-II. Mitochondria isolated from these strains were assayed for CPT activity in the presence of DMSO (vehicle) or 200 μ M of C75, as described under Materials and methods. Results are an average of three separate experiments with at least two independent mitochondrial preparations. (B) Cos-7 or CHO mitochondria were treated with octylglucoside to inactivated CPT-I, as described under Materials and methods. Mitochondria were subsequently assayed for CPTII activity in the presence of DMSO (vehicle) or 200 μ M C75. Results are an average of at least three separate experiments with at least two independent mitochondrial preparations. * $p < 0.005$.

in a similar way as the CPT-I activity. To confirm this result we determined the C75 effect on endogenous CPT-II activity from CHO and Cos-7 cell lines. Since CPT-II or CPT-I in vitro determinations are based in the same assay [11,15], we took advantage of octylglucoside, a detergent that promotes specific inactivation of the CPT-I activity [20], to exclusively assay CPT-II activity. Fig. 2B shows that C75 stimulates the activity of CPT-II enzyme in CHO (90.29%) and Cos-7 (123.91%) cell lines.

Altogether, these results indicate that C75 acts directly on the CPT shuttle system, since C75 activation extends to different isotypes of CPT-I and to the CPT-II enzyme. Therefore, this result could explain the activation of the fatty acid oxidation by C75 in different tissues, independently of the CPT-I isotype expressed.

CPTII deficiency is among the most common inborn errors of mitochondrial fatty acid β -oxidation. Recently, in CPT-II-deficient cultured human skin fibroblasts, it has been observed that up-regulation of CPTII expression mediated by bezafibrate improves fatty acid oxidation rate [21]. These data are consistent with the presence of a PPRE in the 5'-flanking region of the human CPTII gene [8] and therefore validate the CPTII as a potential pharmacological target. We show now that CPTII gene can also be regulated at the post-transcriptional level by C75.

Acknowledgments

This project was supported by Grants: SAF2001-2923 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Programa Nacional de Biomedicina), from the FIS of the Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros RCMN from the Ministerio de Sanidad (C03/08), and from the Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya 2001SGR 00432. During elaboration of the manuscript we observed an electronic report from Yang et al. in J. Pharmacol. Exp. Ther. online in which the authors described a similar effect of C75 on recombinant CPTI β , and that C75-mediated activation mechanism does not involve an antagonism of malonyl-CoA binding. Therefore, the data of this electronic report support the observation described in this paper.

References

- [1] F.P. Kuhajda, E.S. Pizer, J.N. Li, N.S. Mani, G.L. Frehywot, C.A. Townsend, Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 3450–3454.
- [2] J.D. McGarry, N.F. Brown, The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis, Eur. J. Biochem. 244 (1997) 1–14.
- [3] J.N. Thupari, L.E. Landree, G.V. Ronnett, F.P. Kuhajda, C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 9498–9502.
- [4] M.V. Kumar, T. Shimokawa, T.R. Nagy, M.D. Lane, Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 1921–1925.
- [5] T.M. Loftus, D.E. Jaworsky, G.L. Frehywot, C.A. Townsend, G.V. Ronnett, M.D. Lane, F.P. Kuhajda, Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors, Science 288 (2000) 2379–2381.
- [6] T. Shimokawa, M.V. Kumar, M.D. Lane, Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 66–71.
- [7] E. Sekoguchi, N. Sato, A. Yasui, S. Fukada, Y. Nimura, H. Aburatani, K. Ikeda, A. Matsuura, A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting, J. Biol. Chem. 278 (2003) 38796–38802.
- [8] M.J. Barrero, N. Camarero, P.F. Marrero, D. Haro, Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element, Biochem. J. 369 (2003) 721–729.
- [9] H. Zhu, J. Shi, Y. de Vries, D.N. Arvidson, J.M. Cregg, G. Woldegiorgis, Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I, Arch. Biochem. Biophys. 347 (1997) 53–61.
- [10] H. Zhu, J. Shi, J.M. Cregg, G. Woldegiorgis, Reconstitution of highly expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I, Biochem. Biophys. Res. Commun. 239 (1997) 498–502.
- [11] Y. de Vries, D.N. Arvidson, H.R. Waterham, J.M. Cregg, G. Woldegiorgis, Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*, Biochemistry 36 (1997) 5285–5292.
- [12] C. Nicot, F.G. Hegardt, G. Woldegiorgis, D. Haro, P.F. Marrero, Pig liver carnitine palmitoyltransferase I, with low K_m for carnitine and high sensitivity to malonyl-CoA inhibition, is a natural chimera of rat liver and muscle enzymes, Biochemistry 40 (2001) 2260–2266.
- [13] C. Nicot, J. Relat, G. Woldegiorgis, D. Haro, P.F. Marrero, Pig liver carnitine palmitoyltransferase. Chimera studies show that both the N- and C-terminal regions of the enzyme are important for the unusual high malonyl-CoA sensitivity, J. Biol. Chem. 277 (2002) 10044–10049.
- [14] J. Relat, C. Nicot, M. Gacias, G. Woldegiorgis, P.F. Marrero, D. Haro, Pig muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPTI β), with low K_m for carnitine and low sensitivity to malonyl-CoA inhibition, has kinetic characteristics similar to those of the rat liver (CPTI α) enzyme, Biochemistry 43 (2004) 12686–12691.
- [15] K.F. Woeltje, V. Esser, B.C. Weis, A. Sen, W.F. Cox, M.J. McPhaul, C.A. Slaughter, D.W. Foster, J.D. McGarry, Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase II, J. Biol. Chem. 265 (1990) 10720–107255.
- [16] N.F. Brown, J.K. Hill, V. Esser, J.L. Kirkland, B.E. Corkey, D.W. Foster, J.D. McGarry, Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes, Biochem. J. 327 (1997) 225–231.
- [17] H.R. Waterham, M.E. Digan, P.J. Koutz, S.V. Lair, J.M. Cregg, Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, Gene 186 (1997) 37–44.

- [18] J. Shi, H. Zhu, D.N. Arvidson, G. Woldegiorgis, The first 28 N-terminal aminoacid residues of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I are essential for malonyl-CoA sensitivity and high-affinity binding, *Biochemistry* 39 (1999) 712–717.
- [19] J. Dai J, H. Zhu, J. Shi, G. Woldegiorgis, Identification by mutagenesis of conserved arginine and tryptophan residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I important for catalytic activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 22020–22024.
- [20] K.F. Woeltje, M. Kuwajima, D.W. Foster, J.D. McGarry, Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. II. Use of detergents and antibodies, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9822–9827.
- [21] F. Djouadi, J.P. Bonnefont, L. Thuillier, V. Droin, N. Khadom, A. Munnich, J. Bastin, Correction of fatty acid oxidation in carnitine palmitoyl transferase 2-deficient cultured skin fibroblasts by bezafibrate, *Pediatr. Res.* 54 (2003) 446–451.

DISCUSSIÓ

L'estudi del metabolisme implica: la identificació de les vies enzimàtiques, la caracterització funcional d'aquestes i el descobriment dels mecanismes de regulació als quals estan associades. Durant molt de temps, el control alostèric, lligat a la disponibilitat de substrat, ha constituït el principal sistema de control de les rutes metabòliques. El descobriment de l'operó galactosa en bacteris, que va revelar que els organismes poden adaptar la seva activitat metabòlica als canvis ambientals, modificant el nivell d'expressió d'enzims específics, va lligar l'activitat enzimàtica a la regulació transcripcional.

Actualment, es considera que, en els organismes complexos, són tres els mecanismes de regulació metabòlica: (I) el control alostèric, que comporta la unió d'un activador o inhibidor enzimàtic que sovint és substrat de l'enzim (II) les modificacions post-traduccionals, fosforilació, glicosilació, sumoïlació i acetilació, que poden activar o inhibir l'activitat enzimàtica o afectar l'estabilitat de la proteïna i (III) la regulació transcripcional, que afecta els nivells d'expressió gènica i implica senyals específics que són transduïts al nucli.

CONTROL TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *CPT1B*

Els organismes eucariotes presenten un estricte control de l'expressió gènica. Grups de gens concrets s'expressen, per exemple, en teixits específics, en moments determinats del desenvolupament o davant estímuls ambientals puntuals. El funcionament d'aquests mecanismes de regulació depèn: de la interacció i cooperació entre factors de transcripció i proteïnes co-reguladores en les regions promotores, del perfil proteic present en cada població cel·lular i en cada moment i de les pròpies seqüències promotores.

1.- INTERACCIÓ FUNCIONAL ENTRE PPAR α I MEF-2C EN L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *CPT1B* HUMÀ

La interacció entre factors de transcripció que s'uneixen a diferents seqüències d'un mateix promotor pot portar a efectes sinèrgics en l'activació transcripcional. En aquest treball, hem demostrat l'activació sinèrgica per l'heterodímer de receptors nuclears PPAR α /RXR α i el factor de transcripció miogènic MEF-2C del promotor humà del gen *CPT1B*.

Estudis previs havien descrit que el gen humà de la *CPT1B* és diana dels PPARs i s'havia localitzat un element de resposta a aquests receptors nuclears (PPRE) corrent amunt del primer exó (Mascaró et al., 1998; Brandt et al., 1998). Paral·lelament, també s'havia descrit, corrent amunt de l'exó 1A, un element de resposta a factors de transcripció de la família MEF-2 (Moore et al., 2001). La proximitat entre les dues seqüències reguladores en el context del promotor humà del gen *CPT1B* i la resposta del gen a l'heterodímer PPAR α /RXR α en cèl·lules musculars, molt superior a l'observada en cèl·lules no musculars, ens van fer plantejar l'estudi de la relació entre aquest efecte de PPAR α /RXR α i el factor miogènic MEF-2C.

Els resultats del treball mostren que PPAR α i MEF-2c interaccionen per activar de manera sinèrgica l'expressió del gen *CPT1B*. La mutació, en aquest promotor, de l'element de resposta a MEF-2 afecta dramàticament a la seva resposta a PPAR α /RXR α tant en cèl·lules musculars C2C12 com en cèl·lules no musculars CV-1, on juntament amb PPAR α /RXR α es va co-transfectar MEF-2C. L'alteració de la disposició espacial dels dos elements de resposta en el promotor, també afecta a la resposta d'aquest a PPAR α /RXR α . El fet que posteriorment haguem descrit una interacció física entre PPAR α i MEF-2C ha vingut a confirmar aquesta dades d'interacció funcional.

La identitat de la proteïna MEF-2 que s'uneix a la seqüència MEF-2 del promotor humà del gen *CPT1B* en el múscul esquelètic no pot ser del tot establerta. Fins al moment, quatre proteïnes MEF-2 han estat identificades: MEF-2A, MEF-2B, MEF-2C i MEF-2D. En cultius cel·lulars de múscul esquelètic s'ha vist que MEF-2D s'expressa en mioblasts proliferants, MEF2A apareix en iniciar-se la diferenciació i MEF-2C es troba en les etapes finals de la diferenciació (Black et al., 1998). Aquests patrons d'expressió, els resultats previs que indiquen que MEF-2A i MEF-2C són capaços d'unir-se a l'element MEF-2 del promotor estudiat (Moore et al., 2001) i la interacció descrita entre MEF-2C i PPAR α fan suposar que és aquesta proteïna MEF-2C la responsable de l'activació transcripcional de *CPT1B* i de la resposta sinèrgica amb l'heterodímer de receptors nuclears.

PGC-1 és un co-activador de PPAR α (Barger et al., 2001) i de MEF-2C, amb qui és capaç de controlar l'expressió muscular de GLUT4 (Michael et al., 2001). S'ha demostrat que PGC-1 i MEF-2A activen el promotor de la *CPT1B* de manera sinèrgica i que aquesta inducció pot ser reprimida per la interacció directa entre PGC-1 i els factors USF (Moore et al., 2003). Els resultats exposats apunten la possibilitat d'una interacció entre PPAR α , MEF-2C i PGC-1 formant un

complex ternari. Aquesta situació crearia una única superfície de contacte amb la maquinària de la transcripció, més eficient que la de qualsevol dels factors de transcripció descrits per ell mateix. La localització de les regions d'aquestes proteïnes implicades en les interaccions proteïna-proteïna ens permetria resoldre aquest interrogant. Alternativament, la unió a DNA de PPAR α o MEF-2C, o la interacció entre dos dels tres factors proposats, podria alterar l'estructura cromàtica facilitant l'acció del següent. En aquest sentit, s'ha demostrat que el context dels promotors afecta, a través d'E-boxs, a l'activació transcripcional per MyoD, indicant que proteïnes pròximes poden reclutar diferents factors al promotor o influenciar en la conformació d'aquest o del complex E-box/proteïna (Huang et al., 1996).

Pel que fa a les propietats transactivadores de MEF-2C, nombrosos estudis han buscat el seu paper en la regulació gènica de cèl·lules musculars. S'han descrit interaccions de MEF-2C amb altres factors de transcripció miogènics, com MyoD o miogenina (Gosset et al., 1989; Kaushal et al., 1994), i de proteïnes miogèniques amb membres de la superfamília de receptors nuclears. S'ha demostrat una interacció entre MEF-2A i el receptor de TR capaç d'activar sinèrgicament l'expressió gènica de la α -MHC cardíaca (Lee et al., 1997) i una cooperació funcional entre MyoD, MEF-2 i TR α 1 és suficient per induir la transcripció de GLUT4 (Santalucia et al., 2001). També s'ha demostrat la interacció entre MyoD i RAR α (Froeschle et al., 1998) i s'ha proposat una interacció funcional entre MyoD i PPAR (Solanes et al., 2003).

Co-activadors com CBP/p300 (Sartorelli et al., 1997) o GRIP-1 (*Glucocorticoid receptor interacting protein-1*) (Chen et al., 2000), que funcionen com a cofactors de molts receptors nuclears, s'ha vist que interaccionen amb MyoD i MEF-2. A part de la interacció entre PPAR α i MEF-2C demostrada, interaccions entre PPAR o RXR i MyoD són probables.

L'especial distribució dels elements de resposta a MyoD, MEF-2C i PPAR que trobem en el promotor humà de la CPT1B es troba molt conservada en altres espècies (Baldán et al., 2001; Van der Leij et al., 2002), indicant, possiblement, la importància de la participació conjunta de l'heterodímer PPAR/RXR i dels factors miogènics en la regulació transcripcional d'aquest gen.

2.- L'ELEMENT G/C DEL PROMOTOR DE LA CPT1B ÉS IMPORTANT EN L'ACTIVITAT BASAL DEL GEN I EN LA RESPOSTA A PPAR α PERÒ NO EN LA DE PPAR δ

2.1.- EFECTE DE PPAR δ SOBRE EL PROMOTOR DE LA CPT1B

Els primers estudis que vinculen PPAR δ a l'oxidació d'àcids grassos estan realitzats sobre cèl·lules musculars en cultiu. En ells, l'activació de PPAR δ indueix l'expressió de UCP-1 i UCP-3 i en menor proporció la de CPT1 (Dressel et al., 2003; Holst et al., 2003; Cheng et al., 2004b). Segons sembla, PPAR δ estaria implicat en mecanismes de dissipació d'energia i en la utilització d'àcids grassos de cadena llarga, solapant, aparentment, part de les seves funcions amb les de PPAR α .

En el nostre cas, l'estudi comparatiu de l'efecte de PPAR α i PPAR δ sobre el promotor humà de la CPT1B indica una dependència de lligant en l'activació transcripcional del gen per aquests receptors nuclears. Alhora, els resultats mostren una relació clara entre els nivells de proteïna PPAR α i la capacitat transactivadora d'aquest factor sobre la CPT1B. Si PPAR α i PPAR δ eren transfectats a la cèl·lula, juntament amb una construcció reportera del promotor de la CPT1B, l'efecte de PPAR α era superior al de PPAR δ , tant en cèl·lules C2C12 diferenciades com en cèl·lules C2C12 no diferenciades. En canvi, si es transfectava la construcció reportera sola i es tractaven les cèl·lules amb lligants de PPAR α (GW-7647) o de PPAR δ (L-165.041), el major efecte l'obteníem amb el lligant de PPAR δ . Aquests resultats correlacionen amb els nivells d'expressió descrits per aquests factors de transcripció en múscul esquelètic, on PPAR δ és l'isotip majoritari (Braissant et al., 1996; Braissant et al., 1998).

Amb aquests experiments també vam observar que l'efecte de PPAR α , però no el de PPAR δ , depenia de l'estat de diferenciació de les cèl·lules C2C12. En les cèl·lules C2C12 diferenciades es perd una gran part de la capacitat transactivadora de PPAR α , aproximant-se els nivells als de PPAR δ . Els resultats semblen indicar que existeixen proteïnes a les cèl·lules C2C12 diferenciades capaces de reprimir part de l'efecte de PPAR α sobre el promotor de la CPT1B, o que existeixen proteïnes a les cèl·lules C2C12 no diferenciades capaces de co-activar amb PPAR α , però no amb PPAR δ .

PPAR δ ha estat descrit com un factor repressor de la transactivació depenent de lligant de PPAR α i PPAR γ , per la seva capacitat de desplaçar els altres dos isotips de les seqüències reguladores del DNA i d'interaccionar amb co-repressors com SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*), SHARP (*SMRT i Histone deacetylase-associated repressor protein*), NcoR o histones desacetilases (HDAC) (Shi et al., 2002). S'ha vist que és l'únic isotip que funciona com un repressor transcripcional en sistemes GAL-4 i davant un PPRE i la seva capacitat transrepressora depèn de la unió al seu element de resposta. D'acord amb els resultats obtinguts, PPAR δ podria mantenir, en situació basal, el gen de la CPT1B reprimat. Aquesta situació canviaria en presència de lligant (L-165.041), que desplaçaria els co-repressors i permetria la unió de co-activadors, o en presència d'un excés de PPAR α (PPAR α transfectat), que desplaçaria PPAR δ de l'element de resposta. En qualsevol de les dues situacions, es donaria l'activació transcripcional del gen. Segons aquesta hipòtesi, la relació entre els nivells proteics de PPAR α i PPAR δ seria un punt de control addicional a l'expressió de gens i de retruc en el control del metabolisme i de la despesa energètica.

2.2.- L'ELEMENT G/C DEL PROMOTOR DE LA CPT1B. EFECTE SOBRE L'ACTIVITAT BASAL DEL PROMOTOR I SOBRE LA RESPOSTA A PPAR α I PPAR δ

L'anàlisi informàtica per la rutina dels TF-SEARCH del promotor humà de la CPT1B va indicar una regió rica en G/C (coordenades [-561/-540] respecte a l'inici de traducció), que es va identificar com un possible element de resposta a factors de transcripció de la família Sp. Es tracta d'un element G/C capaç d'unir, *in vitro*, els factors de transcripció Sp1, Sp3 i Egr-1 i fonamental per l'activitat basal del promotor de la CPT1B.

El gen *CPT1B* és un gen mancat de caixa TATA. Segons les dades publicades són variats els gens que, sense l'element TATA, veuen dirigida la seva expressió a través d'elements G/C (Hirvonen et al., 2002; Rudge et al., 2002), fet que explicaria la importància de la caixa GC en l'activitat basal del gen. La presència de l'element G/C i del PPRE, la E-Box i l'element MEF-2 corrent amunt del promotor 1B/M del gen *CPT1B* humà apunta a localitzar l'inici de la transcripció a partir d'aquest promotor, que, de fet, és l'únic de moment descrit com a funcional (dades no publicades, Yu et al., 1998b).

Es van realitzar experiments de transfeccions transitòries amb la construcció reportera pCPTluc, en presència i absència dels vectors d'expressió de PPAR α , PPAR δ , RXR α i DNSp1.

DNSp1 és un plasmidi que codifica per un dominant negatiu de Sp1, capaç d'unir-se al DNA, però incapaç de transactivar. Els resultats obtinguts amb el DNSp1 indiquen que la no-funcionalitat de l'element G/C en el promotor de la CPT1B anul·la l'activació transcripcional per PPAR α , però no afecta la inducció per PPAR δ . La transactivació de PPAR α , a diferència de la de PPAR δ , sobre el promotor humà de la CPT1B depèn, en part, de la proteïna Sp1. L'activitat basal del promotor queia dràsticament en presència del dominant negatiu de Sp1.

Segons dades publicades, els nivells de Sp1 en cèl·lules C2C12 cauen durant el procés de diferenciació, fent-se indetectables a partir del 6è dia (De león et al., 2005). Sp1 podria ser la proteïna responsable de la diferent activació per PPAR α del promotor humà de la CPT1B que s'observa entre cèl·lules C2C12 diferenciades, que no expressarien Sp1, i cèl·lules C2C12 no diferenciades, que expressarien Sp1.

Diferents experiments de *Western Blot* amb extractes nuclears de cèl·lules C2C12 diferenciades i no diferenciades ens van indicar que els nivells de proteïna Sp1, en el nostre cas, no variaven amb la diferenciació. Altres proteïnes han d'estar implicades en aquest fenomen de transactivació diferencial. Entre les que podrien estar afectant l'activació per PPAR α podríem considerar: PGC-1, RIP-140, Egr-1, que també s'uneix a l'element G/C descrit en el promotor de la CPT1B i en reprimeix l'expressió, o GRIP-1 i USF, a través de MEF-2C.

2.3.- INTERACCIÓ DIFERENCIAL ENTRE Sp1 I PPAR α I PPAR δ

A partir dels resultats obtinguts amb el dominant negatiu de Sp1 que indicaven una interacció funcional entre Sp1 i PPAR α , ens vam plantejar estudiar si existia una interacció física entre aquests dos factors. Els experiments de *GST-pull-down* que es van realitzar van mostrar una diferent interacció de PPAR α i PPAR δ amb Sp1 que correlacionava perfectament amb els resultats de les transfeccions transitòries. En el cas de PPAR α , s'observava una interacció clara i específica, que no apareixia en fer l'assaig amb PPAR δ . Aquestes diferències podrien ser importants en situacions determinades on la manca, o inactivitat, de Sp1 pogués afectar l'expressió de CPT1B i on PPAR δ podria mantenir els nivells basals de transcripció del gen. En situacions com la hipòxia, on el factor de repressió Egr-1 es troba induït, Sp1 podria ser desplaçat del promotor de la CPT1B (els elements d'unió a Egr-1 i a Sp1 en el promotor humà de CPT1B es troben solapats) i ser PPAR δ el que mantingués uns nivells mínims d'expressió.

Dels experiments de GST-*pull-down* també podem dir que la interacció PPAR α -Sp1 depèn de l'estat de diferenciació de les cèl·lules. En els experiments amb extractes nuclears de C2C12 diferenciades no es detecta la interacció PPAR α -Sp1, que sí que es detecta amb extractes nuclears de cèl·lules C2C12 no diferenciades, tot i que els nivells de proteïna Sp1 van resultar ser els mateixos. Altre cop pren força la idea de que el perfil proteic de les cèl·lules C2C12 és important per l'activació transcripcional per PPAR α de la CPT1B. Alguna proteïna, present en les cèl·lules C2C12 no diferenciades i no en les diferenciades, afavoreix la interacció PPAR α -Sp1 o alguna proteïna, present en les cèl·lules C2C12 diferenciades i no en les no diferenciades, dificulta la interacció.

Podria tractar-se simplement de canvis en els nivells de Sp3. Sp3 podria estar reprimint l'activació del gen interaccionant amb PPAR α i desplaçant a Sp1 de l'element G/C. Segons està descrit, els nivells de proteïna Sp3 també cauen durant la diferenciació (De león et al., 2005).

Un altre factor de transcripció que podria estar implicat en aquest mecanisme seria COUP-TF. Es tracta d'un receptor nuclear orfe que s'uneix al DNA a través de diferents DR, entre ells DR-1 i que per tant és capaç de desplaçar l'heterodímer PPAR α /RXR α del seu element de resposta. S'ha descrit que interacciona amb Sp1 (Rohr et al., 1997) i per tant podria, no afectant l'activitat basal del promotor, reprimir la transactivació de PPAR α .

Modificacions post-traduccionals de Sp1 també podrien ser responsables de la diferent interacció d'aquest factor de transcripció amb PPAR α que s'observa entre cèl·lules musculars no diferenciades i diferenciades. Això explicaria perquè, encara que els nivells detectats en el nostre cas siguin independents de l'estat de diferenciació de les cèl·lules, l'efecte de Sp1 sobre PPAR α sigui diferent.

3.- MICROINJECCIÓ D'OÒCITS DE *Xenopus laevis*

La microinjecció d'oòcits de *Xenopus laevis* ens ha permès demostrar que els efectes sinèrgics observats entre l'heterodímer PPAR α /RXR α i els factors miogènics MyoD i MEF-2C en experiments de transfecció transitòria en cèl·lules C2C12 es mantenen en una situació on el DNA reporter introduït i per tant el promotor estudiat s'estructuren com un DNA eucariota. Aquests experiments ens han obert les portes a noves tècniques de treball que ens poden

permetre estudiar l'efecte d'aquestes activacions transcripcionals sobre la cromatina i sobre la disposició nucleosomal.

REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA CPT

La CPT1 és el principal punt de control de la β -oxidació mitocondrial i com a tal està sotmesa a una estricta regulació transcripcional i alostèrica. El coneixement de les seves característiques cinètiques, de la posició dels seus dominis catalític i regulador i de les relacions estructura-funció de la seva seqüència polipeptídica són importants en l'elucidació dels mecanismes que regulen el metabolisme lipídic

En iniciar aquest treball hi havia publicades les característiques cinètiques de CPT1A i CPT1B de diferents espècies. En la majoria de casos, l'isotip A (hepàtic) mostra una sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA menor que l'isotip B (muscular) ($IC_{50} \approx 1900 \text{ nM}$ vs $IC_{50} \approx 69 \text{ nM}$) i una afinitat per la carnitina superior ($K_m \approx 100 \mu\text{M}$ vs $K_m \approx 666 \mu\text{M}$), no existint diferències significatives en l'afinitat pel substrat acil-CoA (palmitoil-CoA). L'excepció a aquesta situació la va plantejar la CPT1A de porc.

1.- CPT1A DE PORC. RELACIONS ESTRUCTURA-FUNCIÓ

El clonatge del cDNA de l'isotip hepàtic de porc (PCPT1A), la seva expressió en el sistema heteròleg de *Pichia pastoris* i la seva caracterització cinètica van descriure aquest enzim com una quimera natural dels isotips A i B. Malgrat la gran similitud entre les seqüències aminoàcides de la CPT1A de porc i les dels seus homòlegs de rata i humà (85.9% i 89.2% respectivament), aquest enzim presenta una afinitat per la carnitina alta ($K_m = 126 \mu\text{M}$, típica dels isotips A) i una sensibilitat al malonil-CoA alta ($IC_{50} = 141 \text{ nM}$, típica dels isotips B). La K_m per palmitoil-CoA és similar a la de la resta de CPT1 descrites. (Nicot et al., 2001). Segons aquests resultats, la CPT1A de porc podia ser un bon model en l'estudi de les relacions estructura-funció de les CPT1 i sobretot, de les regions implicades en la sensibilitat a malonil-CoA.

Fins al moment, els estudis amb proteïnes quimèriques s'havien realitzat combinant CPT1A amb CPT1B (Jackson et al., 2000a/b; Shi et al., 2000; Swanson et al., 1998), però la poca identitat entre les seqüències aminoàcides d'aquestes proteïnes i les diferents característiques

cinètiques que tenien dificultaven molt la interpretació dels resultats. Sovint aquestes quimeres resultaven inactives, probablement per la poca similitud de seqüència. La CPT1A de porc oferia la possibilitat de generar quimeres amb la CPT1A de rata que, presumiblement serien actives per l'elevada identitat entre les dues proteïnes (85.9%).

1.1.- LA REGIÓ C-TERMINAL DE LA CPT1A FUNCIONA COM UN ÚNIC DOMINI

L'ús de quimeres entre la CPT1A de rata (RCPT1A) i la CPT1A de porc (PCTP1A) i la construcció i caracterització cinètica de mutants delecionats en els primers 18 (Δ 1-18) i 28 (Δ 1-28) aminoàcids de la CPT1A de porc van permetre determinar regions de l'enzim CPT1A importants per la sensibilitat a malonil-CoA. Es van fer cinc construccions quimèriques entre CPT1A de rata i CPT1A de porc: dues intercanviant els extrems carboxils (Porc/Rata i Rata/Porc) i tres substituint regions petites de la zona carboxil de la CPT1A de rata per la zona corresponent de la CPT1A de porc (Rata/Porc-A; Rata/Porc-B i Rata/Porc-C). Els cinc enzims eren actius i presentaven afinitats pel palmitoil-CoA i la carnitina equivalents a les dels enzims salvatges, indicant un plegament a la membrana i una disposició del centre actiu similars a les proteïnes naturals.

Pel que fa la sensibilitat al malonil-CoA, les construccions quimèriques Porc/Rata i Rata/Porc mostraven valors de IC_{50} que corresponien a l'enzim del qual tenien l'extrem C-terminal, indicant que és aquesta regió de la proteïna la que marca el grau de sensibilitat a malonil-CoA de l'enzim. Aquests resultats concordaven amb els estudis publicats amb construccions quimèriques entre CPT1A de rata i CPT1B humana o de rata (Jackson et al., 2000; Shi et al., 2000; Swanson et al., 1998).

D'aquestes construccions es va analitzar, també, la mobilitat electroforètica en un gel SDS-PAGE. Com que les proteïnes CPT1B de rata i humana i la CPT1A de porc migren en un gel de poliàcrilamida anòmalament ràpid (segons un pes aparent de 82KDa) (Zhu et al., 1997a/b; Esser et al., 1996; Nicot et al., 2001), i mantenen aquesta característica transcrits i traduïdes *in vitro*, era de preveure que aquest fenomen fos degut a diferències intrínseques de la seqüència primària d'aquestes proteïnes. L'anàlisi per *Western Blot* de les construccions quimèriques Porc/Rata i Rata/Porc va mostrar que és la regió C-terminal la que determina la mobilitat electroforètica de les CPT1. Aquests resultats porten a pensar que les diferències en la

seqüència primària d'aquestes proteïnes fan que adoptin una conformació resistent a la desnaturalització per SDS que pugui ser la causa de que migrin segons un pes aparent menor.

En el cas de les construccions quimèriques Rata/Porc-A; Rata/Porc-B i Rata/Porc-C, la substitució d'un petit fragment de la CPT1A de rata pel corresponent de la CPT1A de porc (92,370,183 aminoàcids respectivament) va ser suficient per conferir una alta sensibilitat al malonil-CoA a l'enzim parenteral.

Aquestes observacions suggereixen que: (I) cap de les regions substituïdes, A, B o C és, per ella mateixa, única responsable del grau de sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA de l'enzim. La substitució de qualsevol d'aquestes regions de la RCPT1A per la corresponent de la PCPT1A genera enzims amb una sensibilitat a malonil-CoA similar a la de la proteïna CPT1A de porc salvatge, indicant que l'extrem C-terminal de les proteïnes CPT1A es comporta com un únic domini que dicta la sensibilitat a malonil-CoA de l'enzim. (II) Cap de les proteïnes quimèriques estudiades té una sensibilitat a malonil-CoA intermitja entre les proteïnes parenterals (PCPT1A i RCPT1A). Totes es comporten com una de les salvatges, indicant que la regió C-terminal de les CPT1A pot adoptar dues estructures diferents, una estructura de baixa sensibilitat a malonil-CoA i una d'alta sensibilitat. L'estructura d'alta sensibilitat sembla més susceptible de canviar a l'estructura de baixa sensibilitat.

La descripció de la regió C-terminal com un únic domini concorda amb els estudis de proteòlisi sobre mitocondris intactes de fetge de rata publicats. Aquests estudis mostren que el tractament amb tripsina/quimiotripsina de la proteïna CPT1A unida a membrana porta a una ràpida disminució de l'activitat CPT1, efecte que és parcialment revertit pel malonil-CoA. En presència de malonil-CoA, l'enzim roman actiu tot i alliberar un fragment de 8Kda que els autors conclouen que no és essencial per l'activitat catalítica de l'enzim (Esser et al., 1993b). Utilitzant els coneixements que ara es tenen sobre l'estructura de la CPT1A i els nostres resultats podem dir que els 8KDa alliberats després del tractament amb tripsina/quimiotripsina corresponen a l'extrem N-terminal de la CPT1A (aproximadament els primers 70 aminoàcids). Algunes publicacions mostren que la CPT1A és resistent a digestions proteolítiques amb concentracions baixes de proteases que no alterin la membrana, suggerint que la CPT1A, especialment la regió C-terminal, es troba fortament ensamblada (Fraser et al., 1997; Cohen et al., 1998).

Estudis previs a aquest treball correlacionaven l'elevada sensibilitat a malonil-CoA de les CPT1B i de la CPT1A de porc amb la migració anòmala en un gel SDS-PAGE (Zhu et al., 1997a/b; Nicot et al., 2001; Esser et al., 1996). Les quimeres Rata/Porc-A i Rata/Porc-C indiquen el contrari. Les dues mostren una sensibilitat a malonil-CoA alta i un patró de migració electroforètica normal, demostrant que l'estructura primària de l'enzim juga un paper en la determinació de la sensibilitat a malonil-CoA, independent del seu paper en l'estructura global de la proteïna.

1.2.- EL DOMINI C-TERMINAL DETERMINA LA SENSIBILITAT A MALONIL-CoA A TRAVÉS D'INTERACCIONS AMB L'EXTREM AMINO

Les dues construccions de CPT1A de porc delecionades en els aminoàcids 1-18 ($\Delta 18$ Porc) i 1-28 ($\Delta 28$ Porc) i les dues construccions amb les mateixes delecions a partir de la quimera Porc/Rata van donar lloc a enzims molt insensibles a malonil-CoA (IC_{50} de l'ordre de 100 μM), però amb diferències estadístiques entre $\Delta 18$ Porc o $\Delta 18$ Porc/Rata i $\Delta 28$ Porc o $\Delta 28$ Porc/Rata, sent aquestes últimes menys insensibles (més sensibles).

El fet que $\Delta 18$ Porc fos més sensible a malonil-CoA que $\Delta 28$ Porc evidencia que l'extrem N-terminal de la CPT1A de porc conté, com en el cas de la CPT1A de rata (Jackson et al., 2000a/b), un determinant positiu (aminoàcids 1-18) i un determinant negatiu (aminoàcids 19-28) per la sensibilitat a malonil-CoA. Malgrat la CPT1A de porc és molt sensible a la inhibició per malonil-CoA, com els isotips musculars que no presenten el determinant negatiu, la seva regió N-terminal sembla funcionar com la de les CPT1A poc sensibles al malonil-CoA.

Per altra banda, mentre que la CPT1A de porc i la quimera Porc/Rata presentaven diferent sensibilitat al malonil-CoA, la delecio dels 28 primers residus aminoàcids d'aquestes construccions va donar lloc a enzims, $\Delta 28$ Porc i $\Delta 28$ Porc/Rata, amb similar sensibilitat a malonil-CoA. Això indica que els primers 28 aminoàcids de la proteïna determinen les diferències en la sensibilitat a malonil-CoA entre la CPT1A de porc i la CPT1A de rata. El mateix resultat s'observa quan només els primers 18 residus aminoàcids són delecionats ($\Delta 18$ Porc i $\Delta 18$ Porc/Rata), suggerint que aquests primers 18 aminoàcids N-terminals són suficients per determinar aquestes diferències entre porc i rata.

2.- CPT1B DE PORC. UN ISOTIP B AMB CARACTERÍSTIQUES DE CPT1A

La sensibilitat a malonil-CoA de les CPT1 és un dels principals mecanismes de regulació de la β -oxidació. El porc presenta un comportament metabòlic, baixa β -oxidació hepàtica i elevada β -oxidació muscular (Duce et al., 1994; Schmidt et al., 1998), diferent al de la resta de mamífers i que es podria explicar, en part, per les característiques cinètiques dels seus enzims CPT1. Com ja s'ha explicat anteriorment, la CPT1A de porc presenta una elevada sensibilitat al malonil-CoA, és inhibida a baixes concentracions de l'inhibidor, reprimint la β -oxidació hepàtica (Nicot et al., 2001).

Pel que fa a la CPT1B de porc, el seu clonatge i expressió en *Pichia pastoris* va donar lloc a un enzim poc sensible al malonil-CoA (IC_{50} : 906nM) i poc afí als substrats, carnitina (K_m : 197 μ M) i palmitoil-CoA (K_m : 82.58 μ M). Aquesta baixa sensibilitat a malonil-CoA, típica dels isotips A de la CPT1 (IC_{50} CPT1A de rata: 1900nM) i lluny de les CPT1B (IC_{50} CPT1B humana: 69nM), corrobora les dades prèvies amb mitocondris musculars de porc i podria explicar l'efectiva β -oxidació muscular que presenten aquests animals (Schmidt et al., 1998).

Dels resultats obtinguts destaca la baixa afinitat al substrat acil-CoA (palmitoil-CoA) que presenta la CPT1B de porc respecte a les altres CPT1 (K_m CPT1B humana: 43 μ M i K_m CPT1B de rata: 57 μ M) (Zhu et al., 1997a/b; Jackson et al., 2000a/b) i una afinitat per la carnitina alta, pròxima a la dels isotips A (K_m entre 100-126 μ M) i molt diferent de la dels isotips B (K_m entre 666-800 μ M).

En la CPT1A de porc s'han descrit canvis en l'afinitat per la carnitina induïts per la dieta, que no es donen en la CPT1B (Heo et al., 2000). La baixa K_m per carnitina observada en l'enzim recombinant corrobora les dades on s'apunta a què la suplementació amb carnitina de porcs nounats privats del calostre no accelera el metabolisme dels triglicèrids (Heo et al., 2002).

Els resultats d'aquest treball indiquen que la CPT1B de porc és un isotip muscular amb característiques hepàtiques. Segons les dades publicades de construccions delecionades, de mutagènesis puntuals i de proteïnes quimèriques, els residus aminoàcids implicats en aquest comportament únic probablement es troben a l'extrem N-terminal de l'enzim.

L'alineament de les seqüències de les regions N-terminal, fins el segon fragment transmembrana, de diferents CPT1 mostra un alt grau d'identitat entre enzims amb diferents característiques cinètiques, indicant que interaccions entre els extrems amino i carboxil de la proteïna són importants en la determinació de les característiques cinètiques de les CPT1A i de les CPT1B. El que sí que pot ajudar a entendre aquest alineament són les diferències d'afinitat per la carnitina dels diferents isotips. Estudis previs indiquen que la interacció entre els dos fragments transmembrana (TM1 i TM2) és clau en la K_m per aquest substrat (Shi et al., 2000; Jackson et al., 2000a/b). El comportament de la CPT1B de porc, amb una alta afinitat per la carnitina, permet buscar els residus aminoàcids implicats en aquest paràmetre cinètic. Es tracta de pocs residus ja que les regions transmembranes de la CPT1B de porc són més similars a les dels seus homòlegs d'altres espècies que a les dels isotips CPT1A, tot i la diferent K_m per carnitina que presenten.

D'acord amb el seu paper en la sensibilitat al malonil-CoA, la regió N-terminal de la CPT1A pot dividir-se en dos dominis diferents, un determinant positiu situat en els primers 18 residus i un determinant negatiu situat entre els aminoàcids 19 i 30. Estudis de mutagènesi puntual del segon domini descrit suggereixen la Ser²⁴ i el Gln³⁰ com a possibles residus responsables d'una alta sensibilitat a malonil-CoA (Jackson et al., 2001). Totes les CPT1B tenen la Ser²⁴, però enlloc del Gln³⁰ de les CPT1A tenen una His³⁰. A més a més, aquest determinant negatiu sembla absent en les CPT1B (Jackson et al., 2000b), fet que podria correlacionar-se amb l'elevada sensibilitat a malonil-CoA d'aquests isotips (Zhu et al., 1997a/b). Segons les dades exposades, podem dir que la CPT1B de porc és una excepció, tot i tenir una seqüència aminoàcida de l'extrem N-terminal més similar a les CPT1B que a les CPT1A (presenta la His³⁰), mostra una sensibilitat a malonil-CoA pròxima a la dels isotips hepàtics que fa pensar en la possible existència d'un determinant negatiu en aquest enzim.

3.- C75 I EL SISTEMA CPT

La molècula C75 va ser sintetitzada buscant un substitut a la cerulenina que fos permeable a la cèl·lula, més estable químicament i menys reactiu (Kuhajda et al., 2000). Es tracta d'un inhibidor de la FAS i dels diferents substrats d'aquesta: l'acetil-CoA, el malonil-CoA i el NADPH (Rendina et al., 2005). Igual que en el cas de la cerulenina, C75 redueix la ingesta, provoca pèrdua de pes, pèrdua de massa grassa i els resultats apunten a què, com a mínim una part

d'aquests efectes es donen a nivell central (Kim et al., 2002; Kumar et al., 2002; Loftus et al., 2000).

L'anorèxia causada per C75 s'ha associat a una disminució de la ingesta, a nivell del SNC, per reducció dels nivells del pèptid orexigènic NPY i increment de l'expressió de CART (*cocaine and amphetamine related transcript*) (Tu et al., 2005; Thupari et al., 2004) i a un increment de la despesa energètica a teixits perifèrics. Entre els processos implicats en aquest increment de la despesa energètica hi ha un increment de la β -oxidació mitocondrial fet que genera la paradoxa del C75. Els tractaments amb aquest compost provoquen: un increment dels nivells de malonil-CoA per inhibició de la FAS i un increment de la β -oxidació mitocondrial (Thupari et al., 2002).

Donat que l'enzim CPT1 és considerat el principal punt de control de la β -oxidació és lògic pensar que pugui estar implicat en el mecanisme d'acció del C75. Per tal d'estudiar l'efecte de C75 sobre el sistema CPT es van expressar les proteïnes recombinants CPT1A de rata, CPT1B humana i CPT1A de porc en *Pichia pastoris* i es va assajar l'activitat d'aquests enzims en presència i absència de malonil-CoA. En tots els casos, C75 activava la CPT1.

L'increment de l'activitat CPT1 per C75, en presència de concentracions inhibidores de malonil-CoA que explicarien la paradoxa abans descrita, s'ha associat a un possible efecte de competició del C75 pel lloc d'unió del malonil-CoA (Thupari et al., 2002). Els resultats d'aquest treball qüestionen aquesta idea en condicions fisiològiques ja que l'activitat total CPT1 assajada en presència de C75 i malonil-CoA segueix sent menor que l'obtinguda en absència de malonil-CoA.

En el nostre cas, l'estimulació de la CPT1 per C75 va ser menor sobre les proteïnes recombinants que la publicada en cultius primaris (Thupari et al., 2002). Aquest resultat no sembla relacionat amb la diferent sensibilitat a malonil-CoA dels enzims recombinants ja que es va obtenir el mateix efecte de C75 assajant enzims amb característiques cinètiques molt diferents. Darrerament, han sorgit diversos treballs on s'apunta a una regulació transcripcional de gens implicats en el metabolisme lipídic per C75 (Tu et al., 2005). Entre els gens que veuen incrementada la seva expressió gènica destaquen la CPT1A i l'acil-CoA-oxidasa, implicades en l'oxidació d'àcids grassos, i gens del desacoblament mitocondrial. Aquests efectes a nivell transcripcional podrien explicar les diferències observades en l'activació per C75 entre les CPT1 recombinants i les de cultius primaris.

L'estudi de l'efecte del C75 sobre la CPT2, un enzim insensible al malonil-CoA, va donar resultats similars. L'enzim CPT2 recombinant també era activat per C75 i aquest resultat va ser confirmat assajant l'activitat CPT2 endògena sobre cèl·lules CHO i COS-7. Per realitzar aquests experiments sobre cèl·lules en cultiu es va haver de inhibir prèviament l'activitat CPT1 endògena de les cèl·lules, ja que ambdós enzims s'assagen seguint el mateix protocol (De Vries et al., 1997; Woeltje et al., 1990a). La inhibició de l'activitat CPT1 es va dur a terme tractant les cèl·lules amb octilglucòsid, un detergent que, per alteració de l'entorn membranós, desestabilitza la CPT1.

Els resultats d'aquest treball indiquen que C75 actua directament sobre el sistema llançadora CPT activant els enzims CPT1A, CPT1B i CPT2. Aquest fet explicaria l'activació general de la β -oxidació en teixits que expressen isotips diferents de CPT1. Els experiments realitzats també mostren que aquest efecte del C75 sobre el sistema CPT és independent de malonil-CoA. Posterior a aquest treball, un estudi ha vingut a reafirmar aquestes observacions, el C75 és capaç d'activar, en presència de malonil-CoA, una CPT1B recombinant expressada en *Pichia pastoris*, no competint per la unió de malonil-CoA (Yang et al., 2005).

Pel que fa a l'enzim CPT2, se sap que la seva deficiència és una de les causes més comuns d'alteracions en el metabolisme dels àcids grassos. Tot i haver estat considerat sempre la part no regulable del sistema CPT, per la seva insensibilitat al malonil-CoA i la seva expressió ubiqua i atemporal, cada vegada són més les dades que apunten a una regulació estricta de l'enzim. S'ha descrit un mecanisme de regulació transcripcional per bezafibrat, que correlaciona amb la localització d'un PPRE en el promotor del gen humà (Djouadi et al., 2003; Barrero et al., 2003) i que valida la CPT2 com a possible diana farmacològica. Amb el treball aquí presentat també sabem que, a nivell post-transcripcional, CPT2 pot ser regulada per C75.

Entre els mecanismes que s'han proposat per explicar l'efecte del C75 sobre la β -oxidació, s'ha apuntat la possibilitat que C75 inhibeixi l'enzim ACC2 de múscul esquelètic per fosforilació de la serina-79 d'aquesta proteïna. Aquesta inhibició provocaria una disminució de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim i una disminució dels nivells de malonil-CoA mitocondrial en teixits perifèrics (Cha et al., 2005).

DISCUSSIÓ

Tots els resultats fins ara descrits demostren que el C75 activa l'oxidació d'àcids grassos en cultius cel·lulars i en animals sencers (Thupari et al., 2004; Thupari et al., 2002). Recentment, s'ha descrit que la seva modificació, *in vitro*, a C75-CoA el converteix en un inhibidor de l'activitat CPT (Bentebibel et al., 2006). Per ara, es desconeix si aquest derivat es genera *in vivo*.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE *CPT1B*

- L'expressió múscul-específica del gen *CPT1B* humà pot explicar-se, en part, per la cooperació sinèrgica entre factors metabòlics, PPAR α :RXR α , i factors miogènics, MEF-2C. Aquesta cooperació sinèrgica depèn de la disposició espacial dels elements de resposta a aquests factors i de la interacció física entre PPAR α i MEF-2C.
- La diferenciació cel·lular afecta la forma en què PPAR α controla l'expressió de *CPT1B*, però no la de PPAR δ .
- La presència d'un lloc d'unió a Sp1 participa en la resposta isotip-específica dels PPAR, a través d'una interacció diferent entre PPAR α i PPAR δ .

CONTROL DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE CPT

- La sensibilitat a malonil-CoA dels enzims CPT1A ve determinada per interaccions entre els extrems amino i carboxil, comportant-se aquest darrer com un únic domini funcional.
- L'enzim CPT1B de porc presenta característiques cinètiques típiques dels isotips CPT1A, tot i presentar una seqüència aminoàcida molt pròxima a les CPT1B.
- C75 activa CPT1A, CPT1B i CPT2 de manera independent de malonil-CoA i de les característiques cinètiques de les CPT.

BIBLIOGRAFIA

A

- Abbot EL., McCormack JG., Reynet C., Hassall DG., Buchan KW., Yeaman SJ. **Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells.** *FEBS J.* 2005 Jun; 272(12): 3004-3014.
- Abo-Hashema KA., Cake MH., Lukas MA., Knudsen J. **The interaction of acyl-CoA with acyl-CoA binding protein and carnitine palmitoyltransferase I.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Aug; 33(8): 807-815.
- Abu-Elheiga L., Brinkley W.R., Zhong L., Chirala S.S., Woldegiorgis G., Wakil S.J. **The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000 Feb; 97(4): 1444-1449.
- Abu-Elheiga L., Matzuk M.M., Abo-Hashema K.A.H., Wakil S.J. **Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2.** *Science.* 2001 Mar; 291(5513): 2613-2616.
- Abumrad NA., El-Maghrabi MR., Amri EZ., Lopez E., Grimaldi PA. **Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36.** *J Biol Chem.* 1993 Aug; 268(24): 17665-17668.
- Adams SH., Esser V., Brown NF., Ing NH., Johnson L., Foster DW., McGarry JD. **Expression and possible role of muscle-type carnitine palmitoyltransferase I during sperm development in the rat.** *Biol. Reprod.* 1998 Dec; 59(6): 1399-1405.
- Agostini M., Gurnell M., Savage DB., Wood EM., Smith AG., Rajanayagam O., Games KT., Levinson SH., Xu HE., Schwabe JW., Willson TM., O'Rahilly S., Chatterjee VK. **Tyrosine agonists reverse the molecular defects associated with dominant-negative mutations in human peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *Endocrinology.* 2004 Apr; 145(4): 1527-1538.
- Alland L., Muhle R., Hou HJ., Potes J., Chin L., Schreiber-Agus N., DePinho RA. **Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression.** *Nature.* 1997 May; 387(6628): 49-55.
- Ammanamanchi S., Freeman JW., Brattain MG. **Acetylated sp3 is a transcriptional activator.** *J. Biol. Chem.* 2003 Sep; 278(37): 35775-35780.
- An J., Muoio DM., Shiota M., Fujimoto Y., Cline GW., Shulman GI., Koves TR., Stevens R., Millington D., Newgard CB. **Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance.** *Nat Med.* 2004 Mar; 10(3): 268-274.
- Andersson U., Filipsson K., Abbott CR., Woods A., Smith K., Bloom SR., Carling D., Small CJ. **AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake.** *J Biol Chem.* 2004 Mar; 279(13): 12005-12008.
- Andersson U., Scarpulla RC. **Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells.** *Mol Cell Biol.* 2001 Jun; 21(11): 3738-3749.
- Andres V., Cervera M., Mahdavi V. **Determination of the consensus binding site for MEF2 expressed in muscle and brain reveals tissue-specific sequence constraints.** *J. Biol. Chem.* 1995 Oct; 270(40): 23246-23249.
- Andrews NC., Faller DV. **A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells.** *Nucleic Acids Res.* 1991 May; 19(9): 2499.
- Aoyama T., Peters JM., Iritani N., Nakajima T., Furihata K., Hashimoto T., Gonzalez FJ. **Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha).** *J. Biol. Chem.* 1998 Mar; 273(10): 5678-5684.
- Apt D., Watts RM., Suske G., Bernard HU. **High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter.** *Virology.* 1996 Oct; 224(1): 281-291.
- Aranda A., Pascual A. **Nuclear hormone receptors and gene expression.** *Physiol Rev.* 2001 Jul; 81(3): 1269-1304.

BIBLIOGRAFIA

Arnold HH., Winter B. **Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998 Oct; 8(5): 539-544.

Asins G., Serra D., Miliar A., Caudevilla C., Matas R., Arias G., Hegardt FG. **Developmental changes in the phospho(enol)pyruvate carboxykinase gene expression in small intestine and liver of suckling rats.** *Arch Biochem. Biophys.* 1996 May; 329(1): 82-86.

Asins G., Serra D., Arias G., Hegardt FG. **Developmental changes in carnitine palmitoyltransferase I and II gene expression in intestine and liver of suckling rats.** *Biochem. J.* 1995 Mar; 306(2): 379-384.

Asins G., Serra D., Hegardt FG. **The effect of etomoxir on the mRNA levels of enzymes involved in ketogenesis and cholesterologenesis in rat liver.** *Biochemical Pharmacology.* 1994 Apr; 47(8): 1373-1379.

Assimacopoulos F., Thumelin S., Roche E., Esser V., McGarry JD., Prentki M. **Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic β -cell line INS-1.** *J. Biol. Chem.* 1997 Jan; 272(3): 1659-1664.

Athanikar JN., Sanchez HB., Osborne TF. **Promoter selective transcriptional synergy mediated by sterol regulatory element binding protein and Sp1: a critical role for the Btd domain of Sp1.** *Mol Cell Biol.* 1997 Sep; 17(9): 5193-5200.

Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L., Vallier P., Frering V., Riou J.P., Staels B., Auwerx J., Laville M., Vidal H. **Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients.** *Diabetes.* 1997 Aug; 46(8): 1319-1327.

Ausubel FM., Brent R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith GA., Struhl K. **Current protocols in molecular biology.** Wiley, New York, 1994.

B

Baar K., Wende AR., Jones TE., Marison M., Nolte LA., Chen M., Kelly DP., Holloszy JO. **Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1.** *FASEB J.* 2002 Dec; 16(14): 1879-1886.

Bailey P., Downes M., Lau P., Harris J., Chen SL., Hamamori Y., Sartorelli V., Muscat GE. **The nuclear receptor corepressor N-CoR regulates differentiation: N-CoR directly interacts with MyoD.** *Mol Endocrinol.* 1999 Jul; 13(7): 1155-1168.

Baldán A., Marrero PF., Haro D. **Rosiglitazone down-regulates CPT1 β gene.** 42nd International Conference on the Biochemistry of Lipids. Graz (Austria). 2001

Banner CD., Gottlicher M., Widmark E., Sjoval J., Rafter JJ., Gustafsson JA. **A systematic analytical chemistry/cell assay approach to isolate activators of orphan nuclear receptors from biological extracts: characterization of peroxisome proliferator-activated receptor activators in plasma.** *J. Lipid. Res.* 1993 Sep; 34(9): 1583-1591.

Barak Y., Liao D., He W., Ong ES., Nelson MC., Olefsky JM., Boland R., Evans RM. **Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan; 99(1): 303-308.

Barbera MJ., Schluter A., Pedraza N., Iglesias R., Villarroya F., Giralt M. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell.** *J. Biol. Chem.* 2001 Jan; 276(2): 1486-1493.

Barger PM., Kelly DP. **PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism.** *Trends Cardiovasc Med.* 2000 Aug; 10(6): 238-245.

BIBLIOGRAFIA

- Barger PM., Browning AC., Garner AN., Kelly DP. **p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response.** *J Biol Chem.* 2001 Nov; 276(48): 44495-44501.
- Barish GD., Narkar VA., Evans RM. **PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome.** *J Clin Invest.* 2006 Mar; 116(3): 590-7.
- Barrero M.J. **Mecanismos de control en la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y la cetogénesis.** Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona 2000a.
- Barrero MJ., Camarero N., Marrero PF., Haro D. **Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element.** *Biochem. J.* 2003 Feb; 369(3): 721-729.
- Barrero MJ., Marrero PF., Haro D. **Regulation of the rat liver carnitine palmitoyltransferase I gen transcription by thyroid hormone.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000b Dec; 279(1): 81-88.
- Barroso I., Gurnell M., Crowley VE., Agostini M., Schwabe JW., Soos MA., Maslen GL., Williams TD., Lewis H., Schafer AJ., Chatterjee VK., O'Rahilly S. **Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension.** *Nature.* 1999 Dec; 402(6764): 880-883.
- Barth N., Langmann T., Scholmerich J., Schmitz G., Schaffler A. **Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 (apM-1) promoter: role of SP1/SP3 and TNF-alpha as regulatory pathways.** *Diabetologia.* 2002 Oct; 45(10): 1425-1433.
- Bastie C., Holst D., Gaillard D., Jehl-Pietri C., Grimaldi PA. **Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts.** *J Biol Chem.* 1999 Jul; 274(31): 21920-21925.
- Benezra R., Davis RL., Lockshon D., Turner DL., Weintraub H. **The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins.** *Cell.* 1990 Apr; 61(1): 49-59.
- Bentebibel A., Sebastian D., Herrero L., Lopez-Vinas E., Serra D., Asins G., Gomez-Puertas P., Hegardt FG. **Novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase I activity and palmitate oxidation.** *Biochemistry.* 2006 Apr; 45(14): 4339-4350.
- Berger J., Moller D. **The mechanisms of action of PPARs.** *Annu. Rev. Med.* 2002; 53: 409-435.
- Berkes CA., Tapscott SJ. **MyoD and the transcriptional control of myogenesis.** *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Aug-Oct; 16(4-5): 585-595.
- Berthon PM., Howlett RA., Heigenhauser GJ., Spriet LL. **Human skeletal muscle carnitine palmitoyltransferase I activity determined in isolated intact mitochondria.** *J Appl Physiol.* 1998 Jul; 85(1): 148-153.
- Bieber LL.. **Carnitine.** *Annu. Rev. Biochem.* 1988; 57: 261-283.
- Billington CJ., Briggs JE., Harker S., Grace M., Levine A.S. **Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism.** *Am. J. Physiol.* 1994 Jun; 266(6 Pt 2): R1765-R1770.
- Billon N., Carlisi D., Datto MB., van Grunsven LA., Watt A., Wang XF., Rudkin BB. **Cooperation of Sp1 and p300 in the induction of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 during NGF-mediated neuronal differentiation.** *Oncogene.* 1999 May; 18(18): 2872-2882.
- Bird MI., Saggerson ED. **Binding of malonyl-CoA to isolated mitochondria. Evidence for high and low-affinity sites in liver and heart and relationship to inhibition of carnitine palmitoyltransferase activity.** *Biochem J.* 1984 Sep; 222(3): 639-647.
- Bimbaum MJ., van Wijnen AJ., Odgren PR., Last TJ., Suske G., Stein GS., Stein JL. **Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3.** *Biochemistry.* 1995 Dec; 34(50): 16503-16508.

BIBLIOGRAFIA

- Birnboim HC., Doly J. **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov; 7(6): 1513-1523.
- Black BL., Olson EN. **Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998; 14: 167-196.
- Blanquart C., Barbier O., Fruchart JC., Staels B., Glineur C. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes.** *J Biol Chem.* 2002 Oct; 277(40): 37254-37259.
- Bonen A., Dyck DJ., Luiken JJ. **Skeletal muscle fatty acid transport and transporters.** *Adv Exp Med Biol.* 1998; 441: 193-205.
- Bonen A., Luiken JJ., Arumugam Y., Glatz JF., Tandon NN. **Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase.** *J Biol Chem.* 2000 May; 275(19): 14501-14508.
- Bonnefont J.P., Demaugre F., Prip-Buus C., Saudubray J.M., Brivet M., Abadi N., Thuillier L. **Carnitine palmitoyltransferase deficiencies.** *Mol. Genet. Metab.* 1999 Dec; 68(4): 424-440.
- Bonnefont JP., Djouadi F., Prip-Buus C., Gobin S., Munnich A., Bastin J. **Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects.** *Mol Aspects Med.* 2004 Oct-Dec; 25(5-6): 495-520.
- Bouwman P., Gollner H., Elsasser HP., Eckhoff G., Karis A., Grosveld F., Philipsen S., Suske G. **Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development.** *EMBO J.* 2000 Feb; 19(4): 655-661.
- Bouwman P., Philipsen S. **Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors.** *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002 Sep; 195(1-2): 27-38.
- Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 1976 May; 72: 248-254.
- Braissant O., Foufelle F., Scotto C., Dauca M., Wahli W. **Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat.** *Endocrinology.* 1996 Jan; 137(1): 354-366.
- Braissant O., Wahli W. **Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development.** *Endocrinology.* 1998 Jun; 139(6): 2748-2754.
- Brandeis M., Frank D., Keshet I., Siegfried Z., Mendelsohn M., Nemes A., Temper V., Razin A., Cedar H. **Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation.** *Nature.* 1994 Sep; 371(6496): 435-438.
- Brandt JM., Djouadi F., Kelly DP. **Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha.** *J. Biol. Chem.* 1998 Sep; 273(37): 23786-23792.
- Braun H., Koop R., Ertmer A., Nacht S., Suske G. **Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation.** *Nucleic Acids Res.* 2001 Dec; 29(24): 4994-5000.
- Braun T., Buschhausen-Denker G., Bober E., Tannich E., Arnold HH. **A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts.** *EMBO J.* 1989 Mar; 8 (3): 701-709.
- Braun T., Winter B., Bober E., Arnold HH. **Transcriptional activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf5.** *Nature* 1990 Aug; 346 (6285): 663-665.
- Breitbart RE., Liang CS., Smoot LB., Laheru DA., Mahdavi V., Nadal-Ginard B. **A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage.** *Development.* 1993 Aug; 118 (4):1095-1106.
- Bremer J. **The effect of fasting on the activity of liver carnitine palmitoyltransferase and its inhibition by malonyl-CoA.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1981 Sep; 665(3): 628-631.

BIBLIOGRAFIA

- Bremer J., Woldegiorgis G., Schalinske K., Shrago E. **Carnitine palmitoyltransferase. Activation by palmitoyl-CoA and inactivation by malonyl-CoA.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1985 Jan; 833(1): 9-16.
- Brennan T.J., Chakraborty T., Olson EN. **Mutagenesis of the myogenin basic region identifies an ancient protein motif critical for activation of myogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jul; 88(13): 5675-9.
- Briggs MR., Kadonaga JT., Bell SP., Tjian R. **Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1.** *Science.* 1986 Oct; 234(4772): 47-52.
- Britton CH., Mackey DW., Esser V., Foster DW., Burns DK., Yarnall DP., Froguel P., McGarry JD. **Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPTIA and CPTIB).** *Genomics.* 1997 Feb; 40(1): 209-211.
- Britton CH., Schultz KA., Zang B., Esser V., Foster DW., McGarry JD. **Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995 Mar; 92(6): 1984-1988.
- Brown NF., Anderson RC., Caplan SL., Foster DW., McGarry JD. **Catalytically important domains of rat carnitine palmitoyltransferase II as determined by site-directed mutagenesis and chemical modification. Evidence for a critical histidine residue.** *J. Biol. Chem.* 1994a Jul; 269(29): 19157-19162.
- Brown NF., Esser V., Gonzalez AD., Evans CT., Slaughter CA., Foster DW., McGarry JD. **Mitochondrial import and processing of rat liver carnitine palmitoyltransferase II defines the amino terminus of the mature protein. Possibility of differential modification of the rat and human isoforms.** *J. Biol. Chem.* 1991 Aug; 266(23): 15446-15449.
- Brown NF., Hill JK., Esser V., Kirkland JL., Corkey BE., Foster DW., McGarry JD. **Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes.** *Biochem. J.* 1997 Oct; 327(1): 225-231.
- Brown NF., Weis BC., Husti JE., Foster DW., McGarry JD. **Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart.** *J. Biol. Chem.* 1995 Apr; 270(15): 8952-8957.
- Brown NF., Esser V., Foster DW., McGarry JD. **Expression of a cDNA for rat liver carnitine palmitoyltransferase I in yeast establishes that catalytic activity and malonyl-CoA sensitivity reside in a single polypeptide.** *J Biol Chem.* 1994b Oct; 269(42): 26438-26442.
- Burant CF., Sreenan S., Hirano K., Tai TA., Lohmiller J., Lukens J., Davidson NO., Ross S., Graves RA. **Troglitazone action is independent of adipose tissue.** *J Clin Invest.* 1997 Dec; 100(11): 2900-2908.
- Buskin JN., Hauschka SD. **Identification of a myocyte nuclear factor which binds to the muscle-specific enhancer of the muscle creatine kinase gene.** *Mol. Cell. Biol.* 1989 Jun; 9(6): 2627-2640.

C

- Cabrero A., Llaverias G., Roglans N., Alegret M., Sanchez R., Adzet T., Laguna JC., Vazquez M. **Uncoupling protein-3 mRNA levels are increased in white adipose tissue and skeletal muscle of bezafibrate-treated rats.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 Jul; 260(2): 547-556.
- Camarero N., Nadal A., Barrero MJ., Haro D., Marrero PF. **Histone deacetylase inhibitors stimulate mitochondrial HMG-CoA synthase gene expression via a promoter proximal Sp1 site.** *Nucleic Acids Res.* 2003 Mar; 31(6): 1693-1703.
- Camp HS., Tafuri SR., Leff T. **c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity.** *Endocrinology.* 1999 Jan; 140(1): 392-397.
- Camp HS., Tafuri SR. **Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase.** *J Biol Chem.* 1997 Apr; 272(16): 10811-10816.

BIBLIOGRAFIA

- Cha BS., Ciaraldi TP., Carter L., Nikoulina SE., Mudaliar S., Mukherjee R., Paterniti JR., Henry RR. **Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and retinoid X receptor (RXR) agonists have complementary effects on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle.** *Diabetologia*. 2001 Apr; 44(4): 444-452.
- Cha SH, Hu Z, Chohnan S, Lane MD. **Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct; 102(41): 14557-14562.
- Chabowski A., Coort SL., Calles-Escandon J., Tandon NN., Glatz JF., Luiken JJ., Bonen A. **The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR.** *FEBS Lett*. 2005 Apr; 579(11): 2428-2432.
- Chatelain F., Kohl C., Esser V., McGarry JD., Girard J., Pégrier JP. **Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes.** *Eur. J. Biochem*. 1996 Feb; 235(3): 789-798.
- Chawla A., Lee CH., Barak Y., He W., Rosenfeld J., Liao D., Han J., Kang H., Evans RM. **PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb; 100(3): 1268-1273.
- Chawla A., Repa JJ., Evans RM., Mangelsdorf DJ.. **Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files.** *Science*. 2001 Nov; 294(5548): 1866-1870.
- Chawla A., Schwarz EJ., Dimaculangan DD., Lazar MA. **Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation.** *Endocrinology*. 1994 Aug; 135(2): 798-800.
- Chen CM., Kraut N., Groudine M., Weintraub H. **I-mf, a novel myogenic repressor, interacts with members of the MyoD family.** *Cell*. 1996 Sep; 86(5): 731-741.
- Chen JD., Evans RM. **A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.** *Nature*. 1995 Oct; 377(6548): 454-457.
- Chen JL., Attardi LD., Verrijzer CP., Yokomori K., Tjian R. **Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators.** *Cell*. 1994 Oct; 79(1): 93-105.
- Chen S., Ogawa A., Ohneda M., Unger RH., Foster DW., McGarry JD. **More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling.** *Diabetes*. 1994 Jul; 43(7): 878-883.
- Chen SL., Dowhan DH., Hosking BM., Muscat GE. **The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation.** *Genes Dev*. 2000 May; 14(10): 1209-1228.
- Cheng L., Ding G., Qin Q., Huang Y., Lewis W., He N., Evans RM., Schneider MD., Brako FA., Xiao Y., Chen YE., Yang Q. **Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy.** *Nat Med*. 2004a Nov; 10(11): 1245-1250.
- Cheng L., Ding G., Qin Q., Xiao Y., Woods D., Chen YE., Yang Q. **Peroxisome proliferator-activated receptor delta activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2004b Jan; 313(2): 277-286.
- Chiang CM., Roeder RG. **Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators.** *Science*. 1995 Jan; 267(5197): 531-536.
- Christie ME., Rodgers RL. **Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat.** *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1994 Oct; 26(10): 1371-1375.
- Christian M., Kiskinis E., Debevec D., Leonardsson G., White R., Parker MG. **RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes.** *Mol Cell Biol*. 2005 Nov.; 25(21): 9383-9391.
- Christy BA., Sanders LK., Lau LF., Copeland NG., Jenkins NA., Nathans D. **An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor inducible gene.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991 Mar; 88(5):1815-1819.

BIBLIOGRAFIA

Ciaraldi TP., Kong AP., Chu NV., Kim DD., Baxi S., Loviscach M., Plodkowski R., Reitz R., Caulfield M., Mudaliar S., Henry RR. **Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects.** *Diabetes*. 2002 Jan; 51(1): 30-36.

Cohen I., Guillerault F., Girard J., Prip-Buus C. **The N-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 contains an internal mitochondrial import signal and residues essential for folding of its C-terminal catalytic domain.** *J. Biol. Chem.* 2001 Feb; 276(7): 5403-5411.

Cohen I., Kohl C., McGarry JD., Girard J., Prip-Buus C. **The N-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 mediates import into the outer mitochondrial membrane and is essential for activity and malonyl-CoA sensitivity.** *J. Biol. Chem.* 1998 Nov; 273(45): 29896-29904.

Combs TP., Wagner JA., Berger J., Doebber T., Wang WJ., Zhang BB., Tanen M., Berg AH., O'Rahilly S., Savage DB., Chatterjee K., Weiss S., Larson PJ., Gottesdiener KM., Gertz BJ., Charron MJ., Scherer PE., Moller DE. **Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization.** *Endocrinology*. 2002 Mar; 143(3): 998-1007.

Combs TP., Pajvani UB., Berg AH., Lin Y., Jelicks LA., Laplante M., Nawrocki AR., Rajala MW., Parlow AF., Cheeseboro L., Ding YY., Russell RG., Lindemann D., Hartley A., Baker GR., Obici S., Deshaies Y., Ludgate M., Rossetti L., Scherer PE. **A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity.** *Endocrinology*. 2004 Jan; 145(1): 367-383.

Cook GA., Otto DA., Cornell NW. **Differential inhibition of ketogenesis by malonyl-CoA in mitochondria from fed and starved rats.** *Biochem. J.* 1980 Dec; 192(3): 955-958.

Cook GA., Park EA. **Expression and regulation of carnitine palmitoyltransferase-lalpha and -lbeta genes.** *Am J Med Sci.* 1999 Jul; 318(1): 43-8.

Cook GA. **Differences in the sensitivity of carnitine palmitoyltransferase to inhibition by malonyl-CoA are due to differences in Ki values.** *J Biol Chem.* 1984 Oct; 259(19):12030-12033.

Courey AJ., Holtzman DA., Jackson SP., Tjian R. **Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1.** *Cell.* 1989 Dec; 59(5): 827-836.

Courey AJ., Tjian R. **Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation factor motif.** *Cell.* 1988 Dec; 55(5): 887-898.

Cregg JM., Vedvick TS., Raschke WC. **Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris.** *Biotechnology* 1993 Aug; 11(8): 905-910.

D

Dai J., Zhu H., Woldegiorgis G. **Leucine-764 near the extreme C-terminal end of carnitine palmitoyltransferase I is important for activity.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb; 301(3): 758-763.

Dai J., Zhu H., Shi J., Woldegiorgis G. **Identification by mutagenesis of conserved arginine and tryptophan residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I important for catalytic activity.** *J. Biol. Chem.* 2000 Jul; 275(29): 22020-22024.

Davis RL., Cheng PF., Lassar AB., Weintraub H. **The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation.** *Cell.* 1990 Mar; 60(5): 733-746.

Davis RL., Wientraub H. **Acquisition of myogenic specificity by replacing of three amino acid residues from MyoD into E12.** *Science.* 1992 May; 256(5059): 1027-1030.

De Leon MB., Montanez C., Gomez P., Morales-Lazaro SL., Tapia-Ramirez V., Valadez-Graham V., Recillas-Targa F., Yaffe D., Nudel U., Cisneros B. **Dystrophin Dp71 expression is down-regulated during myogenesis: role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity.** *J Biol Chem.* 2005 Feb; 280(7): 5290-5299.

BIBLIOGRAFIA

- De Vos P., Lefebvre AM., Miller SG., Guerre-Millo M., Wong K., Saladin R., Hamann LG., Staels B., Briggs MR., Auwerx J. **Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *J. Clin. Invest.* 1996 Aug; 98(4): 1004-1009.
- De Vries Y., Arvidson DN., Waterham HR., Cregg JM., Woldegiorgis G. **Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*.** *Biochemistry.* 1997 Apr; 36(17): 5285-5292.
- Demaugre F., Bonnefont JP., Capanec C., Scholte J., Saudubray JM., Leroux JP. **Immunoquantitative analysis of human carnitine palmitoyltransferase I and II defects.** *Pediatr Res.* 1990 May; 27(5): 497-500.
- Dennig J., Beato M., Suske G. **An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains.** *EMBO J.* 1996 Oct; 15(20): 5659-5667.
- Desvergne B., Michalik L., Wahli W. **Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road.** *Mol Endocrinol.* 2004 Jun; 18(6): 1321-1332.
- Desvergne B., Wahli W. **Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.** *Endocrine Reviews.* 1999 Oct; 20(5): 649-688.
- Devchand PR., Keller H., Peters JM., Vazquez M., Gonzalez FJ., Wahli W. **The PPAR-leukotriene B4 pathway to inflammation control.** *Nature.* 1996 Nov; 384(6604): 39-43.
- DiRenzo J., Soderstrom M., Kurokawa R., Ogliaastro MH., Ricote M., Ingre S., Horlein A., Rosenfeld MG., Glass CK. **Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors.** *Mol Cell Biol.* 1997 Apr; 17(4): 2166-2176.
- Djouadi F., Weinheimer CJ., Saffitz JE., Pitchford C., Bastin J., Gonzalez FJ., Kelly DP. **A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice.** *J Clin Invest.* 1998 Sep; 102(6): 1083-1091.
- Djouadi F., Bonnefont JP., Thuillier L., Droin V., Khadom N., Munnich A., Bastin J. **Correction of fatty acid oxidation in carnitine palmitoyl transferase 2-deficient cultured skin fibroblasts by bezafibrate.** *Pediatr. Res.* 2003 Oct; 54(4): 446-451.
- Dodson G., Wlodawer A. **Catalytic triads and their relatives.** *Trends. Biochem. Sci.* 1998 Sep; 23(9): 347-352.
- Doetzlhofer A., Rotheneder H., Lagger G., Koranda M., Kurtev V., Brosch G., Wintersberger E., Seiser C. **Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1.** *Mol Cell Biol.* 1999 Aug; 19(8): 5504-11.
- Dowell P., Ishmael JE., Avram D., Peterson VJ., Nevriy DJ., Leid M. **Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein.** *J Biol Chem.* 1999 May; 274(22): 15901-15907.
- Dressel U., Allen TL., Pippal JB., Rohde PR., Lau P., Muscat GE. **The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells.** *Mol Endocrinol.* 2003 Dec; 17(12): 2477-2493.
- Dressel U., Bailey PJ., Wang SC., Downes M., Evans RM., Muscat GE. **A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation.** *J Biol Chem.* 2001 May; 276(20): 17007-17013.
- Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., Wahli W. **Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors.** *Cell.* 1992 Mar; 68(5): 879-887.
- Duee PH., Pegorier JP., Quant PA., Herbin C., Kohl C., Girard J. **Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity.** *Biochem J.* 1994 Feb; 298(1): 207-212.
- Duplus E., Forest C. **Is There a Single Mechanism for Fatty Acid Regulation of Gene Transcription?** *Biochemical Pharmacol.* 2002 Sep; 64(5-6): 893-901.

BIBLIOGRAFIA

Duplus E., Glorian M., Forest C. **Fatty acid regulation of gene transcription.** *J. Biol. Chem.* 2000 Oct; 275(40): 30749-30752.

E

Eaton S., Bartlett K., Pourfarzam M. **Mammalian mitochondrial beta-oxidation.** *Biochem J.* 1996 Dec ;320(2): 345-357.

Eaton S., Bartlett K., Quant PA. **Carnitine palmitoyl transferase I and the control of beta-oxidation in heart mitochondria.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jul; 285(2): 537-539.

Edmondson DG., Cheng TC., Cserjesi P., Chakraborty T., Olson EN. **Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2.** *Mol. Cell. Biol.* 1992 Sep; 12(9): 3665-3677.

Edmondson DG., Olson EN. **A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program.** *Genes Dev.* 1989 May; 3(5): 628-640.

Edmondson DG., Olson EN. **Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription.** *J. Biol. Chem.* 1993 Jan; 268(2): 755-758.

Elias C.F., Aschkenasi C., Lee C., Kelly J., Ahima R.S., Bjorbaek C., Flier J.S., Saper C.B., Elmquist J.K. **Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area.** *Neuron.* 1999 Aug; 23(4): 775-786.

Emili A., Greenblatt J., Ingles CJ. **Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein.** *Mol. Cell. Biol.* 1994 Mar; 14(3): 1582-1593.

Escher P., Wahli W. **Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions.** *Mutat. Res.* 2000 Mar; 448(2):121-138.

Esser V., Kuwajima M., Britton CH., Krishnan K., Foster DW., McGarry JD. **Inhibitors of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I limit the action of proteases on the enzyme. Isolation and partial amino acid analysis of a truncated form of the rat liver isozyme.** *J Biol Chem.* 1993b Mar; 268(8): 5810-5816.

Esser V., Britton CH., Weis BC., Foster DW., McGarry JD. **Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a expression of a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function.** *J. Biol. Chem.* 1993a Mar; 268 (8): 5817-5822.

Esser V., Brown NF., Cowan AT., Foster DW., McGarry JD. **Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes.** *J. Biol. Chem.* 1996 Mar; 271(12): 6972-6977.

Evans RM., Barish GD., Wang YX. **PPARs and the complex journey to obesity.** *Nat. Med.* 2004 Apr; 10(4): 355-361.

F

Faergeman NJ., Knudsen J. **Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling.** *Biochem. J.* 1997 Apr; 323(1): 1-12.

Fajas L., Auboeuf D., Raspe E., Schoonjans K., Lefebvre AM., Saladin R., Najib J., Laville M., Fruchart JC., Deeb S., Vidal-Puig A., Flier J., Briggs MR., Staels B., Vidal H., Auwerx J. **The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene.** *J Biol Chem.* 1997 Jul; 272(30): 18779-18789.

Fajas L., Fruchart JC., Auwerx J. **PPARGamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter.** *FEBS Lett.* 1998 Oct; 438(1-2): 55-60.

BIBLIOGRAFIA

- Feinberg AP., Vogelstein B. **A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.** *Anal. Biochem.* 1983 Jul; 132 (1): 6-13.
- Felig P, Wahren J. **Fuel homeostasis in exercise.** *N Engl J Med.* 1975 Nov; 293(21): 1078-1084.
- Ferre P. **The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity.** *Diabetes.* 2004 Feb; 53 Suppl 1: S43-50.
- Ferrer A, Caelles C, Massot N, Hegardt FG. **Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Oct; 132(2): 497-504.
- Fickett, JW. **Coordinate positioning of MEF2 and myogenin binding sites.** *Gene.* 1996b Jun; 172(1): GC19-GC32.
- Fickett, JW. **Quantitative discrimination of MEF2 sites.** *Mol. Cell. Biol.* 1996a 1Jan; 681): 437-441.
- Finck BN, Kelly DP. **PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease.** *J Clin Invest.* 2006 Mar; 116(3): 615-22.
- Finck BN., Lehman JJ., Leone TC., Welch MJ., Bennett MJ., Kovacs A., Han X., Gross RW., Kozak R., Lopaschuk GD., Kelly DP. **The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus.** *J Clin Invest.* 2002 Jan; 109(1): 121-130.
- Finocchiaro G., Taroni F., Rocchi M., Martin A.L., Colombo I., Tarelli G.T., DiDonato S. **cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991Jan; 88(2): 661-665.
- Fisher CL., Pei GK. **Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method.** *Biotechniques.* 1997 Oct; 23(4): 570-574.
- Flier JS. **Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic.** *Cell.* 2004 Jan; 116(2): 337-350.
- Fluck CE., Miller WL. **GATA-4 and GATA-6 modulate tissue-specific transcription of the human gene for P450c17 by direct interaction with Sp1.** *Mol. Endocrinol.* 2004 May; 18(5): 1144-1157.
- Foley JE. **Rationale and applicatoin of fatty acid oxidation inhibitors in treatment of diabetes mellitus.** *Diabetes Care.* 1992 Jun; 15(6): 773-784.
- Forman BM., Chen J., Evans RM. **Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Apr; 94(9): 4312-4317.
- Forman BM., Tontonoz P., Chen J., Brun RP., Spiegelman BM., Evans RM. **15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma.** *Cell.* 1995 Dec; 83(5): 803-812.
- Fraser F., Padovese R., Zammit VA. **Distinct kinetics of carnitine palmitoyltransferase i in contact sites and outer membranes of rat liver mitochondria.** *J Biol Chem.* 2001 Jun; 276(23): 20182-20185.
- Fraser F., Corstorphine CG., Zammit VA. **Topology of the carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane.** *Biochem. J.* 1997 May; 323 (3): 711-718.
- Fraser F., Zammit VA. **Submitochondrial and subcellular distributions of the carnitine-acylcarnitine carrier.** *FEBBS Lett.* 1999 Feb; 445(1): 41-44.
- Fraser F., Zammit VA. **Enrichment of the carnitine palmitoyltransferase I and II in the contact sites of rat liver mitochondria.** *Biochem. J.* 1998 Jan; 329(2): 225-229.
- Frederich M., Balschi JA. **The relationship between AMP-activated protein kinase activity and AMP concentration in the isolated perfused rat heart.** *J Biol Chem.* 2002 Jan; 277(3): 1928-1932.

BIBLIOGRAFIA

Friedman JM., Halaas JL. **Leptin and the regulation of body weight in mammals.** *Nature*. 1998 Oct; 395(6704): 763-770.

Froeschle A., Alric S., Kitzmann M., Carnac G., Aurade F., Rochette-Egly C., Bonnieu A. **Retinoic acid receptors and muscle b-HLH proteins: partners in retinoid-induced myogenesis.** *Oncogene*. 1998 Jul; 16(26): 3369-3378.

Frohnert Bl., Hui TY., Bernlohr DA. **Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene.** *J. Biol. Chem.* 1999 Feb; 274(7): 3970-3977.

Funabashi H., Kawaguchi A., Tomoda H., Omura S., Okuda S., Iwasaki S. **Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase.** *J Biochem (Tokyo)*. 1989 May; 105(5): 751-755.

G

Gabrielson EW., Pinn ML., Testa JR., Kuhajda FP. **Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma.** *Clin Cancer Res*. 2001 Jan; 7(1): 153-157.

Gargiulo CE., Stuhlsatz-Krouper SM., Schaffer JE. **Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane.** *J. Lipid. Res.* 1999 May; 40(5): 881-892.

Gartel AL., Shchors K. **Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes.** *Exp Cell Res*. 2003 Feb; 283(1): 17-21.

Gehlert DR. **Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity.** *Neuropeptides*. 1999 Oct; 33(5): 329-338.

Gelb BD. **Genomic structure of and a cardiac promoter for the mouse carnitine palmitoyltransferase II gene.** *Genomics*. 1993 Dec; 18(3): 651-655.

Gellera C., Verderio E., Florida G., Finocchiaro G., Montermini L., Cavadini P., Zuffardi O., Taroni F. **Assignment of the human carnitine palmitoyltransferase II gene (CPT2) to chromosome 1p32.** *Genomics*. 1994 Nov; 24(1): 195-197.

Gelman L., Michalik L., Desvergne B., Wahli W. **Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors.** *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Apr; 17(2): 216-22.

Gerhold DL., Liu F., Jiang G., Li Z., Xu J., Lu M., Sachs JR., Bagchi A., Fridman A., Holder DJ., Doebber TW., Berger J., Elbrecht A., Moller DE., Zhang BB. **Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor- gamma agonists.** *Endocrinology*. 2002 Jun; 143(6): 2106-2118.

Giannessi F., Chiodi P., Marzi M., Minetti P., Pessotto P., De Angelis F., Tassoni E., Conti R., Giorgi F., Mabilia M., Dell'Uomo N., Muck S., Tinti MO., Carminati P., Arduini A. **Reversible carnitine palmitoyltransferase inhibitors with broad chemical diversity as potential antidiabetic agents.** *J Med Chem*. 2001 Jul; 44(15): 2383-2386.

Giguere V. **Orphan nuclear receptors: from gene to function.** *Endocr. Rev.* 1999 Oct; 20(5): 689-725.

Gilde AJ., Van Bilsen M.. **Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle.** *Acta Physiol Scand*. 2003 Aug; 178(4): 425-434.

Gill G., Pascal E., Tseng ZH., Tjian R. **A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Jan; 91(1): 192-196.

Girard J., Ferré P., Pégorier JP., Duée PH. **Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition.** *Physiol. Rev.* 1992 Apr; 72(2): 507-562.

Glass CK., Rose DW., Rosenfeld MG. **Nuclear receptor coactivators.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1997 Apr; 9(2): 222-232.

BIBLIOGRAFIA

- Glass CK. **Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease.** *J Clin Invest.* 2006 Mar; 116(3): 556-560.
- Gobin S., Bonnefont J.-P., Prip-Buus C., Mugnier C., Ferrec M., Demaugre F., Saudubray J.-M., Rostane H., Djouadi F., Wilcox W., Cederbaum S., Haas R., Nyhan W.L., Green A., Gray G., Girard J., Thuillier L. **Organization of the human liver carnitine palmitoyltransferase 1 gene (CPT1A) and identification of novel mutations in hypoketogenic hypoglycaemia.** *Hum. Genet.* 2002 Aug; 111(2): 179-189.
- Gobin S., Thuillier L., Jogl G., Faye A., Tong L., Chi M., Bonnefont J.-P., Girard J., Prip-Buus C. **Functional and structural basis of carnitine palmitoyltransferase 1 A deficiency.** *J. Biol.Chem.* 2003 Dec; 278(50): 50428-50434.
- Gossett LA., Kelvin DJ., Sternberg EA., Olson EN. **A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes.** *Mol Cell Biol.* 1989 Nov; 9(11): 5022-5033.
- Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I, Shimokawa T. **cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Aug; 274(2): 350-354.
- Green S., Isseman I., Sheer E. **A versatile in vivo and in vitro eukariotic expression vector for protein engineering.** *Nucleic Acids Res.* 1988 Jan; 16(1): 369.
- Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. **Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping.** *Gene Expr.* 1995; 4(4-5): 281-299.
- Grimaldi PA. **The roles of PPARs in adipocyte differentiation.** *Prog. Lipid. Res.* 2001 Jul; 40(4): 269-281.
- Grimaldi PA. **Roles of PPARdelta in the control of muscle development and metabolism.** *Biochem. Soc. Trans.* 2003 Dec; 31(6): 1130-1132.
- Gulick T., Cresci S., Caira T., Moore DD., Kelly DP. **The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994 Nov; 91(23): 11012-11016.
- Guzmán M., Geelen MJ. **Regulation of fatty acid oxidation in mammalian liver.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1993 Apr; 1167(3): 227-241.

H

- Hall AM., Smith AJ., Bernlohr DA. **Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1.** *J Biol Chem.* 2003 Oct; 278(44): 43008-43013.
- Hamamori Y., Wu HY., Sartorelli V., Kedes L. **The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist.** *Mol Cell Biol.* 1997 Nov; 17(11): 6563-6573.
- Hammarstedt A., Jansson PA., Wesslau C., Yang X., Smith U. **Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb ; 301(2): 578-582
- Hansen JB., Zhang H., Rasmussen TH., Petersen RK., Flindt EN., Kristiansen K. **Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling.** *J Biol Chem.* 2001 Feb; 276(5): 3175-3182.
- Harmon CM., Abumrad NA. **Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids.** *J Membr Biol.* 1993 Apr; 133(1): 43-49.

BIBLIOGRAFIA

- Hashimoto T., Cook WS., Qi C., Yeldandi AV., Reddy JK., Rao MS. **Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting.** *J. Biol. Chem.* 2000 Sep; 275(37): 28918-28928.
- Hashimoto N., Ogashiwa M., Okumura E., Endo T., Iwashita S., Kishimoto T. **Phosphorylation of a proline-directed kinase motif is responsible for structural changes in myogenin.** *FEBS Lett.* 1994 Sep; 352(2): 236-242
- Hassig CA., Fleischer TC., Billin AN., Schreiber SL., Ayer DE. **Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A.** *Cell.* 1997 May; 89(3): 341-347.
- He TC., Chan TA., Vogelstein B., Kinzler KW. **PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** *Cell.* 1999 Oct; 99(3): 335-345.
- Hebrock M., Fuchtbauer A., Fuchtbauer EM. **Repression of muscle-specific gene activation by the murine Twist protein.** *Exp. Cell Res.* 1997 May; 232(2): 295-303.
- Hebrock M., Wertz K., Fuchtbauer EM. **M-Twist is an inhibitor of muscle differentiation.** *Dev. Biol.* 1994 Oct; 165(2): 537-544.
- Heinzel T., Lavinsky RM., Mullen TM., Soderstrom M., Laherty CD., Torchia J., Yang WM., Brard G., Ngo SD., Davie JR., Seto E., Eisenman RN., Rose DW., Glass CK., Rosenfeld MG. **A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression.** *Nature.* 1997 May; 387(6628): 43-48.
- Heo K., Lin X., Odle J., Han IK. **Kinetics of carnitine palmitoyltransferase-I are altered by dietary variables and suggest a metabolic need for supplemental carnitine in young pigs.** *J Nutr.* 2000 Oct; 130(10): 2467-2470.
- Heo KN., Lin X., Han IK., Odle J. **Medium-chain fatty acids but not L-carnitine accelerate the kinetics of [¹⁴C]triacylglycerol utilization by colostrum-deprived newborn pigs.** *J Nutr.* 2002 Jul; 132(7): 1989-1994.
- Hermanson O., Glass CK., Rosenfeld MG. **Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification.** *Trends. Endocrinol. Metab.* 2002 Mar; 13(2): 55-60.
- Herzig S., Long F., Jhala US., Hedrick S., Quinn R., Bauer A., Rudolph D., Schutz G., Yoon C., Puigserver P., Spiegelman B., Montminy M. **CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1.** *Nature.* 2001 Sep; 413(6852): 179-183.
- Hevener AL., He W., Barak Y., Le J., Bandyopadhyay G., Olson P., Wilkes J., Evans RM., Olefsky J. **Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance.** *Nat Med.* 2003 Dec; 9(12): 1491-1497.
- Hirsch D., Stahl A., Lodish HF. **A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul; 95(15): 8625-8629.
- Hirvonen SJ., Santti H., Janne OA., Palvimo JJ. **GC-rich elements flanking the transcription start site govern strong activation on the SNURF gene.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar; 291(4): 897-902.
- Ho SN., Hunt HD., Horton RM., Pullen JK., Pease LR. **Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.** *Gene.* 1989 Apr; 77(1): 51-59.
- Hodny Z., Li R., Barath P., Nelson BD. **Sp1 and chromatin environment are important contributors to the formation of repressive chromatin structures on the transfected human adenine nucleotide translocase-2 promoter.** *Biochem. J.* 2000 Feb; 346(1): 93-97.
- Hoey T., Weinzierl RO., Gill G., Chen JL., Dynlacht BD., Tjian R. **Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators.** *Cell.* 1993 Jan; 72(2): 247-260.
- Hofmann C., Lorenz K., Braithwaite SS., Colca JR., Palazuk BJ., Hotamisligil GS., Spiegelman BM. **Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance.** *Endocrinology.* 1994 Jan; 134(1): 264-270.

BIBLIOGRAFIA

Holloway GP., Bezaire VL., Heigenhauser GJ., Tandon NN., Glatz JF., Luiken JJ., Bonen A., Spriet LL. **Mitochondrial LCFA oxidation, FAT/CD36 content and CPT1 activity in human skeletal muscle during aerobic exercise.** *J. Physiol.* 2006 Feb; 571(1): 201-210.

Holm C., Osterlund T., Laurell H., Contreras JA. **Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis.** *Annu. Rev. Nutr.* 2000; 20: 365-393.

Holst D., Luquet S., Nogueira V., Kristiansen K., Leverve X., Grimaldi PA. **Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle.** *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jul; 1633(1): 43-50.

Hoppel CL., Kerner J., Turkaly P., Turkaly J., Tandler B. **The malonyl-CoA-sensitive form of carnitine palmitoyltransferase is not localized exclusively in the outer membrane of rat liver mitochondria.** *J. Biol. Chem.* 1998 Sep; 273(36): 23495-23503.

Horlein AJ., Naar AM., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass CK., et al. **Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor corepressor.** *Nature.* 1995 Oct; 377(6548): 397-404.

Horton JD., Goldstein JL., Brown MS. **SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver.** *J. Clin. Invest.* 2002 May; 109(9): 1125-1131.

Hostetler HA., Petrescu AD., Kier AB., Schroeder F. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands.** *J Biol Chem.* 2005 May; 280(19): 18667-18682.

Hsu MH., Palmer CN., Song W., Griffin KJ., Johnson EF. **A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding.** *J. Biol. Chem.* 1998 Oct; 273(43): 27988-27997.

Hu L., Deeney JT., Nolan CJ., Peyot ML., Ao A., Richard AM., Luc E., Faergeman NJ., Knudsen J., Guo W., Sorhede-Winzell M., Prentki M., Corkey BE. **Regulation of lipolytic activity by long-chain acyl-coenzyme A in islets and adipocytes.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005 Dec; 289(6): E1085-E1092.

Hu Z., Cha SH., Chohnan S., Lane MD. **Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003 Oct; 100 (22): 12624-12629.

Huang J., Blackwell TK., Kedes L., Weintraub H. **Differences between MyoD DNA binding and activation site requirements revealed by functional random sequence selection.** *Mol Cell Biol.* 1996 Jul; 16(7): 3893-3900.

Huang J., Weintraub H., Kedes L. **Intramolecular regulation of MyoD activation domain conformation and function.** *Mol Cell Biol.* 1998 Sep; 18(9): 5478-5484.

Huizing M., Iacobazzi V., Ijlst L., Savelkoul P., Ruitenbeek W., van den Heuvel L., Indiveri C., Smeitink J., Trijbels F., Wanders R., Palmieri F. **Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA and identification of the molecular defect in a patient.** *Am J Hum Genet.* 1997 Dec; 61(6): 1239-1245.

Huss JM., Kelly DP. **Nuclear receptor signaling and cardiac energetics.** *Circ Res.* 2004 Sep; 95(6): 568-578.

I

Iacobazzi V., Naglieri MA., Stanley CA., Wanders RJ., Palmieri F. **The structure and organization of the human carnitine/acylcarnitine translocase (CACT1) gene2.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 Nov; 252(3): 770-774.

Ibrahimi A., Bonen A., Blinn WD., Hajri T., Li X., Zhong K., Cameron R., Abumrad NA. **Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin.** *J Biol Chem.* 1999 Sep; 274(38): 26761-26766.

BIBLIOGRAFIA

Ibrahimi A., Sfeir Z., Magharaie H., Amri EZ., Grimaldi P., Abumrad NA. **Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr; 93(7): 2646-2651.

Ijpenberg A., Jeannin E., Wahli W., Desvergne B. **Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element.** *J. Biol. Chem.* 1997 Aug; 272(32): 20108-20117.

Indiveri C., Tonazzi A., Palmieri F. **Identification and purification of the carnitine carrier from rat liver mitochondria.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1990 Oct; 1020(1): 81-86.

Indiveri C., Iacobazzi V., Giangregorio N., Palmieri F. **The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins.** *Biochem. J.* 1997 Feb; 321(3): 713-719.

J

Jackson SP., MacDonald JJ., Lees-Miller S., Tjian R. **GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase.** *Cell.* 1990 Oct; 63(1): 155-165.

Jackson VN., Cameron JM., Fraser F., Zammit VA., Price NT. **Use of six chimeric proteins to investigate the role of intramolecular interactions in determining the kinetics of carnitine palmitoyltransferase I isoforms.** *J. Biol. Chem.* 2000a Jun; 275(26): 19560-19566.

Jackson VN., Cameron JM., Zammit VA., Price NT. **Sequencing and functional expression of the malonyl-CoA sensitive carnitine palmitoyltransferase from *Drosophila melanogaster*.** *Biochem. J.* 1999 Aug; 341(3): 483-489.

Jackson VN., Price NT., Zammit VA. **Specificity of the interactions between Glu-3, Ser-24, and Gln-30 within the N-terminal segment of rat liver mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase (L-CPT I) in determining the malonyl-CoA sensitivity of the enzyme.** *Biochemistry.* 2001 Dec; 40(48): 14629-14634.

Jackson VN., Zammit VA., Price NT. **Identification of positive and negative determinants of malonyl-CoA sensitivity and carnitine affinity within the amino termini of rat liver- and muscle-type carnitine palmitoyltransferase I.** *J. Biol. Chem.* 2000b Dec; 275(49): 38410-38416.

Jackson-Hayes L., Song S., Lavrentyev EN., Jansen MS., Hillgartner FB., Tian L., Wood PA., Cook GA., Park EA. **A thyroid hormone response unit formed between the promoter and first intron of the carnitine palmitoyltransferase-lalpha gene mediates the liver-specific induction by thyroid hormone.** *J. Biol. Chem.* 2003 Mar; 278(10): 7964-7972.

Jalouli M., Carlsson L., Ameen C., Linden D., Ljungberg A., Michalik L., Eden S., Wahli W., Oscarsson J. **Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression: influence of pituitary and gonadal hormones.** *Endocrinology.* 2003 Jan; 144(1): 101-109.

Jansen MS., Cook GA., Song S., Park EA. **Thyroid hormone regulates carnitine palmitoyltransferase lalpha gene expression through elements in the promoter and first intron.** *J. Biol. Chem.* 2000 Nov; 275(45): 34989-34997.

Jiang C., Ting AT., Seed B. **PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines.** *Nature.* 1998 Jan; 391(6662): 82-86.

Jin YJ., Li SZ., Zhao ZS., An JJ., Kim RY., Kim YM., Baik JH., Lim SK. **Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) activity stimulation by cerulenin via sympathetic nervous system activation overrides cerulenin's peripheral effect.** *Endocrinology.* 2004 Jul; 145(7): 3197-3204.

Jogl G., Hsiao YS., Tong L. **Structure and function of carnitine acyltransferases.** *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Nov; 1033: 17-29.

Jogl G., Hsiao YS., Tong L. **Crystal structure of mouse carnitine octanoyltransferase and molecular determinants of substrate selectivity.** *J Biol Chem.* 2005 Jan; 280(1): 738-744.

BIBLIOGRAFIA

Jogl G., Tong L. **Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport.** *Cell*. 2003 Jan; 112(1): 113-122.

Johnson TM., Mann WR., Dragland CJ., Anderson RC., Nemecek GM., Bell PA. **Over-expression and characterization of active recombinant rat liver carnitine palmitoyltransferase II using baculovirus.** *Biochem J*. 1995 Jul; 309 (2): 689-693.

Juge-Aubry C., Pernin A., Favez T., Burger AG., Wahli W., Meier CA., Desvergne B. **DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region.** *J. Biol. Chem*. 1997 Oct; 272(40): 25252-25259.

Juge-Aubry CE., Hammar E., Siegrist-Kaiser C., Pernin A., Takeshita A., Chin WW., Burger AG., Meier CA.. **Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain.** *J Biol Chem*. 1999 Apr; 274(15): 10505-10510.

K

Kadonaga JT., Carner KR., Masiarz FR., Tjian R. **Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain.** *Cell*. 1987 Dec; 51(6): 1079-1090.

Kadonaga JT., Courey AJ., Ladika J., Tjian R. **Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation.** *Science*. 1988 Dec; 242(4885): 1566-70.

Kahn BB., Flier JS. **Obesity and insulin resistance.** *J Clin Invest*. 2000 Aug; 106(4): 473-481.

Kallen CB., Lazar MA. **Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996 Jun; 93(12): 5793-5796.

Kamei Y., Ohizumi H., Fujitani Y., Nemoto T., Tanaka T., Takahashi N., Kawada T., Miyoshi M., Ezaki O., Kakizuka A. **PPARGgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct; 100(21): 12378-12383.

Kastner P., Mark M., Leid M., Gansmuller A., Chin W., Grondona JM., Decimo D., Krezel W., Dierich A., Chambon P. **Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice.** *Genes Dev*. 1996 Jan; 10(1): 80-92.

Kausch C., Krutzfeldt J., Witke A., Rettig A., Bachmann O., Rett K., Matthaei S., Machicao F., Haring HU., Stumvoll M. **Effects of troglitazone on cellular differentiation, insulin signaling, and glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan; 280(3): 664-674.

Kaushal S., Schneider JW., Nadal-Ginard B., Mahdavi V. **Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD.** *Science*. 1994 Nov; 266(5188): 1236-1240.

Keller H., Dreyer C., Medin J., Mahfoudi A., Ozato K., Wahli W. **Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1993 Mar; 90(6): 2160-2164.

Kelly LJ., Vicario PP., Thompson GM., Candelore MR., Doebber TW., Ventre J., Wu MS., Meurer R., Forrest MJ., Conner MW., Cascieri MA., Moller DE. **Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression.** *Endocrinology*. 1998 139(12): 4920-4927.

Kerner J., Hoppel C. **Fatty acid import into mitochondria.** *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jun; 1486(1): 1-17.

Kersten S. **Peroxisome proliferator activated receptors and obesity.** *Eur. J. Pharmacol*. 2002 Apr; 440(2-3): 223-234.

Kersten S., Seydoux J., Peters JM., Gonzalez FJ., Desvergne B., Wahli W. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting.** *J. Clin. Invest*. 1999 Jun; 103(11): 1489-1498.

BIBLIOGRAFIA

- Kim DJ., Bility MT., Billin AN., Willson TM., Gonzalez FJ., Peters JM. **PPARbeta/delta selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation.** *Cell Death Differ.* 2006 Jan; 13(1): 53-60.
- Kim EK., Miller I., Aja S., Landree LE., Pinn M., McFadden J., Kuhajda FP., Moran TH., Ronnett GV. **C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase.** *J Biol Chem.* 2004 May; 279(19): 19970-19976.
- Kim EK., Miller I., Landree LE., Borisy-Rudin FF., Brown P., Tihan T., Townsend CA., Witters LA., Moran TH., Kuhajda FP., Ronnett GV. **Expression of FAS within hypothalamic neurons: a model for decreased food intake after C75 treatment.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Nov; 283(5): E867-879.
- Kim JY., Koves TR., Yu GS., Gulick T., Cortright RN., Dohm GL., Muoio DM. **Evidence of a malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase I activity in red skeletal muscle.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 May; 282(5): E1014-1022.
- Kim K., Thu N., Saville B., Safe S. **Domains of estrogen receptor alpha (ERalpha) required for ERalpha/Sp1-mediated activation of GC-rich promoters by estrogens and antiestrogens in breast cancer cells.** *Mol Endocrinol.* 2003 May; 17(5): 804-817.
- Kim KH. **Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase.** *Annu Rev Nutr.* 1997; 17: 77-99.
- Kingston RE. **Transcription control and differentiation: the HLH family, c-myc and C/EBP.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 1989 Dec; 1(6): 1081-1087.
- Kliwer SA., Lenhard JM., Willson TM., Patel I., Morris DC., Lehmann JM. **A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation.** *Cell.* 1995 Dec; 83(5): 813-819.
- Kliwer SA., Sundseth SS., Jones SA., Brown PJ., Wisely GB., Koble CS., Devchand P., Wahli W., Willson TM., Lenhard JM., Lehmann JM. **Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Apr; 94(9): 4318-4323.
- Kliwer SA., Umesono K., Noonan DJ., Heyman RA., Evans RM. **Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors.** *Nature.* 1992 Aug; 358(6389): 771-774.
- Knudsen J., Neergaard TB., Gaigg B., Jensen MV., Hansen JK. **Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling.** *J Nutr.* 2000 Feb;130(2S Suppl): 294S-298S.
- Kolodziej MP., Zammit VA. **Sensitivity of inhibition of rat liver mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA to chemical- and temperature-induced changes in membrane fluidity.** *Biochem J.* 1990 Dec; 272(2): 421-425.
- Kolodziej MP., Zammit VA. **Mature carnitine palmitoyltransferase I retains the N-terminus of the nascent protein in rat liver.** *FEBS Lett.* 1993 Aug; 327(3): 294-296.
- Koo SH., Satoh H., Herzig S., Lee CH., Hedrick S., Kulkarni R., Evans RM., Olefsky J., Montminy M. **PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3.** *Nat Med.* 2004 May; 10(5): 530-534.
- Kraemer FB., Shen WJ. **Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis.** *J. Lipid. Res.* 2002 Oct; 43(10): 1585-1594.
- Kragelund BB., Knudsen J., Poulsen FM. **Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP).** *Biochim Biophys Acta.* 1999 Nov; 1441(2-3): 150-161.
- Krainc D., Bai G., Okamoto S., Carles M., Kusiak JW., Brent RN., Lipton SA. **Synergistic activation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter by myocyte enhancer factor 2C and Sp1.** *J. Biol. Chem.* 1998 Oct; 273(40): 26218-26224.

BIBLIOGRAFIA

Kressler D., Schreiber SN., Knutti D., Kralli A. **The PGC-1-related protein PRC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha.** *J Biol Chem.* 2002 Apr; 277(16): 13918-13925.

Krey G., Braissant O., L'Horsset F., Kalkhoven E., Perroud M., Parker MG., Wahli W. **Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay.** *Mol. Endocrinol.* 1997 Jun; 11(6): 779-791.

Krey G., Keller H., Mahfoudi A., Medin J., Ozato K., Dreyer C., Wahli W. **Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids.** *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1993 Dec; 47(1-6): 65-73.

Krey G., Mahfoudi A., Wahli W. **Functional interactions of peroxisome proliferator-activated receptor, retinoid-X receptor, and Sp1 in the transcriptional regulation of the acyl-coenzyme-A oxidase promoter.** *Mol. Endocrinol.* 1995 Feb; 9(2): 219-231.

Krezel W., Dupe V., Mark M., Dierich A., Kastner P., Chambon P. **RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/RXR gamma -/- mutant mice are viable.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996 Aug; 93(17): 9010-9014.

Krogsdam AM., Nielsen CA., Neve S., Holst D., Helledie T., Thomsen B., Bendixen C., Mandrup S., Kristiansen K. **Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation.** *Biochem J.* 2002 Apr; 363(1): 157-165.

Kuhajda FP., Pizer ES., Li JN., Mani NS., Frehywot GL., Townsend CA. **Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase.** *PNAS.* 2000 Mar; 97(7): 3450-3454.

Kuhajda FP., Jenner K., Wood FD., Hennigar RA., Jacobs LB., Dick JD., Pasternack GR. **Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul; 91(14): 6379-6383.

Kumar MV., Shimokawa T., Nagy TR., Lane MD. **Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice.** *Proc Natl Acad U S A.* 2002 Feb. 99(4): 1921-1925.

L

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 1970 Aug; 227(5259): 680-685.

Landree LE., Hanlon AL., Strong DW., Rumbaugh G., Miller IM., Thupari JN., Connolly EC., Haganir RL., Richardson C., Witters LA., Kuhajda FP., Ronnett GV. **C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism.** *J Biol Chem.* 2004 Jan; 279(5): 3817-3827.

Lapsys NM., Kriketos AD., Lim-Fraser M., Poynten AM., Lowy A., Furler SM., Chisholm DJ., Cooney GJ. **Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000 Nov; 85(11): 4293-4297.

Lassar AB., Buskin JN., Lockshon D., Davis RL., Apone S., Hauschka SD., Weintraub H. **MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer.** *Cell* 1989 Sep; 58(5): 823-831.

Lassar AB., Davis RL., Wright WE., Kadesch T., Murre C., Voronova A., Baltimore D., Weintraub H. **Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo.** *Cell* 1991 Jul; 66(2): 305-315.

Lau P., Nixon SJ., Parton RG., Muscat GE. **RORalpha regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis in skeletal muscle cells: caveolin-3 and CPT-1 are direct targets of ROR.** *J Biol Chem.* 2004 Aug; 279(35): 36828-36840.

Lazarow PB., Fujiki Y. **Biogenesis of peroxisomes.** *Annu Rev Cell Biol.* 1985; 1: 489-530.

BIBLIOGRAFIA

- Lazennec G., Canaple L., Saugy D., Wahli W. **Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators.** *Mol Endocrinol.* 2000 Dec; 14(12): 1962-1975.
- Lee SS., Pineau T., Drago J., Lee EJ., Owens JW., Kroetz DL., Fernandez-Salguero PM., Westphal H., Gonzalez F.J. **Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators.** *Mol. Cell. Biol.* 1995 Jun; 15(6): 3012-3022.
- Lee Y., Nadal-Ginard B., Mahdavi V., Izumo S. **Myocyte-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene.** *Mol Cell Biol.* 1997 May; 17(5): 2745-2755.
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart JC., Staels B. **Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis.** *J Clin Invest.* 2006 Mar; 116(3): 571-580.
- Lehman JJ., Barger PM., Kovacs A., Saffitz JE., Medeiros DM., Kelly DP. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis.** *J. Clin. Invest.* 2000 Oct; 106(7): 847-856.
- Lehmann JM., Moore LB., Smith-Oliver TA., Wilkison WO., Willson TM., Kliewer SA. **An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma).** *J Biol Chem.* 1995 Jun; 270(22): 12953-12956.
- Leibowitz MD., Fievet C., Hennuyer N., Peinado-Onsurbe J., Duez H., Bergera J., Cullinan CA., Sparrow CP., Baffic J., Berger GD., Santini C., Marquis RW., Tolman RL., Smith RG., Moller DE., Auwerx J. **Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice.** *FEBS Lett.* 2000 May; 473(3): 333-336.
- Leifer D., Krainc D., Yu YT., McDermott J., Breitbart RE., Heng J., Neve RL., Kosofsky B., Nadal-Ginard B., Lipton SA. **MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993 Feb; 90(4): 1546-1550.
- Lemberger T., Saladin R., Vazquez M., Assimacopoulos F., Staels B., Desvergne B., Wahli W., Auwerx J.. **Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm.** *J Biol Chem.* 1996 Jan; 271(3): 1764-1769.
- Lemberger T., Staels B., Saladin R., Desvergne B., Auwerx J., Wahli W. **Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids.** *J. Biol. Chem.* 1994 Oct; 269(40): 24527-24530.
- Lemercier C. To RQ., Carrasco RA., Konieczny SF. **The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of MyoD.** *EMBO J.* 1998 Mar; 17(5): 1412-1422.
- Lemercier C., To RQ., Swanson BJ., Lyons GE., Konieczny SF. **Mist1: a novel basic helix-loop-helix transcription factor exhibits a developmentally regulated expression pattern.** *Dev. Biol.* 1997 Feb; 182(1): 101-113.
- Lemon B., Tjian R. **Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control.** *Genes Dev.* 2000 Oct; 14(20): 2551-2569.
- Leonardsson G., Steel JH., Christian M., Pocock V., Milligan S., Bell J., So PW., Medina-Gomez G., Vidal-Puig A., White R., Parker MG. **Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun; 101(22), 8437-8442.
- Leone TC., Weinheimer CJ., Kelly DP. **A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 Jun; 96(13): 7473-7478.
- Leonhardt M., Langhans W. **Fatty acid oxidation and control of food intake.** *Physiol Behav.* 2004 Dec; 83(4): 645-651.
- Letovsky J., Dynan WS. **Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence.** *Nucleic Acids Res.* 1989 Apr; 17(7): 2639-2653.

BIBLIOGRAFIA

- Li L., He S., Sun JM., Davie JR. **Gene regulation by Sp1 and Sp3.** *Biochem Cell Biol.* 2004 Aug; 82(4): 460-471.
- Li R., Knight JD., Jackson SP., Tjian R., Botchan MR. **Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription.** *Cell.* 1991 May; 65(3): 493-505.
- Li L., Heller-Harrison R., Czech M., Olson EN. **Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the activity of myogenic helix-loop-helix proteins.** *Mol. Cell. Biol.* 1992b Oct; 12(10): 4478-4485.
- Li L., Zhou J., James G., Heller-Harrison R., Czech M., Olson EN. **FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domains.** *Cell* 1992a Dec; 71(7): 1181-1194.
- Lim H., Gupta RA., Ma WG., Paria BC., Moller DE., Morrow JD., DuBois RN., Trzaskos JM., Dey SK. **Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta.** *Genes Dev.* 1999 Jun; 13(12): 1561-1574.
- Lin J., Tarr PT., Yang R., Rhee J., Puigserver P., Newgard CB., Spiegelman BM. **PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism.** *J Biol Chem.* 2003 Aug; 278(33): 30843-30848.
- Lin J., Wu H., Tarr PT., Zhang CY., Wu Z., Boss O., Michael LF., Puigserver P., Isotani E., Olson EN., Lowell BB., Bassel-Duby R., Spiegelman BM. **Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres.** *Nature.* 2002b Aug; 418(6899): 797-801.
- Lin J., Yang R., Tarr PT., Wu PH., Handschin C., Li S., Yang W., Pei L., Uldry M., Tontonoz P., Newgard CB., Spiegelman BM. **Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP.** *Cell.* 2005 Jan; 120(2): 261-273.
- Lin J., Puigserver P., Donovan J., Tarr P., Spiegelman BM. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor.** *J. Biol. Chem.* 2002a Jan; 277(3): 1645-1648.
- Lin X., House R., Odle J. **Ontogeny and kinetics of carnitine palmitoyltransferase in liver and skeletal muscle of the domestic felid (Felis domestica).** *J Nutr Biochem.* 2005 Jun; 16(6): 331-338.
- Loftus TM., Jaworsky DE., Frehywot GL., Townsend CA., Ronnett GV., Lane MD., Kuhajda FP. **Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors.** *Science.* 2000 Jun; 288(5475): 2379-2381.
- Lopez-Solache I., Marie V., Camirand A., Silva JE. **Regulation of uncoupling protein-2 mRNA in L6 myotubules: II: Thyroid hormone amplifies stimulation of uncoupling protein-2 gene by thiazolidinediones and other peroxisome proliferator-activated receptor ligands in L6 myotubules: evidence for a priming effect.** *Endocrine.* 2002 Nov; 19(2): 209-217.
- Lopez-Solache I., Marie V., Vignault E., Camirand A., Silva JE. **Regulation of uncoupling protein-2 mRNA in L6 myotubules: I: Thiazolidinediones stimulate uncoupling protein-2 gene expression by a mechanism requiring ongoing protein synthesis and an active mitogen-activated protein kinase.** *Endocrine.* 2002 Nov; 19(2): 197-208.
- Louet JF., Chatelain F., Decaux JF., Park EA., Kohl C., Pineau T., Girard J., Pegorier JP. **Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway.** *Biochem. J.* 2001 Feb; 354(1): 189-197.
- Louet JF., Hayhurst G., Gonzalez FJ., Girard J., Decaux JF. **The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4A and cAMP-response element-binding protein (CREB).** *J. Biol. Chem.* 2002 Oct; 277(41): 37991-38000.
- Louet JF., Le May C., Pegorier JP., Decaux JF., Girard J. **Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids.** *Biochem Soc Trans.* 2001 May; 29(2): 310-316.

BIBLIOGRAFIA

Loviscach M., Rehman N., Carter L., Mudaliar S., Mohadeen P., Ciaraldi TP., Veerkamp JH., Henry RR. **Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action.** *Diabetologia*. 2000 Mar; 43(3): 304-311.

Lu J., Webb R., Richardson JA., Olson EN. **MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan; 96(2): 552-557.

Lu J., McKinsey TA., Nicol RL., Olson EN. **Signal-dependent activation of MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000a Apr; 97(8): 4070-4075.

Lu J., McKinsey TA., Zhang CL., Olson EN. **Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases.** *Mol. Cell*. 2000b Aug; 6(2): 233-244.

Luiken JJ., Koonen DP., Willems J., Zorzano A., Becker C., Fischer Y., Tandon NN., Van Der Vusse GJ., Bonen A., Glatz JF. **Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36.** *Diabetes*. 2002 Oct; 51(10): 3113-3119.

Luquet S., Lopez-Soriano J., Holst D., Fredenrich A., Melki J., Rassoulzadegan M., Grimaldi P.A. **Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability.** *FASEB J*. 2003 Dec; 17(15): 2299-2301.

M

Ma PC., Rould MA., Weintraub H., Pabo CO. **Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation.** *Cell* 1994 May; 77(3): 451-459.

Macleod D., Charlton J., Mullins J., Bird AP. **Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island.** *Genes Dev*. 1994 Oct; 8(19): 2282-2292.

Maeda N., Takahashi M., Funahashi T., Kihara S., Nishizawa H., Kishida K., Nagaretani H., Matsuda M., Komuro R., Ouchi N., Kuriyama H., Hotta K., Nakamura T., Shimomura I., Matsuzawa Y. **PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein.** *Diabetes*. 2001 Sep; 50(9): 2094-2099.

Maitland NJ., McDougall JK. **Biochemical transformation of mouse cells by fragments of herpes simplex virus DNA.** *Cell*. 1977 May; 11(1): 233-241.

Majello B., De Luca P., Lania L. **Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains.** *J. Biol. Chem*. 1997 Feb; 272(7): 4021-4026.

Makimura H., Mizuno TM., Yang XJ., Silverstein J., Beasley J., Mobbs CV. **Cerulein mimics effects of leptin on metabolic rate, food intake, and body weight independent of the melanocortin system, but unlike leptin, cerulein fails to block neuroendocrine effects of fasting.** *Diabetes*. 2001 Apr; 50(4): 733-739.

Mal A., Sturniolo M., Schiltz RL., Ghosh MK., Harter ML. **A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program.** *EMBO J*. 2001 Apr; 20(7): 1739-1753.

Maleki SJ., Royer CA., Hurlburt BK. **MyoD-E12 heterodimers and MyoD-MyoD homodimers are equally stable.** *Biochemistry*. 1997 Jun; 36(22): 6762-6767.

Mandel M., Higa A. **Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.** *J. Mol. Biol*. 1970 Oct; 53(1): 159-162.

Mangelsdorf DJ., Borgmeyer U., Heyman RA., Zhou JY., Ong ES., Oro AE., Kakizuka A., Evans RM. **Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid.** *Genes Dev*. 1992 Mar; 6(3): 329-344.

Mangelsdorf DJ., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans RM. **The nuclear receptor superfamily: the second decade.** *Cell*. 1995 Dec; 83(6): 835-839.

BIBLIOGRAFIA

- Marcus SL., Miyata KS., Zhang B., Subramani S., Rachubinski RA., Capone JP. **Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993 Jun; 90(12): 5723-5727.
- Martin G., Schoonjans K., Lefebvre AM., Staels B., Auwerx J. **Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators.** *J. Biol. Chem.* 1997 Nov; 272(45): 28210-28217.
- Martin G., Schoonjans K., Staels B., Auwerx J. **PPARgamma activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes.** *Atherosclerosis.* 1998 Apr; 137 Suppl: S75-S80.
- Martin JF., Schwarz JJ., Olson EN. **Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jun; 90(11): 5282-5286.
- Martinez-Balbas MA., Bannister AJ., Martin K., Haus-Seuffert P., Meisterernst M., Kouzarides T. **The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription.** *EMBO.* 1998 May; 17(10): 2886-2893.
- Mascaró C., Acosta E., Ortiz JA., Marrero PF., Hegardt FG., Haro D. **Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor.** *J. Biol. Chem.* 1998 Apr; 273(15): 8560-8563.
- Mastrangelo IA., Courey AJ., Wall JS., Jackson SP., Hough PV. **DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991 Jul; 88(13): 5670-5674.
- McDermott JC., Cardoso MC., Yu YT., Andres V., Leifer D., Krainc D., Lipton SA., Nadal-Ginard B. **hMEF2C gene encodes skeletal muscle-and brain-specific transcription factors.** *Mol. Cell. Biol.* 1993 Apr; 13(4): 2564-2577.
- McGarry JD., Brown NF. **The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis.** *J. Biochem.* 1997 Feb; 244(1): 1-14.
- McGarry JD., Foster DW. **Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production.** *Annu. Rev. Biochem.* 1980; 49: 395-420.
- McGarry JD., Mills SE., Long CS., Foster DW. **Observation on the affinity for carnitine and malonyl-CoA sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat.** *Biochem J.* 1983 Jul; 214(1): 21-28.
- McGarry JD., Woeltje KF., Kuwajima M., Foster DW. **Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase.** *Diabetes Metab. Rev.* 1989 May; 5(3): 271-284.
- McGarry JD., Brown NF., Inthanousay PP., Park DI., Cook BA., Foster DW. **Insights into the topography of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase gained from the use of proteases.** *Prog Clin Biol Res.* 1992; 375: 47-61.
- McGarry JD. **Appetite control: Does leptin lighten the problem of obesity?.** *Curr Biol.* 1995 Dec; 5(12): 1342-1344.
- McGarry JD. **Glucose-fatty acid interactions in health and disease.** *Am J Clin Nutr.* 1998 Mar; 67(3 Suppl): 500S-504S.
- McGarry JD. **Malonyl-CoA and satiety? Food for thought.** *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Dec; 11(10): 399-400.
- McKinsey TA., Zhang CL., Lu J., Olson EN. **Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation.** *Nature.* 2000 Nov; 408(6808): 106-111.
- McKinsey TA., Zhang CL., Olson EN. **Control of muscle development by dueling HATs and HDACs.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001 Oct; 11(5): 497-504.

BIBLIOGRAFIA

- McKinsey TA., Zhang CL., Olson EN. **MEF2: a calcium dependent regulator of cell division, differentiation and death.** *Trends Biochem. Sci.* 2002 Jan; 27(1): 40-47.
- McPherson MJ., Quirke P., Taylor GR. **PCR practical approach.** Oxford University Press. New York. 1991.
- Meirhaeghe A., Crowley V., Lenaghan C., Lelliott C., Green K., Stewart A., Hart K., Schinner S., Sethi JK., Yeo G., Brand MD., Cortright RN., O'Rahilly S., Montague C., Vidal-Puig AJ. **Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo.** *Biochem J.* 2003 Jul; 373(1): 155-165.
- Melnikova IN., Bounpheng M., Schatteman GC., Gilliam D., Christy BA. **Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells.** *Exp. Cell Res.* 1999 Feb; 247(1): 94-104.
- Merika M., Orkin SH. **Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF.** *Mol. Cell. Biol.* 1995 May; 15(5): 2437-2447.
- Mersmann HJ., Goodman J., Houk JM., Anderson S. **Studies on the biochemistry of mitochondria and cell morphology in the neonatal swine hepatocyte.** *J Cell Biol.* 1972 May; 53(2): 335-347.
- Michael LF., Wu Z., Cheatham RB., Puigserver P., Adelmant G., Lehman JJ., Kelly DP., Spiegelman BM. **Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar; 98(7): 3820-3825.
- Michalik L., Desvergne B., Basu-Modak S., Tan NS., Wahli W. **Nuclear hormone receptors and mouse skin homeostasis: implication of PPARbeta.** *Horm Res.* 2000; 54(5-6): 263-268.
- Minokoshi Y., Alquier T., Furukawa N., Kim YB., Lee A., Xue B., Mu J., Fougère F., Ferre P., Birnbaum MJ., Stuck BJ., Kahn BB. **AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus.** *Nature.* 2004 Apr; 428(6982): 569-574.
- Miyata KS., McCaw SE., Meertens LM., Patel HV., Rachubinski RA., Capone JP. **Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver-X-receptor alpha.** *Mol Cell Endocrinol.* 1998 Nov; 146(1-2): 69-76.
- Molkentin JD., Black BL., Martin JF., Olson EN. **Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins.** *Cell.* 1995 Dec; 83(7): 1125-1136.
- Molkentin JD., Black BL., Martin JF., Olson EN. **Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C.** *Mol. Cell. Biol.* 1996 Jun; 16(6): 2627-2636.
- Molkentin JD., Olson EN. **Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996a Sep; 93(18): 9366-9373.
- Moller DE. **New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome.** *Nature.* 2001 Dec; 414(6865): 821-827.
- Monden T., Yamada M., Nihei Y., Kishi M., Tomaru T., Ishii S., Hashida T., Shibusawa N., Hashimoto K., Satoh T., Kasai K., Mori M. **Unliganded RXR acts as an inhibitory factor on troglitazone-induced activation.** *Life Sci.* 2004 Dec; 76(7): 731-741.
- Moore ML., Wang GL., Belaguli NS., Schwartz RJ., McMillin JB. **GATA-4 and serum response factor regulate transcription of the muscle-specific carnitine palmitoyltransferase I beta in rat heart.** *J. Biol. Chem.* 2001 Jan 27; 276(2): 1026-1033.
- Moore ML., Park EA., McMillin JB. **Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-I beta expression by PGC-1.** *J Biol Chem.* 2003 May; 278(19): 17263-17268.
- Morillas M., Gomez-Puertas P., Bentebibel A., Selles E., Casals N., Valencia A., Hegardt F.G., Asins G., Serra D. **Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition.** *J. Biol. Chem.* 2003 Mar; 278(11): 9058-9063.

BIBLIOGRAFIA

Morillas M., Gomez-Puertas P., Roca R., Serra D., Asins G., Valencia A., Hegardt FG. **Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity.** *J. Biol. Chem.* 2001 Nov; 276(48): 45001-45008.

Morillas M., Gomez-Puertas P., Rubi B., Clotet J., Arino J., Valencia A., Hegardt FG., Serra D., Asins G. **Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I: mutational analysis of a malonyl-CoA affinity domain.** *J. Biol. Chem.* 2002 Mar; 277(13): 11473-11480.

Morillas M., Lopez-Vinas E., Valencia A., Serra D., Gomez-Puertas P., Hegardt FG., Asins G. **Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal.** *Biochem. J.* 2004 May; 379(3): 777-784.

Mortensen ER., Marks PA., Shiotani A., Merchant JL. **Epidermal growth factor and okadaic acid stimulate Sp1 proteolysis.** *J Biol Chem.* 1997 Jun; 272(26): 16540-16547.

Motojima K., Passilly P., Peters JM., Gonzalez FJ., Latruffe N. **Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner.** *J. Biol. Chem.* 1998 Jul; 273(27): 16710-16704.

Mukherjee R., Jow L., Croston GE., Paterniti JR Jr. **Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists.** *J Biol Chem.* 1997 Mar; 272(12): 8071-8076.

Muoio DM., MacLean PS., Lang DB., Li S., Houmard JA., Way JM., Winegar DA., Corton JC., Dohm GL., Kraus WE. **Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta.** *J Biol Chem.* 2002b Jul; 277(29): 26089-26097.

Muoio DM., Way JM., Tanner CJ., Winegar DA., Kliewer SA., Houmard JA., Kraus WE., Dohm GL. **Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells.** *Diabetes.* 2002a Apr; 51(4): 901-909.

Murakami K., Tobe K., Ide T., Mochizuki T., Ohashi M., Akanuma Y., Yazaki Y., Kadowaki T. **A novel insulin sensitizer acts as a coligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) and PPAR-gamma: effect of PPAR-alpha activation on abnormal lipid metabolism in liver of Zucker fatty rats.** *Diabetes.* 1998 Dec; 47(12): 1841-1847.

Murata Y., Kim HG., Rogers KT., Udvardia AJ., Horowitz JM. **Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain.** *J. Biol. Chem.* 1994 Aug; 269(32): 20674-20681.

Murre C., McCaw PS., Vassin H., Caudy M., Jan LY., Jan CV., Cabrera CV., Buskin JN., Hauschka SD., Lassar AB., Weintraub H., Baltimore D. **Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence.** *Cell* 1989 Aug; 58(3): 537-544.

Murthy MS., Pande SV. **Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes.** *Biochem J.* 1987 Dec; 248(3) 727-733.

Mynatt RL., Park EA., Thorngate FE., Das HK., Cook GA. **Changes in carnitine palmitoyltransferase-I mRNA abundance produced by hyperthyroidism and hypothyroidism parallel changes in activity.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994 Jun; 201(2): 932-937.

N

Nagy L., Kao HY., Chakravarti D., Lin RJ., Hassig CA., Ayer DE., Schreiber SL., Evans RM.. **Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase.** *Cell.* 1997 May; 89(3): 373-380.

BIBLIOGRAFIA

Napal L., Dai J., Treber M., Haro D., Marrero PF., Woldegiorgis G. **A single amino acid change (substitution of the conserved Glu-590 with alanine) in the C-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase I increases its malonyl-CoA sensitivity close to that observed with the muscle isoform of the enzyme.** *J Biol Chem.* 2003 Sep; 278(36): 34084-34089.

Napal L., Marrero PF., Haro D. **An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A.** *J Mol Biol.* 2005 Dec; 354(4): 751-759.

Naya FJ., Olson E. **MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999 Dec; 11(6): 683-688.

Neely JR., Rovetto MJ., Oram JF. **Myocardial utilization of carbohydrate and lipids.** *Prog Cardiovasc Dis.* 1972 Nov-Dec; 15(3): 289-329.

Neuhold LA., Wold B. **HLH forced dimers: tethering MyoD to E47 generates a dominant positive myogenic factor insulated from negative regulation by Id.** *Cell.* 1993 Sep; 74(6): 1033-1042.

Nicot C., Hegardt FG., Woldegiorgis G., Haro D., Marrero PF. **Pig liver carnitine palmitoyltransferase I, with low Km for carnitine and high sensitivity to malonyl-CoA inhibition, is a natural chimera of rat liver and muscle enzymes.** *Biochemistry.* 2001 Feb; 40(7): 2260-2266.

Nolte RT., Wisely GB., Westin S., Cobb JE., Lambert MH., Kurokawa R., Rosenfeld MG., Willson TM., Glass CK., Milburn MV. **Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.** *Nature.* 1998 Sep; 395(6698): 137-143.

Norris AW., Chen L., Fisher SJ., Szanto I., Ristow M., Jozsi AC., Hirshman MF., Rosen ED., Goodyear LJ., Gonzalez FJ., Spiegelman BM., Kahn CR. **Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones.** *J Clin Invest.* 2003 Aug; 112(4): 608-618.

Nurrish SJ., Treisman R. **DNA binding specificity determinants in MADS-box transcription factors.** *Mol. Cell. Biol.* 1995 Aug; 15(8): 4076-4085.

O

Oberfield JL., Collins JL., Holmes CP., Goreham DM., Cooper JP., Cobb JE., Lenhard JM., Hull-Ryde EA., Mohr CP., Blanchard SG., Parks DJ., Moore LB., Lehmann JM., Plunket K., Miller AB., Milburn MV., Kliewer SA., Willson TM. **A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May; 96(11): 6102-6106.

Oberkofler H., Schraml E., Krempler F., Patsch W. **Restoration of sterol-regulatory-element-binding protein-1c gene expression in HepG2 cells by peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha.** *Biochem. J.* 2004 Jul; 381(2): 357-363.

Obici S., Feng Z., Arduini A., Conti R., Rossetti L. **Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production.** *Nat. Med.* 2003 Jun; 9(6): 756-761.

Oishi K., Shirai H., Ishida N. **CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice.** *Biochem J.* 2005 Mar; 386(3): 575-581.

Oleksiak MF., Crawford DL. **5' genomic structure of human Sp3.** *Mol Biol Evol.* 2002 Nov; 19(11): 2026-2029.

Oliver WR.Jr., Shenk JL., Snaith MR., Russell CS., Plunket KD., Bodkin NL., Lewis MC., Winegar DA., Sznaidman ML., Lambert MH., Xu HE., Sternbach DD., Kliewer SA., Hansen BC., Willson TM. **A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001 Apr; 98(9): 5306-5311.

Olson EN., Perry M., Schulz RA. **Regulation of muscle differentiation by the MEF family of MADS box transcription factors.** *Dev. Biol.* 1995 Nov; 172(1): 2-14.

BIBLIOGRAFIA

- Omura S. **The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis.** *Bacteriol Rev.* 1976 Sep; 40(3): 681-697.
- Ono K., Han J. **The p38 signal transduction pathway: activation and function.** *Cell Signal.* 2000 Jan; 12(1): 1-13.
- Ontko JA., Johns ML. **Evaluation of malonyl-CoA in the regulation of long-chain fatty acid oxidation in the liver. Evidence for an unidentified regulatory component of the system.** *Biochem J.* 1980 Dec; 192(3): 959-962.
- Ornatsky OI., McDermott JC. **MEF2 protein expression, DNA binding specificity and complex composition, and transcriptional activity in muscle and non-muscle cells.** *J. Biol. Chem.* 1996 Oct; 271(40): 24927-24933
- Ortiz JA., Mallolas J., Nicot C., Bofarull J., Rodriguez JC., Hegardt FG., Haro D., Marrero PF. **Isolation of pig mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene promoter: characterization of a peroxisome proliferator-responsive element.** *Biochem J.* 1999 Jan; 337(2): 329-335.
- Osada S., Tsukamoto T., Takiguchi M., Mori M., Osumi T. **Identification of an extended half-site motif required for the function of peroxisome proliferator-activated receptor alpha.** *Genes Cells.* 1997 May; 2(5): 315-327.

P

- Palmer CN., Hsu MH., Griffin HJ., Johnson EF. **Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling.** *J. Biol. Chem.* 1995 Jul; 270(27): 16114-16121.
- Park EA., Mynatt RL., Cook GA., Kashfi K. **Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase I.** *Biochem. J.* 1995 Sep; 310(3): 853-858.
- Park EA., Steffen ML., Song S., Park VM., Cook GA. **Cloning and characterization of the promoter for the liver isoform of the rat carnitine palmitoyltransferase I (L-CPTI) gene.** *Biochem. J.* 1998 Feb; 330(1): 217-224.
- Pascal E., Tjian R. **Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism.** *Genes Dev.* 1991 Sep; 5(9): 1646-1656.
- Pauly DF., McMillin JB. **Importance of acyl-CoA availability in interpretation of carnitine palmitoyltransferase I kinetics.** *J Biol Chem.* 1988 Dec; 263(34): 18160-18167.
- Pegorier JP., Chatelain F., Thumelin S., Girard J. **Role of long-chain fatty acids in the postnatal induction of genes coding for liver mitochondrial beta-oxidative enzymes.** *Biochem. Soc. Trans.* 1998 May; 26(2): 113-120.
- Pegorier JP., Duee PH., Assan R., Peret J., Girard J. **Changes in circulating fuels, pancreatic hormones and liver glycogen concentration in fasting or suckling newborn pigs.** *J Dev Physiol.* 1981 Jun; 3(3): 203-217.
- Pegorier JP., Duee PH., Girard J., Peret J. **Metabolic fate of non-esterified fatty acids in isolated hepatocytes from newborn and young pigs. Evidence for a limited capacity for oxidation and increased capacity for esterification.** *Biochem J.* 1983 Apr; 212(1): 93-97.
- Peluso G., Petillo O., Margarucci S., Mingrone G., Greco AV., Indiveri C., Palmieri F., Melone MA., Reda E., Calvani M. **Decreased mitochondrial carnitine translocase in skeletal muscles impairs utilization of fatty acids in insulin-resistant patients.** *Front Biosci.* 2002 May; 7: a109-116.
- Peters JM., Zhou YC., Ram PA., Lee SS., Gonzalez FJ., Waxman DJ. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha required for gene induction by dehydroepiandrosterone-3 beta-sulfate.** *Mol. Pharmacol.* 1996 Jul; 50(1): 67-74.
- Peters JM., Hennuyer N., Staels B., Fruchart JC., Fievet C., Gonzalez FJ., Auwerx J. **Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice.** *J Biol Chem.* 1997 Oct; 272(43): 27307-27312.
- Peters JM., Lee SS., Li W., Ward JM., Gavrilova O., Everett C., Reitman ML., Hudson LD., Gonzalez FJ. **Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta).** *Mol Cell Biol.* 2000 Jul; 20(14): 5119-5128.

BIBLIOGRAFIA

- Philipsen S., Suske G. **A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors.** *Nucleic Acids Res.* 1999 Aug; 27(15): 2991-3000.
- Pineda Torra I., Jamshidi Y., Flavell DM., Fruchart JC., Staels B. **Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element.** *Mol Endocrinol.* 2002 May; 16(5): 1013-1028.
- Poirier H., Niot I., Degrace P., Monnot MC., Bernard A., Besnard P. **Fatty acid regulation of fatty acid-binding protein expression in the small intestine.** *Am. J. Physiol.* 1997 Aug; 273(2:1): G289-G295.
- Polesskaya A., Naguibneva I., Fritsch L., Duquet A., Ait-Si-Ali S., Robin P., Vervisch A., Pritchard LL., Cole P., Harel-Bellan A. **CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle.** *EMBO J.* 2001 Dec; 20(23): 6816-6825.
- Polesskaya A., Duquet A., Naguibneva I., Weise C., Vervisch A., Bengal E., Hucho F., Robin P., Harel-Bellan A. **CREB-binding protein/p300 activates MyoD by acetylation.** *J. Biol. Chem.* 2000 Nov; 275(44): 34359-34364.
- Pollock R., Treisman R. **Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets.** *Genes Dev.* 1991 Dec; 5(12A): 2327-2341.
- Postigo AA., Dean DC. **ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation.** *EMBO J.* 1997 Jul; 16(13): 3935-3943.
- Potter BJ., Stump D., Schwieterman W., Sorrentino D., Jacobs LN., Kiang CL., Rand JH., Berk PD. **Isolation and partial characterization of plasma membrane fatty acid binding proteins from myocardium and adipose tissue and their relationship to analogous proteins in liver and gut.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Nov; 148(3): 1370-1376.
- Powelka AM., Seth A., Virbasius JV., Kiskinis E., Nicoloso SM., Guilherme A., Tang X., Straubhaar J., Cherniack AD., Parker MG., Czech MP. **Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes.** *J Clin Invest.* 2006 Jan; 116(1): 125-136.
- Prentki M., Corkey BE. **Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?** *Diabetes.* 1996 Mar; 45(3): 273-283.
- Prentki M., Vischer S., Glennon MC., Regazzi R., Deeney JT., Corkey BE. **Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion.** *J. Biol. Chem.* 1992 Mar; 267(9): 5802-5810.
- Price NT., van der Leij FR., Jackson VN., Corstorphine C., Thomson R., Sorensen A., Zammit VA. **Novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I.** *Genomics.* 2002 Oct; 80(4): 433-442.
- Price NT., Jackson VN., van der Leij FR., Cameron JM., Travers MT., Bartelds B., Huijkman NC., Zammit VA. **Cloning and expression of the liver and muscle isoforms of ovine carnitine palmitoyltransferase 1: residues within the N-terminus of the muscle isoform influence the kinetic properties of the enzyme.** *Biochem J.* 2003 Jun; 372(3): 871-879.
- Prip-Buus C., Cohen I., Kohl C., Esser V., McGarry JD., Girard J. **Topological and functional analysis of the rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in Saccharomyces cerevisiae.** *FEBS Lett.* 1998 Jun; 429(2): 173-178.
- Puigserver P., Adelmant G., Wu Z., Fan M., Xu J., O'Malley B., Spiegelman BM. **Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking.** *Science.* 1999 Nov; 286(5443): 1368-1371.
- Puigserver P., Spiegelman BM. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator.** *Endocr. Rev.* 2003 Feb; 24(1): 78-90.
- Puigserver P., Wu Z., Park CW., Graves R., Wright M., Spiegelman BM. **A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.** *Cell.* 1998 Mar; 92(6): 829-839.

BIBLIOGRAFIA

Puri PL., Iezzi S., Stiegler P., Chen TT., Schiltz RL., Muscat GE., Giordano A., Kedes L., Wang JY., Sartorelli V. **Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis.** *Mol Cell.* 2001 Oct; 8(4): 885-897.

Puri PL., Avantaggiati ML., Balsano C., Sang N., Graessmann A., Giordano A., Levrero M. **p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription.** *EMBO J.* 1997 Jan; 16(2): 369-383.

Puri PL., Sartorelli V. **Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications.** *J. Cell. Physiol.* 2000 Nov; 185(2): 155-173.

Q

Qi C., Zhu Y., Pan J., Yeldandi AV., Rao MS., Maeda N., Subbarao V., Pulikuri S., Hashimoto T., Reddy JK. **Mouse steroid receptor coactivator-1 is not essential for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb; 96(4): 1585-1590.

R

Rajas F., Gautier A., Bady I., Montano S., Mithieux G. **Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha.** *J. Biol. Chem.* 2002 May; 277(18): 15736-15744.

Ramsay RR., Gandour RD., van der Leij FR. **Molecular enzymology of carnitine transfer and transport.** *Biochim. Biophys. Acta.* 2001 Mar; 1546(1): 21-43.

Randle PJ., Garland PB., Hales CN., Newsholme EA. **The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.** *Lancet.* 1963 Apr; 1: 785-789.

Rasmussen BB., Wolfe RR. **Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle.** *Annu. Rev. Nutr.* 1999; 19: 463-484.

Ray A., Prefontaine KE. **Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan; 91(2): 752-756.

Reddy JK., Mannaerts GP. **Peroxisomal lipid metabolism.** *Annu. Rev. Nutr.* 1994; 14: 343-370.

Rendina AR., Cheng D. **Characterization of the inactivation of rat fatty acid synthase by C75: inhibition of partial reactions and protection by substrates.** *Biochem J.* 2005 Jun; 388(3): 895-903.

Rhee J., Inoue Y., Yoon JC., Puigserver P., Fan M., Gonzalez FJ., Spiegelman BM. **Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003 Apr; 100(7): 4012-4017.

Rhodes SJ., Konieczny SF. **Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family.** *Genes Dev.* 1989 Dec; 3(12B): 2050-2061.

Richieri GV, Kleinfeld AM. **Unbound free fatty acid levels in human serum.** *J Lipid Res.* 1995 Feb; 36(2): 229-240.

Riechmann V., van Cruchten I., Sablitzky F. **The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3.** *Nucleic Acids Res.* 1994 Mar; 22(5): 749-755.

Robinson IN, Zammit VA. **Sensitivity of carnitine acyltransferase I to malonyl-CoA inhibition in isolated rat liver mitochondria is quantitatively related to hepatic malonyl-CoA concentration in vivo.** *Biochem J.* 1982 Jul; 206(1): 177-179.

Robyr D., Wolffe AP., Wahli W. **Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks.** *Mol. Endocrinol.* 2000 Mar; 14(3): 329-347.

Roden M. **How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle.** *News Physiol Sci.* 2004 Jun; 19: 92-96.

BIBLIOGRAFIA

Roder KH., Wolf SS., Schweizer M. **Interaction of Sp1 and NF-Y in the diet-induced regulation of the rat fatty acid synthase (FAS) gene.** *Biochem. Soc. Trans.* 1997 Feb; 25(1): 72S.

Rodgers JT., Lerin C., Haas W., Gygi SP., Spiegelman BM., Puigserver P. **Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1.** *Nature.* 2005 Mar; 434(7029): 113-118.

Rodríguez JC., Gil-Gómez G., Hegardt FG., Haro D. **Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids.** *J. Biol. Chem.* 1994 Jul; 269(29): 18767-18772.

Rohr O., Aunis D., Schaeffer E. **COUP-TF and Sp1 interact and cooperate in the transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in human microglial cells.** *J. Biol. Chem.* 1997 Dec; 272(49): 31149-31155.

Ronnett GV., Kim EK., Landree LE., Tu Y. **Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment.** *Physiol Behav.* 2005 May; 85(1): 25-35.

Roos MD., Su K., Baker JR., Kudlow JE. **O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions.** *Mol Cell Biol.* 1997 Nov; 17(11): 6472-6480.

Ruderman N., Prentki M. **AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome.** *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Apr; 3(4): 340-351.

Ruderman NB., Saha AK., Vavvas D., Witters LA. **Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance.** *Am J Physiol.* 1999 Jan; 276(1:1): E1-E18.

Rudge TL., Johnson LF. **Synergistic activation of the TATA-less mouse thymidylate synthase promoter by the Ets transcription factor GABP and Sp1.** *Exp Cell Res.* 2002 Mar; 274(1): 45-55.

Rufer AC., Thoma R., Benz J., Stihle M., Gsell B., De Roo E., Banner DW., Mueller F., Chomienne O., Hennig M. **The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment.** *Structure.* 2006 Apr; 14(4): 713-723.

Russell DL., Doyle KM., Gonzales-Robayna I., Pipaon C., Richards JS. **Egr-1 induction in rat granulosa cells by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: combinatorial regulation by transcription factors cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulatory element binding protein, serum response factor, sp1, and early growth response factor-1.** *Mol Endocrinol.* 2003 Apr; 17(4): 520-533.

Ryu H., Lee J., Olofsson BA., Mwidau A., Deodeoglu A., Escudero M., Flemington E., Azizkhan-Clifford J., Ferrante RJ., Ratan RR. **Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Apr; 100(7): 4281-4286.

Ryu MH., Daily JW. 3rd, Cha YS. **Effect of starvation on hepatic acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase-I, and acetyl-CoA carboxylase mRNA levels in rats.** *Nutrition.* 2005 Apr; 21(4): 537-542.

S

Sack MN., Disch DL., Rockman HA., Kelly DP. **A role for Sp and nuclear receptor transcription factors in a cardiac hypertrophic growth program.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Jun; 94(12): 6438-6443.

Sack MN., Rader TA., Park S., Bastin J., McCune SA., Kelly DP. **Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart.** *Circulation.* 1996 Dec; 94(11): 2837-2842.

Saha AK., Laybutt DR., Dean D., Vavvas D., Sebokova E., Ellis B., Klimes I., Kraegen EW., Shafir E., Ruderman NB. **Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo.** *Am J Physiol.* 1999 Jun; 276(6:1): E1030-E1037.

BIBLIOGRAFIA

- Saiki RK., Gelfand DH., Stoffel S., Scharf SJ., Higuchi R., Horn GT., Mullis KB., Erlich HA. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science*. 1988 Jan; 239(4839): 487-491.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. **Molecular cloning: A Laboratory manual.** 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- Sandouk T., Reda D., Hofmann C. **Antidiabetic agent pioglitazone enhances adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells.** *Am J Physiol*. 1993 Jun; 264(6:1): C1600-C1608.
- Santalucia T., Moreno H., Palacin M., Yacoub MH., Brand NJ., Zorzano A. **A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription.** *J Mol Biol*. 2001 Nov; 314(2): 195-204.
- Sapetschnig A., Rischitor G., Braun H., Doll A., Schergaut M., Melchior F., Suske G. **Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1.** *EMBO J*. 2002 Oct; 21(19): 5206-5215.
- Sartorelli V., Huang J., Hamamori Y., Kedes L. **Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C.** *Mol. Cell. Biol*. 1997 Feb; 17(2): 1010-1026.
- Sato O., Kuriki C., Fukui Y., Motojima K. **Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands.** *J. Biol. Chem*. 2002 May; 277(18): 15703-15711.
- Savage DB., Agostini M., Barroso I., Gurnell M., Luan J., Meirhaeghe A., Harding AH., Ihrke G., Rajanayagam O., Soos MA., George S., Berger D., Thomas EL., Bell JD., Meeran K., Ross RJ., Vidal-Puig A., Wareham NJ., O'Rahilly S., Chatterjee VK., Schafer AJ. **Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree.** *Nat Genet*. 2002 Aug; 31(4): 379-384.
- Savage DB., Tan GD., Acerini CL., Jebb SA., Agostini M., Gurnell M., Williams RL., Umpleby AM., Thomas EL., Bell JD., Dixon AK., Dunne F., Boiani R., Cinti S., Vidal-Puig A., Karpe F., Chatterjee VK., O'Rahilly S. **Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.** *Diabetes*. 2003 Apr; 52(4): 910-917.
- Schafer G., Cramer T., Suske G., Kemmner W., Wiedenmann B., Hocker M. **Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1- and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements.** *J. Biol. Chem*. 2003 Mar; 278(10): 8190-8198.
- Schaffer JE., Lodish HF. **Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein.** *Cell*. 1994 Nov; 79(3): 427-436.
- Schaffer JE. **Fatty acid transport: the roads taken.** *Am. J. Physiol*. 2002 Feb; 282(2): E239-E246.
- Schmidt I., Herpin P. **Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) activity and its regulation by malonyl-CoA are modulated by age and cold exposure in skeletal muscle mitochondria from newborn pigs.** *J Nutr*. 1998 May; 128(5): 886-893.
- Schoonjans K., Staels B., Auwerx J. **Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression.** *J Lipid Res*. 1996 May; 37(5): 907-925.
- Schoonjans K., Peinado-Onsurbe J., Lefebvre A.M., Heyman RA., Briggs M., Deeb S., Staels B., Auwerx J. **PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene.** *EMBO J*. 1996 Oct; 15(19): 5336-5348.
- Schoonjans K., Watanabe M., Suzuki H., Mahfoudi A., Krey G., Wahli W., Grimaldi P., Staels B., Yamamoto T., Auwerx J. **Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter.** *J. Biol. Chem*. 1995 Aug; 270(33): 19269-19276.
- Schwartz MW. **Biomedicine. Staying slim with insulin in mind.** *Science*. 2000 Sep; 289(5487): 2066-2067.

BIBLIOGRAFIA

- Schwarz JJ., Chakraborty T., Martin J., Zhou J., Olson EN. **The basic region of myogenin cooperates with two transcription activation domains to induce muscle-specific transcription.** *Mol. Cell. Biol.* 1992 Jan; 12(1): 266-275.
- Sekoguchi E., Sato N., Yasui A., Fukada S., Nimura Y., Aburatani H., Ikeda K., Matsuura A. **A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting.** *J. Biol. Chem.* 2003 Oct; 278(40): 38796-38802.
- Semple RK., Chatterjee VK., O'Rahilly S. **PPAR gamma and human metabolic disease.** *J Clin Invest.* 2006 Mar; 116(3): 581-589.
- Serra D., Asins G., Hegardt FG. **Ketogenic mitochondrial 3-hydroxy 3-methylglutaryl-CoA synthase gene expression in intestine and liver of suckling rats.** *Arch Biochem Biophys.* 1993 Mar; 301(2): 445-448.
- Sfeir Z., Ibrahimi A., Amri E., Grimaldi P., Abumrad N. **Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport.** *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 1997 Jul; 57(1): 17-21.
- Shalev A., Siegrist-Kaiser CA., Yen PM., Wahli W., Burger AG., Chin WW., Meier CA. **The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin.** *Endocrinology.* 1996 Oct; 137(10): 4499-4502.
- Sher T., Yi HF., McBride OW., Gonzalez FJ. **cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor.** *Biochemistry.* 1993 Jun; 32(21): 5598-5604.
- Shi J., Zhu H., Arvidson DN., Cregg JM., Woldegiorgis G. **Deletion of the conserved first 18 N-terminal amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA sensitivity and binding.** *Biochemistry.* 1998 Aug; 37(31): 11033-11038.
- Shi J., Zhu H., Arvidson DN., Woldegiorgis G. **A single amino acid change (substitution of glutamate 3 with alanine) in the N-terminal region of rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA inhibition and high affinity binding.** *J. Biol. Chem.* 1999 Apr 27; 274(14): 9421-9426.
- Shi J., Zhu H., Arvidson DN., Woldegiorgis G. **The first 28 N-terminal amino acid residues of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I are essential for malonyl-CoA sensitivity and high affinity binding.** *Biochemistry.* 2000 Feb; 39(4): 712-717.
- Shi Y., Downes M., Xie W., Kao HY., Ordentlich P., Tsai CC., Hon M., Evans RM. **Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation.** *Genes Dev.* 2001 May; 15(9): 1140-1151.
- Shi Y, Hon M, Evans RM. **The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar; 99(5): 2613-2618.
- Shibata T., Matsui K., Nagao K., Shinkai H., Yonemori F., Wakitani K. **Pharmacological profiles of a novel oral antidiabetic agent, JTT-501, an isoxazolidinedione derivative.** *Eur. J. Pharmacol.* 1999 Jan; 364(2-3): 211-219.
- Shigekawa K., Dower WJ. **Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells.** *Biotechniques.* 1988 Sep; 6(8): 742-751.
- Shimokawa T., Kumar MV., Lane MD. **Effect of fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan; 99(1): 66-71.
- Shou Y., Baron S., Poncz M. **An Sp1-binding silencer element is a critical negative regulator of the megakaryocyte-specific α IIb gene.** *J Biol Chem.* 1998 Mar; 273(10): 5716-5726.
- Shulman GI. **Cellular mechanisms of insulin resistance.** *J Clin Invest.* 2000 Jul; 106(2):171-176.
- Schwarz JJ., Chakraborty T., Martin J., Zhou JM., Olson EN. **The basic region of myogenin cooperates with two transcription activation domains to induce muscle-specific transcription.** *Mol Cell Biol.* 1992 Jan; 12(1): 266-275.

BIBLIOGRAFIA

- Sidossis LS., Stuart CA., Shulman GI., Lopaschuk GD., Wolfe RR. **Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria.** *J Clin Invest.* 1996 Nov; 98(10): 2244-2250.
- Smale ST. **Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1997 Mar; 1351(1-2): 73-88.
- Smale ST., Kadonaga JT. **The RNA polymerase II core promoter.** *Annu. Rev. Biochem.* 2003; 72: 449-479.
- Smith AG., Muscat GE. **Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Oct; 37(10): 2047-2063.
- Solanes G., Pedraza N., Iglesias R., Giralt M., Villarroya F. **Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription.** *Mol Endocrinol.* 2003 Oct; 17(10): 1944-1958.
- Solanes G., Pedraza N., Iglesias R., Giralt M., Villarroya F. **The human uncoupling protein-3 gene promoter requires MyoD and is induced by retinoic acid in muscle cells.** *FASEB J.* 2000 Nov; 14(14): 2141-2143.
- Solomin L., Johansson CB., Zetterstrom RH., Bissonnette RP., Heyman RA., Olson L., Lendahl U., Frisen J., Perlmann T. **Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord.** *Nature.* 1998 Sep; 395(6700): 398-402.
- Son C., Hosoda K., Matsuda J., Fujikura J., Yonemitsu S., Iwakura H., Masuzaki H., Ogawa Y., Hayashi T., Itoh H., Nishimura H., Inoue G., Yoshimasa Y., Yamori Y., Nakao K. **Up-regulation of uncoupling protein 3 gene expression by fatty acids and agonists for PPARs in L6 myotubes.** *Endocrinology.* 2001 Oct; 142(10): 4189-4194.
- Song S., Zhang Y., Ma K., Jackson-Hayes L., Lavrentyev EN., Cook GA., Elam MB., Park EA. **Peroxisomal proliferator activated receptor gamma coactivator (PGC-1alpha) stimulates carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1alpha) through the first intron.** *Biochim. Biophys. Acta.* 2004 Aug; 1679(2): 164-173.
- Spengler ML., Brattain MG. **Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription.** *J Biol Chem.* 2006 Mar; 281(9): 5567-5574.
- Spicer DB., Rhee J., Cheung WL., Lassar AB. **Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist.** *Science.* 1996 Jun; 272(5267): 1476-1480.
- Spiegelman BM., Flier JS. **Obesity and the regulation of energy balance.** *Cell.* 2001 Feb; 104(4): 531-543.
- Stahl A., Evans JG., Pattel S., Hirsch D., Lodish HF. **Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes.** *Dev Cell.* 2002 Apr; 2(4): 477-488.
- Stahl A., Gimeno RE., Tartaglia LA., Lodish HF. **Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family.** *Trends. Endocrinol. Metab.* 2001 Aug; 12(6): 266-273.
- Steffen ML., Harrison WR., Elder FF., Cook GA., Park EA. **Expression of the rat liver carnitine palmitoyltransferase I gene is regulated by Sp1 and nuclear factor Y: chromosomal localization and promoter characterization.** *Biochem. J.* 1999 Jun; 340(2): 425-432.
- Steineger HH., Sorensen HN., Tugwood JD., Skrede S., Spydevold O., Gautvik KM. **Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription.** *Eur. J. Biochem.* 1994 Nov; 225(3): 967-974.
- Stoner M., Wormke M., Saville B., Samudio I., Qin C., Abdelrahim M., Safe S. **Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins.** *Oncogene.* 2004 Feb; 23(5): 1052-1063.

BIBLIOGRAFIA

St-Pierre J., Lin J., Krauss S., Tarr PT., Yang R., Newgard CB., Spiegelman BM. **Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells.** *J Biol Chem.* 2003 Jul; 278(29): 26597-26603.

Stremmel W., Strohmeyer G., Berk PD. **Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun; 83(11): 3584-3588.

Stremmel W., Strohmeyer G., Borchard F., Kochwa S., Berk PD. **Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Jan; 82(1): 4-8.

Stremmel W., Theilmann L. **Selective inhibition of long-chain fatty acid uptake in short-term cultured rat hepatocytes by an antibody to the rat liver plasma membrane fatty acid-binding protein.** *Biochim Biophys Acta.* 1986 Jun; 877(1): 191-197.

Stremmel W. **Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein.** *J Clin Invest.* 1988 Dec; 82(6): 2001-2010.

Su K., Roos MD., Yang X., Han I., Paterson AJ., Kudlow JE. **An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation in vitro.** *J. Biol. Chem.* 1999 May; 274(21): 15194-15202.

Su W, Jackson S, Tjian R, Echols H. **DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1.** *Genes Dev.* 1991 May; 5(5): 820-826.

Sugawara A., Uruno A., Kudo M., Ikeda Y., Sato K., Taniyama Y., Ito S., Takeuchi K. **Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via an interaction with Sp1 in vascular smooth muscle cells.** *J. Biol. Chem.* 2002 Mar; 277(12): 9676-9683.

Sun JM., Chen HY., Moniwa M., Litchfield DW., Seto E., Davie JR. **The transcriptional repressor Sp3 is associated with CK2-phosphorylated histone deacetylase 2.** *J. Biol. Chem.* 2002 Sep; 277(39): 35783-35786.

Sun XH., Copeland NG., Jenkins NA., Baltimore D. **Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins.** *Mol. Cell. Biol.* 1991 Nov; 11(11): 5603-5611.

Suske G. **The Sp-family of transcription factors.** *Gene.* 1999 Oct; 238(2): 291-300.

Suzuki T., Kimura A., Nagai R., Horikoshi M. **Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding.** *Genes Cells.* 2000 Jan; 5(1): 29-41.

Swanson ST., Foster DW., McGarry JD., Brown NF. **Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: Insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues.** *Biochem. J.* 1998 Nov; 335(3): 513-519.

T

Taegtmeier H., Overturf ML. **Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit.** *Hypertension.* 1988 May; 11(5): 416-426.

Takahara T., Kanazu SI., Yanagisawa S., Akanuma H. **Heterogeneous Sp1 mRNAs in human HepG2 cells include a product of homotypic trans-splicing.** *J Biol Chem.* 2000 Dec; 275(48): 38067-38072.

Tanaka T., Yamamoto J., Iwasaki S., Asaba H., Hamura H., Ikeda Y., Watanabe M., Magoori K., Ioka R.X., Tachibana K., Watanabe Y., Uchiyama Y., Sumi K., Iguchi H., Ito S., Doi T., Hamakubo T., Naito M., Auwerx J., Yanagisawa M., Kodama T., Sakai J. **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003 Dec; 100(26): 15924-15929.

Tanese N., Saluja D., Vassallo MF., Chen JL., Admon A. **Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIIID complex: hTAFII130 and hTAFII100.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Nov; 93(24): 13611-13616.

BIBLIOGRAFIA

Taylor EB., Lamb JD., Hurst RW., Chesser DG., Ellingson WJ., Greenwood LJ., Porter BB., Herway ST., Winder WW. **Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1alpha protein abundance: effects of time and intensity.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Dec; 289(6): E960-E968.

Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T, Tabata I. **Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1alpha protein expression in rat skeletal muscle.** *Acta Physiol Scand.* 2005 May; 184(1): 59-65.

Thayer MJ., Tapscott SJ., Davis RL., Wright WE., Lasar AB., Weintraub H. **Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1.** *Cell.* 1989 Jul; 58(2): 241-248.

Thumelin S., Esser V., Charvy D., Kolodziej VA., Zammit VA., McGarry JD., Girard J., Pégrier JP. **Expression of liver carnitine palmitoyltransferase I and II genes during development in the rat.** *Biochem. J.* 1994 Jun; 300 (2): 583-587.

Thupari JN., Landree LE., Ronnett GV., Kuhajda FP. **C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul; 99(14): 9498-9502.

Thupari JN., Kim EK., Moran TH., Ronnett GV., Kuhajda FP. **Chronic C75 treatment of diet-induced obese mice increases fat oxidation and reduces food intake to reduce adipose mass.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Jul; 287(1): E97-E104.

Tontonoz P., Hu E., Graves R., Budavari AI., Spiegelman BM. **mPPARgamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer.** *Genes. Dev.* 1994a May; 8(10): 1224-1234.

Tontonoz P., Hu E., Spiegelman BM. **Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPARgamma 2, a lipid activated transcription factor.** *Cell.* 1994b Dec; 79(7): 1147-1156.

Treber M., Dai J., Woldegiorgis G. **Identification by mutagenesis of conserved arginine and glutamate residues in the C-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase I that are important for catalytic activity and malonyl-CoA sensitivity.** *J. Biol. Chem.* 2003 Mar; 278(13): 11145-11149.

Tu Y., Thupari JN., Kim EK., Pinn ML., Moran TH., Ronnett GV., Kuhajda FP. **C75 alters central and peripheral gene expression to reduce food intake and increase energy expenditure.** *Endocrinology.* 2005 Jan; 146(1): 486-493.

Tugwood JD., Issemann I., Anderson RG., Bundell KR., McPheat WL., Green S. **The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene.** *EMBO J.* 1992 Feb; 11(2): 433-439.

Turcotte LP., Richter EA., Kiens B. **Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans.** *Am. J. Physiol.* 1992 Jun; 262 (6:1): E791-E799.

Turcotte LP., Srivastava AK., Chiasson JL. **Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABPpm) in red skeletal muscle.** *Mol. Cell. Biochem.* 1997 Jan; 166(1-2):153-158.

Turcotte LP., Swenberger JR., Tucker MZ., Yee AJ., Trump G., Luiken JJ., Bonen A. **Muscle palmitate uptake and binding are saturable and inhibited by antibodies to FABP(PM).** *Mol Cell Biochem.* 2000 Jul; 210(1-2): 53-63.

U

Umesono K., Murakami KK., Thompson CC., Evans RM. **Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors.** *Cell.* 1991 Jun; 65(7): 1255-1266.

V

Van Bilsen M., Van der Vusse GJ., Gilde AJ., Lindhout M., Van der Lee KA. **Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression.** *Mol Cell Biochem.* 2002 Oct; 239(1-2): 131-138.

BIBLIOGRAFIA

Van der Lee KA., Vork MM., De Vries JE., Willemsen PH., Glatz JF., Reneman RS., Van der Vusse GJ., Van Bilsen M. **Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes.** *J. Lipid Res.* 2000 Jan; 41(1): 41-47.

Van der Leij FR., Kram A.M., Bartelds B., Roelofsen H., Smid GB., Takens J., Zammit VA., Kuipers JR. 1999 **Cytological evidence that the C-terminus of carnitine palmitoyltransferase I is on the cytosolic face of the mitochondrial outer membrane.** *Biochem. J.* 1999 Aug; 341(3): 777-784.

Van der Leij FR., Takens J., Van der Veen AY., Terpstra P., Kuipers JR. **Localization and intron usage analysis of the human CPT1B gene for muscle type carnitine palmitoyltransferase I.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1997 May; 1352(2): 123-128.

Van der Leij FR., Cox KB., Jackson VN., Huijkman NC., Bartelds B., Kuipers JR., Dijkhuizen T., Terpstra P., Wood PA., Zammit VA., Price NT. **Structural and functional genomics of the CPT1B gene for muscle-type carnitine palmitoyltransferase I in mammals.** *J Biol Chem.* 2002 Jul; 277(30): 26994-27005.

Van der Leij FR., Huijkman NC., Boomsma C., Kuipers JR., Bartelds B. **Genomics of the human carnitine acyltransferase genes.** *Mol Genet Metab.* 2000 Sep-Oct; 71(1-2): 139-153.

Veerkamp JH., van Kuppevelt TH., Maatman RG., Prinsen CF. **Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid-binding proteins.** *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 1993 Dec; 49(6): 887-906.

Vega RB., Huss JM., Kelly DP. **The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes.** *Mol. Cell. Biol.* 2000 Mar; 20(5): 1868-1876.

Verderio E., Cavadini P., Montermini L., Wang H., Lamantea E., Finocchiaro G., DiDonato S., Gellera C., Taroni F. **Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterization of two novel disease-causing mutations.** *Hum Mol Genet.* 1995 Jan; 4(1): 19-29.

Vidal-Puig A., Jimenez-Linan M., Lowell BB., Hamann A., Hu E., Spiegelman B., Flier JS., Moller DE. **Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents.** *J. Clin. Invest.* 1996 Jun; 97(11): 2553-2561.

Vidal-Puig AJ., Considine RV., Jimenez-Linan M., Werman A., Pories WJ., Caro JF., Flier JS. **Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids.** *J. Clin. Invest.* 1997 May; 99(10): 2416-2422.

Viggiano L., Iacobazzi V., Marzella R., Cassano C., Rocchi M., Palmieri F. **Assignment of the carnitine/acylcarnitine translocase gene (CACT) to human chromosome band 3p21.31 by in situ hybridization.** *Cytogenet. Cell. Genet.* 1997; 79(1-2): 62-63.

Vogelstein B., Gillespie D. **Preparative and analytical purification of DNA from agarose.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979 Feb; 76(2): 615-619.

W

Wakil SJ. **Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme.** *Biochemistry.* 1989 May; 28(11): 4523-4530.

Wallberg AE., Yamamura S., Malik S., Spiegelman BM., Roeder RG. **Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha.** *Mol Cell.* 2003 Nov; 12(5): 1137-1149.

Wan YJ., An D., Cai Y., Repa JJ., Hung-Po Chen T., Flores M., Postic C., Magnuson MA., Chen J., Chien KR., French S., Mangelsdorf DJ., Sucov HM. **Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver.** *Mol. Cell. Biol.* 2000a Jun; 20(12): 4436-4444.

Wan YJ., Cai Y., Lungo W., Fu P., Locker J., French S., Sucov HM. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated pathways are altered in hepatocyte-specific retinoid X receptor alpha-deficient mice.** *J. Biol. Chem.* 2000b Sep; 275(36): 28285-28290.

BIBLIOGRAFIA

- Wang D., Harrison W., Buja LM., Elder FF., McMillin JB. **Genomic DNA sequence, promoter expression, and chromosomal mapping of rat muscle carnitine palmitoyltransferase I.** *Genomics*. 1998 Mar; 48(3): 314-323.
- Wang GL., Moore ML., McMillin JB. **A region in the first exon/intron of rat carnitine palmitoyltransferase I beta is involved in enhancement of basal transcription.** *Biochem J*. 2002 Mar; 362(3): 609-618.
- Wang YX., Lee CH., Tjep S., Yu RT., Ham J., Kang H., Evans RM. **Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity.** *Cell*. 2003 Apr; 113(2): 159-170.
- Wang YX., Zhang CL., Yu RT., Cho HK., Nelson MC., Bayuga-Ocampo CR., Ham J., Kang H., Evans RM. **Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta.** *PLoS Biol*. 2004 Oct; 2(10): e294.
- Waterham HR., Digan ME., Koutz ME., Lair SV., Cregg JM. **Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter.** *Gene*. 1997 Feb; 186(1): 37-44.
- Watkins PA. **Fatty acid activation.** *Prog. Lipid Res*. 1997 Mar; 36(1): 55-83.
- Weintraub H., Davis R., Tapscott S., Thayer M., Krause M., Benezra R., Blackwell TK., Turner D., Rupp R., Hollenberg S., Zhuang Y., Lassar A. **The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage.** *Science*. 1991a Feb; 251(4995): 761-766.
- Weintraub H., Dwarki V.J., Verma I., Davis R., Hollenberg S., Snider L., Lassar A., Tapscott SJ. **Muscle-specific transcriptional activation by MyoD.** *Genes Dev*. 1991b Aug; 5(8): 1377-1386.
- Weintraub H., Genetta T., Kadash T. **Tissue-specific gene activation by MyoD: determination of specificity by cis-acting repression elements.** *Genes Dev*. 1994 Sep; 8(18): 2203-2211.
- Weis BC., Cowan AT., Brown N., Foster DW., McGarry JD. **Use of a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart. Evidence that the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme.** *J. Biol. Chem*. 1994b Oct; 269(42): 26443-26448.
- Weis BC., Esser V., Foster DW., McGarry JD. **Rat heart expresses two isoforms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. The minor component is identical to the liver enzyme.** *J. Biol. Chem*. 1994a Jul; 269(29): 18712-18715.
- Weis L., Reinberg D. **Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins.** *Mol Cell Biol*. 1997 Jun; 17(6): 2973-2984.
- Wende AR., Huss JM., Schaeffer PJ., Giguere V., Kelly DP. **PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism.** *Mol Cell Biol*. 2005 Dec; 25(24): 10684-94.
- Wigler M., Silverstein S., Lee S.L., Pellicer A., Chen VC., Axel R. **Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells.** *Cell*. 1977 May; 11(1): 223-232.
- Willson TM., Brown PJ., Sternbach DD., Henke BR. **The PPARs: from orphan receptors to drug discovery.** *J. Med. Chem*. 2000 Feb; 43(4): 527-550.
- Woeltje KF., Esser V., Wies BC., Sen A., Cox WF., McPhaul MJ., Slaughter CA., Foster DW., McGarry JD. **Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase II.** *J. Biol. Chem*. 1990a Jun; 265(18): 10720-10725.
- Woeltje KF., Kuwajima M., Foster DW., McGarry JD. **Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. II. Use of detergents and antibodies.** *J. Biol. Chem*. 1987 Jul; 262(20): 9822-9827.

BIBLIOGRAFIA

Woeltje KF., Esser V., Weis BC., Cox WF., Schroeder JG., Liao ST., Foster DW., McGarry JD. **Inter-tissue and inter-species characteristics of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system.** *J Biol Chem.* 1990b Jun; 265(18): 10714-10719.

Wolfgang MJ., Kurama T., Dai Y., Suwa A., Asaumi M., Matsumoto S., Cha SH., Shimokawa T., Lane MD. **The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May; 103(19): 7282-7287.

Wolfrum C., Stoffel M. **Coactivation of Foxa2 through Pgc-1beta promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion.** *Cell Metab.* 2006 Feb; 3(2): 99-110.

Wolfrum C., Borrmann CM., Borchers T., Spener F. **Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001 Feb; 98(5): 2323-2328.

Wright HM., Clish CB., Mikami T., Hauser S., Yanagi K., Hiramatsu R., Serhan CN., Spiegelman BM. **A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation.** *J Biol Chem.* 2000 Jan; 275(3): 1873-1877.

Wright WE., Sassoon DA., Lin VK. **Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD.** *Cell.* 1989 Feb; 56(4): 607-617.

Wu D., Govindasamy L., Lian W., Gu Y., Kukar T., Agbandje-McKenna M., McKenna R. **Structure of human carnitine acetyltransferase. Molecular basis for fatty acyl transfer.** *J Biol Chem.* 2003 Apr; 278(15): 13159-13165.

Wu Z., Puigserver P., Andersson U., Zhang C., Adelmant G., Mootha V., Troy A., Cinti S., Lowell B., Scarpulla RC., Spiegelman BM. **Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1.** *Cell.* 1999 Jul; 98(1): 115-124.

X

Xing G, Zhang L, Zhang L, Heynen T, Yoshikawa T, Smith M, Weiss S, Detera-Wadleigh S. **Rat PPAR delta contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Dec; 217(3): 1015-1025.

Xu HE., Lambert MH., Montana VG., Parks DJ., Blanchard SG., Brown PJ., Sternbach DD., Lehmann JM., Wisely GB., Willson TM., Kliewer SA., Milburn MV. **Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors.** *Mol. Cell.* 1999a Mar; 3(3): 397-403.

Xu HE., Lambert MH., Montana VG., Plunket KD., Moore LB., Collins JB., Oplinger JA., Kliewer SA., Gampe RT., McKee DD., Moore JT., Wilson TM. **Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors.** *Proc.Nat.Acad.Sci. USA.* 2001 Nov; 98(24): 13919-13924.

Xu L., Glass CK., Rosenfeld MG. **Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999b Apr; 9(2): 140-147.

Y

Yamazaki N., Shinohara Y., Kajimoto K., Shindo M., Terada H. **Novel expression of equivocal messages containing both regions of choline/ethanolamine kinase and muscle type carnitine palmitoyltransferase I.** *J Biol Chem.* 2000 Oct; 275(41): 31739-31746.

Yamazaki N., Shinohara Y., Shima A., Terada H. **High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone.** *FEBS Lett.* 1995 Apr; 363(1-2): 41-45.

Yamazaki N., Shinohara Y., Shima A., Yamanaka Y., Terada H. **Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1996 Jun; 1307(2): 157-161.

BIBLIOGRAFIA

- Yamazaki N., Yamanaka Y., Hashimoto Y., Shinohara Y., Shima A., Tereda H. **Structural features of the gene encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I.** *FEBS Lett.* 1997 Jun; 409(3): 401-406.
- Yang N., Kays JS., Skillman TR., Burris L., Seng TW., Hammond C. **C75 [4-methylene-2-octyl-5-oxo-tetrahydrofuran-3-carboxylic acid] activates carnitine palmitoyltransferase-1 in isolated mitochondria and intact cells without displacement of bound malonyl CoA.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Jan; 312(1): 127-133.
- Yang WS., Jeng CY., Wu TJ., Tanaka S., Funahashi T., Matsuzawa Y., Wang JP., Chen CL., Tai TY., Chuang LM. **Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients.** *Diabetes Care.* 2002 Feb; 25(2): 376-380.
- Yang X., Su K., Roos MD., Chang Q., Paterson AJ., Kudlow JE. **O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun; 98(12): 6611-6616.
- Yang CC., Ornatsky O., McDermott JC., Cruz TF., Prody CA. **Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1.** *Nucleic Acids Res.* 1998 Oct; 26(20): 4771-4777.
- Yang S., Galanis A., Sharrocks A.D. **Targeting of p38 mitogen activated protein kinases to MEF2 transcription factors.** *Mol. Cell. Biol.* 1999 Jun; 19(6): 4028-4038.
- Yang-Yen HF., Chambard JC., Sun YL., Smeal T., Schmidt TJ., Drouin J., Karin M. **Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction.** *Cell.* 1990 Sep; 62(6): 1205-1215.
- Yieh L., Sanchez HB., Osborne TF. **Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun; 92(13): 6102-6106.
- Yonemitsu S., Nishimura H., Shintani M., Inoue R., Yamamoto Y., Masuzaki H., Ogawa Y., Hosoda K., Inoue G., Hayashi T., Nakao K. **Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes.** *Diabetes.* 2001 May; 50(5): 1093-1101.
- Yoon JC., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelmant G., Stafford J., Kahn CR., Granner DK., Newgard CB., Spiegelman BM. **Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1.** *Nature.* 2001 Sep; 413(6852): 131-138.
- Yoon JC., Xu G., Deeney JT., Yang SN., Rhee J., Puigserver P., Levens AR., Yang R., Zhang CY., Lowell BB., Berggren PO., Newgard CB., Bonner-Weir S., Weir G., Spiegelman BM. **Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha.** *Dev Cell.* 2003 Jul; 5(1): 73-83.
- Yoshikawa T., Brkanac Z., Dupont BR., Xing GQ., Leach RJ., Detera-Wadleigh SD. **Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2.** *Genomics.* 1996 Aug; 35(3): 637-638.
- Yu B., Datta PK., Bagchi S. **Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites.** *Nucleic Acids Res.* 2003 Sep; 31(18): 5368-5376.
- Yu C., Markan K., Temple KA., Deplewski D., Brady MJ., Cohen RN. **The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis.** *J Biol Chem.* 2005 Apr; 280(14): 13600-13605.
- Yu GS., Lu YC., Gulick T. **Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I beta gene promoters by fatty acid enzyme substrate.** *J. Biol. Chem.* 1998b Dec; 273(49): 32901-32909.
- Yu GS., Lu YC., Gulick T. **Expression of novel isoforms of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1) generated by alternative splicing of the CPT-I beta gene.** *Biochem J.* 1998a Aug; 334 (1): 225-231.
- Yu K., Bayona W., Kallen CB., Harding HP., Ravera CP., McMahon G., Brown M., Lazar MA. **Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids.** *J. Biol. Chem.* 1995 Oct; 270(41): 23975-23983.

BIBLIOGRAFIA

Yu YT., Breitbart RE., Smoot LB., Lee Y., Mahdavi V., Nadal-Ginard B. **Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors.** *Genes Dev.* 1992 Sep; 6(9): 1783-1798.

Yun K., Wold B. **Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context.** *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Dec; 8(6): 877-889.

Z

Zamir I., Dawson J., Lavinsky RM., Glass CK., Rosenfeld MG., Lazar MA. **Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997a Dec; 94(26): 14400-14405.

Zamir I., Zhang J., Lazar MA. **Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors.** *Genes Dev.* 1997b Apr; 11(7): 835-846.

Zammit VA. **Mechanisms of regulation of the partition of fatty acids between oxidation and esterification in the liver.** *Prog. Lipid Res.* 1984; 23(1): 39-67.

Zammit VA. **Carnitine acyltransferases: Functional significance of subcellular distribution and membrane topology.** *Prog. Lipid. Res.* 1999 May; 38(3): 199-224.

Zammit VA., Corstorphine CG., Kolodziej MP., Fraser F. **Lipid molecular order in liver mitochondrial outer membranes and sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA.** *Lipids.* 1998 Apr; 33(4): 371-376.

Zammit VA., Fraser F., Orstorphine CG. **Regulation of mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase (CPT I): role of membrane-topology.** *Adv Enzyme Regul.* 1997; 37: 295-317.

Zammit VA., Price NT., Fraser F., Jackson VN. **Structure-function relationships of the liver and muscle isoforms of carnitine palmitoyltransferase I.** *Biochem Soc Trans.* 2001 May; 29(Pt 2): 287-292.

Zarain-Herzberg A., Rupp H. **Therapeutic potential of CPT I inhibitors: cardiac gene transcription as a target.** *Expert Opin. Invest. Drugs.* 2002 Mar; 11(3): 345-356.

Zhang B., Berger J., Hu E., Szalkowski D., White-Carrington S., Spiegelman BM., Moller DE. **Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha.** *Mol Endocrinol.* 1996 Nov; 10(11): 1457-1466.

Zhang CL., McKinsey TA., Olson EN. **Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation.** *Mol Cell Biol.* 2002 Oct; 22(20): 7302-7312.

Zhang Y., Mangelsdorf DJ. **LuXuRies of lipid homeostasis: the unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing.** *Mol Interv.* 2002 Apr; 2(2): 78-87.

Zhang Y., Dufau ML. **Silencing of transcription of the human luteinizing hormone receptor gene by histone deacetylase-mSin3A complex.** *J. Biol. Chem.* 2002 Sep; 277(36): 33431-33438.

Zhang Y., Ma K., Song S., Elam MB., Cook GA., Park EA. **Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha).** *J Biol Chem.* 2004 Dec; 279(52): 53963-53971.

Zheng G., Dai J., Woldegiorgis G. **Identification by mutagenesis of a conserved glutamate (Glu487) residue important for catalytic activity in rat liver carnitine palmitoyltransferase II.** *J. Biol. Chem.* 2002 Nov; 277(44): 42219-42223.

Zhou YT., Shimabukuro M., Wang MY., Lee Y., Higa M., Milburn JL., Newgard CB., Unger RH. **Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in disease of pancreatic beta cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Jul; 95(15): 8898-8903.

BIBLIOGRAFIA

- Zhu H., Shi J., Cregg JM., Woldegiorgis G. **Reconstitution of highly expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997a Oct; 239(2): 498-502.
- Zhu H., Shi J., de Vries Y., Arvidson DN., Cregg JM., Woldegiorgis G. **Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I.** *Arch. Biochem. Biophys.* 1997b Nov; 347(1): 53-61.
- Zhu H., Shi J., Treber M., Dai J., Arvidson D., Woldegiorgis G. **Substitution of glutamate-3, valine-19, leucine-23, and serine-24 with alanine in the N-terminal region of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl CoA inhibition and binding.** *Arch. Biochem. Biophys.* 2003 May; 413(1): 67-74.
- Zhu Y., Qi C., Calandra C., Rao MS., Reddy JK. **Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *Gene Expr.* 1996; 6(3): 185-195.
- Zhu Y., Qi C., Jain S., Rao MS., Reddy JK. **Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor.** *J Biol Chem.* 1997 Oct; 272(41): 25500-25506.
- Zhu Y., Qi C., Korenberg JR., Chen XN., Noya D., Rao MS., Reddy JK. **Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995 Aug; 92(17): 7921-7925.
- Zimmerman AW., Veerkamp JH. **New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins.** *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jul; 59(7): 1096-1116.

APÈNDIX

OLIGONUCLEÒTIDS

1.-OLIGONUCLEÒTIDS DE VECTORS

T3	ATTACCCCTCACTAAAGGGA	oligonucleòtid R del promotor T3
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	oligonucleòtid F del promotor T7
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	oligonucleòtid R del promotor Sp6
GL2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA	oligonucleòtid R dels vectors pGL3
RV3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	oligonucleòtid F dels vectors pGL3
PGAP	GGATGGAAAAGTCCCGGCCG	oligonucleòtid F del vector pHWO10

2.-OLIGONUCLEÒTIDS DEL PROMOTOR HUMÀ DE LA CPT1B

CPTF2 (DH742) (-905/-883)	gg GGTACC TGCAGCTTAGAATAATAAATAC	(KpnI)
CPTR2 (DH743) (-525/-541)	tcc CCCGGG CCACGTCCTTCAGGCCTA	(SmaI)

En verd s'indiquen els nucleòtids de la seqüència que generen les dianes de restricció utilitzades en els clonatsges i amb les lletres F i R s'identifiquen els oligonucleòtids *forward* i *reverse*, respectivament. Els oligonucleòtids inclosos en els articles es troben descrits en aquests.

CONSTRUCCIONS

1.-PLASMIDIS REPORTERS DE LUCIFERASA

pCPTluc:

Construït per clonatge de 380bp de la regió promotora del gen humà CPT1B en el vector pGL3Basic. El fragment de promotor es va obtenir per PCR a partir de la construcció pCPTCAT (Mascaró et al., 1998) amb els oligonucleòtids CPTF2 i CPTR2 i digestió amb KpnI-SmaI.

pGL3P-MEF2

Construït mitjançant el clonatge dels oligonucleòtids MEF2-F i MEF2-R hibridats en el vector

pGL3Promoter digerit amb NheI-XhoI.

pCPT mut MEF2

Construït mitjançant extensió per encavalcament (*overlapping extension*), a partir de la construcció pCPTluc, amb els oligonucleòtids [CPT-F2 – MEF2 mut -R] i [MEF2 mut -F – CPT-R2]. El producte de la segona amplificació va ser digerit amb KpnI-SmaI i clonat en pGL3Basic.

pB-CASluc (pCPT-B211)

Construït mitjançant el clonatge dels oligonucleòtids CAS-F1 i CAS-R1 hibridats en el vector pGL3Basic digerit amb NheI-SmaI. Conté, únicament, els 46 parells de bases del promotor de la CPT1B humana que inclouen la E-Box, el PPRE i l'element de resposta a MEF-2.

pB-CAS mut MEF2

Construït per substitució del fragment CAS-F1/CAS-R1 pels oligonucleòtids CAS-F3 i CAS-R3 hibridats, digerint la construcció pBCASluc amb BstEII i XhoI. Conté, únicament, els 46 parells de bases del promotor de la CPT1B humana que inclouen la E-Box, el PPRE i l'element de resposta a MEF-2, amb aquest darrer element mutat.

pCPT-MEF2(5)luc

Construït mitjançant extensió per encavalcament (*overlapping extension*) a partir de pCPTluc, amb els oligonucleòtids [CPT-F2 – MEF2(5)-R] y [MEF2(5)-F – CPT-R2]. El producte de la segona amplificació va ser digerit amb KpnI-SmaI i clonat en pGL3Basic.

pCPT-MEF2(10)luc

Construït mitjançant extensió per encavalcament (*overlapping extension*) a partir de la construcció pCPTluc, amb els oligonucleòtids [CPT-F2 – MEF2(10)-R] i [MEF2(10)-F – CPT-R2]. El producte de la segona amplificació va ser digerit amb KpnI-SmaI i clonat en pGL3Basic.

2.-PLASMIDIS D'EXPRESSION

pSG5-PPAR α : (facilitat per S. Green; Macclesfield, UK). Construcció en el vector pSG5. Conté el cDNA de ratolí de PPAR α . Pot ser transcrit i traduït *in vitro* gràcies al promotor T7.

pJCXR8: (facilitat per R.M. Evans; Salk Institute, San Diego, USA). Construcció en el vector

pCDM8. Conté el cDNA humà de RXR α . Pot ser transcrit i traduït *in vitro* gràcies al promotor T7.

pSG5-PPAR δ : Construcció en el vector pSG5. Conté el cDNA de ratolí de PPAR δ . Pot ser transcrit i traduït *in vitro* gràcies al promotor T7.

pCDNA3-MEF-2C: (facilitat per E.N. Olson, Dallas, USA). Construcció en el vector pCDNA3. Conté el cDNA humà de MEF-2C. Pot ser transcrit i traduït *in vitro* gràcies al promotor T7.

pSG5-MyoD: Construcció en el vector pSG5. Conté el cDNA de rata de MyoD. Pot ser transcrit i traduït *in vitro* gràcies al promotor T7.

pE12: E12 humà.

pGEX-PPAR α : Construcció en el vector pGEX-4T2. Conté el cDNA humà de PPAR α . Permet generar una proteïna de fusió PPAR α -GST.

pGEX-PPAR δ : Construcció en el vector pGEX-4T2. Conté el cDNA humà de PPAR δ . Permet generar una proteïna de fusió PPAR δ -GST.

pM-DNSp1: (facilitat per Yoshihiro Sowa, Kyoto). Plasmidi que expressa el domini d'unió a DNA del factor de transcripció GAL4 fusionat a una forma de Sp1 delecionada en el domini de transactivació (aminoàcids 592-778).

3.-CONSTRUCCIONS DE PROTEÏNES CPT1

Totes aquestes construccions s'expliquen amb detall en els articles 2 i 3.

PLCPT/pHWO10 i RLCPT/pHWO10

Contenen, respectivament, els cDNA de les CPT1A de porc i de rata clonades a la diana de restricció EcoRI del pHWO10.

PorcV128L/pHWO10 i RataV128L/pHWO10

A partir de les construccions PLCPT/pHWO10 i RLCPT/pHWO10 es van generar, per

extensió per encavalcament (*overlapping extension*), les construccions PigV128L/pHWO10 i RatV128L/pHWO10 que contenen una mutació puntual en els cDNAs de les CPT1. Aquesta mutació genera una diana HindIII a la seqüència de DNA i un canvi en el residu aminoàcid 128 de la proteïna, d'una valina per una leucina, que no té conseqüències ni l'activitat ni en les característiques cinètiques de l'enzim.

Porc/Rata/pHWO10 i Rata/Porc/pHWO10

Aquestes construccions contenen el cDNA de la CPT1A de porc, o de rata, fins la posició 384 (aminoàcid 128) i la resta del cDNA de l'altra espècie.

El cDNA de les construccions PorcV128L/pHWO10 i RataV128L/pHWO10 va ser clonat en pBSSK+ per digestió amb EcoRI, generant PorcV128L/pBSSK+ i RataV128L/pBSSK+. Aquestes noves construccions es van digerir amb HindIII, aprofitant una diana del vector pBSSK a 5' del cDNA clonat i la diana de restricció introduïda en els cDNAs de les CPT1 de rata i porc, a 384bp de l'ATG, per mutació puntual. Els inserts van ser intercanviats a les construccions PorcV128L/pBSSK+ i RataV128L/pBSSK+, generant les quimeres Porc/Rata i Rata/Porc en el vector pBSSK+. Aquests cDNAs de les proteïnes quimèriques van ser clonats en pHWO10 per digestió amb EcoRI.

Rata/Porc-A/pHWO10

Aquesta construcció conté, clonat en el vector pHWO10, el cDNA de la CPT1A de rata amb la regió A (aminoàcids 384-660) del cDNA de la CPT1A de porc.

La construcció PorcV128L/pBSSK+ va ser digerida amb l'enzim de restricció KpnI, aprofitant una diana del vector pBSSK a 5' del cDNA de la CPT1A de porc i una diana situada a la posició 660 d'aquest cDNA. El fragment obtingut va ser clonat a la construcció RataV128L/pBSSK+ digerida amb KpnI, generant la construcció Porc/Rata3/pBSSK+.

La construcció RataV128L/pBSSK+ va ser, per altra banda, digerida amb HindIII, alliberant un fragment de 384bp que incloïa l'ATG de la CPT1A de rata i que va ser clonat a la construcció Porc/Rata3/pBSSK+, generant Rata/Porc-A/pBSSK+. Aquest cDNA va ser clonat en el vector pHWO10 per digestió amb EcoRI.

Rata/Porc-B/pHWO10

Aquesta construcció conté, clonat en el vector pHWO10, el cDNA de la CPT1A de rata amb la regió B (aminoàcids 660-1770) del cDNA de la CPT1A de porc.

La construcció PorcV128L/pBSSK+ va ser digerida amb els enzims de restricció XhoI /StuI, aprofitant una diana XhoI del vector pBSSK+ a 5' del cDNA de la CPT1A de porc i un diana StuI situada a la posició 1770 d'aquest cDNA. El fragment obtingut va ser clonat a la construcció RataV128L/pBSSK+, generant la construcció Porc/Rata2/pBSSK+.

La construcció RataV128L/pBSSK+ va ser digerida paral·lelament amb KpnI, alliberant un fragment de cDNA de la CPT1A de rata (660bp) que incloïa l'ATG del cDNA de la CPT1A de rata. Aquest fragment va ser clonat a la construcció Porc/Rata2/pBSSK+, generant Rata/Porc-B/pBSSK+. Aquest cDNA va ser clonat al vector pHOW10 per digestió amb EcoRI.

Rata/Porc-C/pHOW10

Aquesta construcció conté, clonat en el vector pHOW10, el cDNA de la CPT1A de rata amb la regió C (aminoàcids 1770-STOP) del cDNA de la CPT1A de porc.

La construcció RataV128L/pBSSK+ va ser digerida amb els enzims de restricció XhoI /StuI, aprofitant una diana XhoI del vector pBSSK+ a 5' del cDNA de la CPT1A de rata i un diana StuI situada a la posició 1770 d'aquest cDNA. El fragment obtingut va ser clonat a la construcció PorcV128L/pBSSK+, generant la construcció Rata/Porc-C/pBSSK+. Aquest cDNA va ser clonat al vector pHOW10 per digestió amb EcoRI.

Δ18/pHOW10 i Δ28/pHOW10

Aquestes construccions contenen el cDNA de la CPT1A de porc delecionat en els primers 18 o 28 aminoàcids i clonat en el vector pHOW10.

Es van dissenyar els oligonucleòtids Δ18fwd (5'-GACATC**GAATTC**ATGATCGACCTTCGAATGAGC-3') i Δ28fwd (5'-GACATC**GAATTC**AGGCAGATCTATCTGTCT-3') que incloïen un ATG amb una diana EcoRI just davant i 18 nucleòtids a partir de la posició 54 (aa18) o 84 (aa28) del cDNA de la CPT1A de porc. Mitjançant amplificacions per PCR de l'extrem N-terminal de la proteïna, utilitzant com a motlle la construcció PorcV128L/pBSSK+, es van obtenir els fragments Δ18 i Δ28. Aquests fragments van ser clonats en el vector pBSSK+ digerit amb EcoRV, generant les construccions Δ18/pBSSK+ i Δ28/pBSSK+.

Paral·lelament, la construcció PorcV128L/pBSSK+ va ser digerida amb els enzims de restricció AatII, que tallava el cDNA a la posició 508, i NotI, que tallava després del codó d'STOP. El fragment d'aquesta digestió es va clonar en Δ18/pBSSK+ i Δ28/pBSSK+, generant les construccions Δ18porc/pBSSK+ i Δ28porc/pBSSK+.

Les construccions es van realitzar en pBSSK+ i posteriorment els cDNAs van ser clonats en el pHOW10 per digestió amb EcoRI.

Δ18porc/rata/pHWO10 i Δ28porc/rata/pHWO10

Aquestes construccions contenen el cDNA quimèric porc/rata de la CPT1A deletat en els primers 18 o 28 aminoàcids i clonat en el vector pHWO10.

Mitjançant amplificacions per PCR de l'extrem N-terminal de la proteïna, utilitzant com a motlle la construcció Δ18porc/pBSSK+ i Δ28porc/pBSSK+, respectivament, i com a oligonucleòtid directe T7, es van obtenir els fragments Δ18 i Δ28 del cDNA de la CPT1A de porc. Els fragments de PCR resultants es van digerir amb HindIII i EcoRV i es van clonar a la construcció Porc/Rata/pBSSK+ digerida amb els mateixos enzims, generant Δ18porc/rata/pBSSK+ i Δ28porc/rata/pBSSK+.

Les construccions es van realitzar en pBSSK+ i posteriorment els cDNAs van ser clonats en el pHWO10 per digestió amb EcoRI.

PMCPT1STOP/pHWO10

El cDNA de la CPT1B de porc va ser amplificat per mètodes derivats del PCR (RT-PCR i SMART RACE). Utilitzant com a motlle una mostra de RNA total de teixit muscular de porc de 2 setmanes d'edat es va realitzar una reacció de transcripció reversa amb M-MuLV polimerasa i una combinació d'hexàmers. Es va obtenir un fragment de cDNA (del nucleòtid +21 fins +726, considerant +1 l'adenina de l'ATG inicial) que es va amplificar per PCR utilitzant dos primers degenerats: OCD1 (5'-GCNGTNGCNTTYCAGTTCAC) i OCD2 (5'-AGGTAGAYRTAYTCYCCACCAGTC), facilitats pel Dr. Feike R. Van Der Leij (Department of Pediatrics, University of Groningen, The Netherlands). El fragment de PCR obtingut va ser clonat en el vector pGEM-T vector i seqüenciat. L'anàlisi per BLAST va mostrar que el cDNA aïllat compartia una elevada identitat amb les CPT1 musculars humana (83%) i de rata (84%) i un menor grau d'identitat amb les CPT1 hepàtiques humana (55%) i de rata (53%). Aquesta seqüència obtinguda va ser posteriorment utilitzada per dissenyar oligonucleòtids per amplificar i clonar l'ORF (*open reading frame*) de la CPT1B de porc.

L'amplificació de l'extrem 3' del cDNA de la CPT1B de porc es va realitzar mitjançant la tècnica de RACE. Seguint les indicacions de la casa comercial es va dissenyar un oligonucleòtid *forward*: PMCPTI-F701 [5'-CAAGTCATGGTGGGCGACTAACTATGTG (+676/+701)] i es va utilitzar poly(A) mRNA de teixit muscular de porc com a motlle. El producte del PCR (1743bp) va ser clonat en el vector pGEM-T i seqüenciat, generant-se el plasmidi p3'PMCPTIBGEMT que contenia el cDNA de la CPT1B de porc des de la posició +676 fins la +2419.

La regió 5' del cDNA es va amplificar per PCR utilitzant un oligonucleòtid *guess-mer forward*: PMCPTI-F1 (5'-CTGACTAAACCCAGGATG que correspondria a les coordenades -15/

+3) i un oligonucleòtid *reverse* PMCPTI-R1 (5'-GTATTCCTCGTCATCCAG que correspondria a les coordenades +604/+586). Es va obtenir un fragment de 619bp de l'extrem 5' del cDNA de la CPT1B de porc.

A partir del producte de PCR es van dissenyar dos oligonucleòtids més PMCPTI-F6 [5'-CAAATTGAATTCATGGCGGAAGCGCACCCAG (+1/+18)] i PMCPTI-R7 [5'-GCTGTCTGTGAGG TGGTG (+1000/+979)]. El primer PMCPTI-F6 introdueix una diana de restricció EcoRI just abans del codó ATG (indicada en verd). Aquest producte de PCR va ser digerit amb EcoRI i BamHI (que talla el cDNA de la CPT1B de porc a la posició +950) i clonat en el vector BSSK+, generant p5'PMCPTI/BSSK+.

Per altra banda, el producte de RACE obtingut anteriorment va ser alliberat de la construcció p3'PMCPTIBGEMT per digestió amb SacI i AatII (presents en el *polylinker* del vector pGEM-T). Els extrems van fer-se roms per *fill-in* i l'insert alliberat va ser clonat en el vector pBSSK+ digerit EcoRV. Mitjançant un digestió amb BamHI d'aquesta última construcció es va alliberar la regió 3' del cDNA de la CPT1B de porc (des de la posició +950 fins la 2419). Aquest fragment va ser lligat en el plasmidi p5'PMCPTI/BSSK+ digerit amb BamHI, resultant el plasmidi pPMCPTI/BSSK+. Aquest plasmidi conté el cDNA de la CPT1B de porc des de la posició +1 fina a la +2419.

La construcció pPMCPTI/BSSK+ va ser posteriorment manipulada per eliminar la regió 3'UTR i introduir una mutació puntual en el codó d'STOP que donés lloc a un triplet exactament igual que el de les altres CPT1 estudiades. Utilitzant com a motlle la construcció pPMCPTI/BSSK+ es van dissenyar dos oligonucleòtids Pigfw [5'-CGTGAAAGCAGACCTGCAAG (+1872/+1892)] i Pigrv [5'-ACTGGAATTCGCCCTTAGCTGTCAGCTTTGGGAAC (+2323/+2298)]. L'ús d'aquests dos oligonucleòtids sobre el cDNA de la CPT1B de porc va generar un fragment de 925bp amb una diana de restricció EcoRI(indicada en verd), just després del codó d'STOP i una mutació puntual en el codó d'STOP (indicada en vermell). El producte de PCR va ser clonat en el vector pGEM-T i seqüenciat. El plasmidi va ser digerit amb els enzims de restricció NotI i BglII, generant un insert de 444bp que va ser clonat en el plasmidi PMCPTI/BSSK obert amb les mateixes dianes. D'aquesta manera es va obtenir la construcció pPMCPTISTOP/BSSK+ que conté l'ORF de la CPT1B de porc (+1/ +2323), flanquejat per dues dianes de restricció EcoRI.

El cDNA de la CPT1B de porc va ser clonat en el vector d'expressió pHW010 aprofitant la diana EcoRI del plasmidi, situada a 3' del promotor del gen de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPp), donant lloc al plasmidi d'expressió PMCPTIBSTOP/pHW010.

"Després d'escalar una muntanya molt alta,
vam descobrir que hi ha moltes altres muntanyes per escalar."
(Nelson Mandela)

