



Relació estructura-funció de les proteïnes CPT1

Maria Magdalena Pujol Vidal

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ DE LES PROTEÏNES CPT1

Maria Magdalena Pujol Vidal
2012



Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Programa de Doctorat de Biomedicina
Màster de Biomedicina 2006-2007

RELACIÓ ESTRUCTURA-FUNCIÓ DE LES PROTEÏNES CPT1

Memòria presentada per Maria Magdalena Pujol Vidal per optar al títol de
Doctor de la Universitat de Barcelona

Dr. Pedro F. Marrero González
El director

Maria Magdalena Pujol Vidal
La doctoranda

Aquesta tesi ha estat realitzada gràcies a l'Ajut per a la Contractació de Personal Investigador
Novell de la Generalitat de Catalunya (FI 2008-2011)

Als meus pares, i a la meva *sister*,
per tenir-los sempre al meu costat

*"No te rindas, aún estás a tiempo
De alcanzar y comenzar de nuevo,
Aceptar tus sombras,
Enterrar tus miedos,
Liberar el lastre,
Retomar el vuelo.
No te rindas que la vida es eso,
Continuar el viaje,
Perseguir tus sueños,
Destruir el tiempo,
Correr los escombros,
Y destapar el cielo..."*

Mario Benedetti

AGRAÏMENTS

I per fi, arriba el moment personal de la tesi. Probablement em quedaré curta en aquesta part, dubto que les següents paraules puguin transmetre com em sento realment, però ho intentaré.

En primer lloc, per suposat vull agrair als meus jefes Pedro i Diego que m'hagin acollit a formar part del seu "ramallet de nines" per fer aquesta tesi que, per sobre de tot, ha estat un procés de gran creixement personal i professional. *Gracias por ver cómo se "iluminaron mis ojos" durante la carrera e invitarme a vivir esa curiosidad por la ciencia en vuestro grupo. Gracias por los inolvidables momentos de dispersión y carcajadas dentro y fuera del lab, y por las eternas discusiones científicas que me enseñaron qué es sentir vocación. Os admiro por seguir siempre adelante, remontando de las caídas. Pedro, gracias por tus palabras, a menudo amargas, que me han hecho bajar del burro. Sé que estos últimos meses ha sido difícil hablar conmigo...no me lo tengas en cuenta!* Gràcies a la Carme Caelles, el Joan Carles i el Joan Roig, per donar un punt de vista diferent als nostres resultats en els seminaris setmanals.

Voldria donar les gràcies a moltes persones de la facultat i del departament, que han fet més agradable el dia a dia d'aquests sis anys de doctorat. En primer lloc, i probablement el major *culpable* de que hagi arribat fins aquí, gràcies al Joan Maria Llobet, qui amb quatre frases (quan jo només tenia 17 anys!), va fer que considerés seriosament la possibilitat d'escollir la via de la investigació. Gràcies Isabel i Esther per rebre'm cada dia amb un somriure només entrar a l'edifici. Gràcies seques per facilitar-nos tots els temes burocràtics sense posar pegues. Gràcies a tot el professorat del departament, per estar sempre disposats a ajudar, tant personal com científicament, i per animar-nos a tots a seguir endavant en el món acadèmic. Gràcies en concret al grup dels *colis* (Pepita, Laura, Rosa), per tota la informació i ajuda en el clonatge i expressió de proteïnes amb la NusA. Gràcies al Joan Villanueva del Servei de Proteòmica de la UAB, al professor Jordi Hernández i al grup del professor Jesús Pérez Gil per tota l'ajuda en els experiments de difracció circular.

Uns agraiments molt especials al professor Javier Luque (i el seu equip), per tota la dedicació al model de la CPT1B humana. Per estar sempre disposat a respondre qualsevol qüestió, per ajudar-me amb la comprensió, redacció i figures de bona part d'aquesta tesi. Per sentir il·lusió pel projecte que tan important ha estat per mi, especialment en aquests últims mesos. *I specially would like to thank to my supervisor in Warwick, Professor Victor Zammit. Thanks for the interest and support to my work, and for making me feel comfortable in a new working environment, even in such a cold country! Thanks for being always available, even in the distance. Thanks Gemma, Fozia, Sonia, Jurgen, Fred (and Jacopo) for helping me so much with my experiments. Many thanks Haja, for giving me a warm home (in all respects) in Coventry.*

No oblidaré als companys de batalla del departament, amb qui sempre ens sentirem més compresos! Als "plantes" Paola, Vero, David (*Dani, qué risas, eres el mejor...caudepón, caudepón..lalalala!*), com es nota la vostra absència!; als "faustos" Pep, Paula, Mida i els nous, per saber que ens falti el que ens falti, molt probablement uns als altres ens podem ajudar; a les "colis" Elaine, Carla, Lorena, *por el buen rollito y tooooda la ayuda con mis proteínas!*; a les "citis" Carlota, Núria, Xènia i demés, per ser l'enveja de marxa i productivitat alhora!; a les "taulers", Constanza i Nathalie,

ánimo con el nuevo lab!; als “peixos” Mari, Diego, Ivan i a tots els que em deixo, per simplement compartir alegries i penes, i regals de tesi!!!

I a les del dia a dia i minut a minut...les paraules es queden curtes. El gran equip amb el que vaig començar, exemple de disciplina, passió i vocació. Durant tota la tesi m'han vingut en un moment o altre frases vostres, mostra de la petjada que heu deixat. Laura, gràcies per posar els fonaments. Cris, penso en tu i em ve un somriure de complicitat... Nuri, *nos parecía que te ibas y se acababa el mundo! imagínate...* Xis, quantes coses! dins i fora del lab, ets admirable. M'encanta seguir sentint-te tan a prop. Gràcies pels consells, per la sinceritat, i per treure importància a les coses quan he estat ofuscada, valorant sempre les realment imporants i boniques. Gràcies Mar, per ser un exemple de força, empena, decisió i esperit de superació. Per estendre'm la mà en els pitjors moments. Per deixar-te estimar, i mostrar la teva part més humana. Anna, lo nostre sí que ha estat una trajectòria conjunta! Finalment ens n'hem sortit, tot i haver-ho dubtat en tants moments...oi? Gràcies als estudiants que heu anat passant, Eva, Maria Eugènia, *Marije, Denise*, las portus *Joana i Shana*, Gaby, Carlos, Míriam... tot sou responsables d'alguna part de la meva feina i formació. Tots heu estat motiu de creixement, gràcies. I a l'equip actual, que mantenen la descendència de les *ST productions*, sempre marcant estil, i que mantenen el vaixell flotant. Joana, la teva ajuda no és mesurable. La meva sub-jefa. Encara recordo quan et feia quedar fins tan tard per no deixar-me sola acabant les mitos i el Joan s'enfadava... Gràcies per ser-hi sempre, sigui l'hora que sigui. Per la teva enteresa, per simplificar les coses, i per fer de sac de boxe en molts moments. *Tali-Albert*, quina sort de tu! Mai deixaràs de sorprendre'm. Ànims i a lluitar, el futur del grup és a les teves mans! i n'estic convençuda que t'anirà genial. *Y las últimas, mis niñas, el dúo Tr3sC. Elena, la madre de la paciencia (ay no...!), gracias por aguantar tanto. Gracias por ayudarme en todo lo que está en tus manos. Por tu sonrisa incansable, por tu generosidad y por mantener la calma. AnaLu, gracias por ser un ejemplo de disciplina, metodología y previsión. Gracias por tenderme siempre la mano. Gracias por los mensajes “post” que siempre ayudan a entender. Gracias a las dos por el “pack salvavidas” que habéis sido. Os quiero.*

A mis “chipis” guapas: Lucía, Lilia y Brugués. Por compartir, por crear vínculos que estabilizan. Por los consejos, por el apoyo y por la calidez. Gracias por crear la carcajada de la nada, por hacer tan ameno el día a día. Chipirones, reunidos, jamás serán vencidos!!

Inés, gràcies per ser-hi sense condició. Per ser la primera Amiga en qui penso a trucar. Per la química, pels ànims, per la complicitat, per escoltar-me, pel suport incondicional, sobretot, quan més ho he necessitat. Myriam, tinc la sensació que des que ens coneixem, ens hem entès perfectament en tot el que hem compartit, que no és poc tampoc! Gràcies per tenir sempre les paraules adequades que m'han fet veure un punt de vista diferent, que m'ha fet créixer. T'admiro moltíssim, com a persona i com a Amiga, i sé que tu també te'n sortiràs. Amb la Inés, sou dues de les persones que més heu patit el meu procés i em sento molt feliç d'haver-vos trobat. Marta, Neus, Lexio...gràcies pels grans moments viscuts a la *Uni*, per revivre'ls i crear-ne encara de nous. La família creix!! Una de les grans recompenses de viure a Barcelona i fer-me sentir com a casa des que vaig arribar.

Maneles i Lluïses del meu cor: Adri, Lourdes, Mercè, Núries i Sílvia. Gràcies per aquest univers paral·lel que vivim setmana rere setmana, que tanta energia em dóna i que transmetem amb la nostra música i rialles. M'encanta! Gràcies per ser-hi, tant, i sense esperar-m'ho. Sobretot, sobretot, pels mesos freds a Anglaterra, mai ho oblidaré.

Gloris, Anna, Menxu, Geor....bacanals *forever*. La meva petita família de can Rosselló. Per fi ho he aconseguit noies, semblava que no arribaria mai! Gràcies pel suport i ànims. Per compartir il·lusions i somnis. Prometo que en les pròximes trobades no diré més que tot segueix igual....

Als de Reus: Ester, Vicky, Txema, Núria, Ciscu, Joan, Alba, Ferran,....per fer-me sentir sempre que torno a *casa*. Per deixar-me desconnectar i créixer junts fent-nos veure (amb amor i carinyo) els nostres defectes, i també les nostres virtuts. Per seguir-me en les meves "anades d'olla", i també per fer-me remuntar en èpoques baixes. Mercè, que lluny estem i que a prop ens sentim quan ens veiem, oi? M'agrada que sigui així.

Gracias Juanjo por el dibujito final! Y por tenderme la mano aunque también fuera difícil para ti. A l'Edu per pendre paciència amb la part més informàtica d'aquesta tesi, i pel suport moral en els inicis del doctorat. I perquè la vida és així, capritxosa, dolça i amarga. Pel creixement personal que això suposa.

Alicia, potser no ho "hauria de" fer, però sí, agraeixo simplement haver tingut la química necessària amb tu i que hagis estat de tantíssima ajuda en aquests últims mesos. M'has donat l'empenta que necessitava, sense la qual avui no estariem aquí.

Gràcies a la Música per ajudar-me a relaxar tensions. Per fer-me vibrar i oblidar els mal de caps. A tot els Ol'Green per compartir la il·lusió d'un projecte comú i per donar espai a la meva bogeria. A l'Estela, per acollir-me quan sentia que no tenia res i fer un entorn agradable de casa nostra. Per tot el suport i per aguantar tantes converses de ciència! Amunt... A la Tània *guapa tu*, per parar els cops des de l'altra banda (que jo ho sé) i per crear un espai amè, divertit, carinyós, on simplement disfrutar.

Finalment, acabo els agraïments amb les persones que més estimo en aquest món i que més sento que m'estimen. Kiku, no crec que mai ningú em torni a trobar en les mateixes condicions que tu ho vas fer i reaccioni de la mateixa manera. Has passat de ser una persona agradable de tenir a prop, a indispensable en el meu dia a dia. Cada dia al teu costat és un dia d'aprenentatge, d'enteresa, coherència, singularitat i creixement. Gràcies per haver aguantat com ningú totes les meves llàgrimes, cansament, frustració i desesperació. Gràcies pels consells, per la complicitat, pels somriures, per saber què necessitava en cada moment, per ser com ets. Estic molt orgullosa del que hem creat junts.

Als meus avis, vull agrair-vos l'empremta que heu deixat en mi. En cadascuna d'aquestes pàgines hi ha marques de la vostra existència, l'herència innata i indiscutible. La disciplina de l'avi Albert, la dolçor de la iaia Isabel, el carinyo i singularitat del iaio Ton. Res farà que us oblidí, mai. Iaia, per fi ho he aconseguit! Semblava que no arribaria mai, eh? Sé que les teves espelmes, els teus cocs i sobretot els teus petons han estat imprescindibles per fer aquest camí tan llarg. Tiets, cosins, pujolada al complet...tieta, *coxins y primos*, gràcies pels ànims, per compartir l'esbarjo, però també moments dolços, i amargs.

Ja per acabar, al nucli dur. Que, tot i que a vegades des de la incomprensió i la “distància”, he sentit sempre a prop, pendents en la justa mesura, oferint-me la desconexió i evasió o el consell i l’ajuda en la mesura que els he necessitat, quan els he necessitat. Gràcies papa, mama i *sister* per ser un model. Un coixí. Uns companys insubstituïbles de viatge. No triaria una altra família. Sé que us he fet patir. Doncs bé, una vegada més, ens n’hem sortit junts. Perquè, espero que sapiguen, que sense vosaltres no ho hauria pogut fer. Gràcies Albert per completar el *pack*, i veure que amb una mirada i un somriure ja ens hem entès. Gràcies a l’Arnau i el Bernat, aquestes *coseletes* tan petites que em fan sentir la felicitat més gran del món. Us estimo molt a tots, i sempre us necessitaré a prop.

Sense tots i cadascú de vosaltres, aquestes pàgines no existirien...

Gràcies per ser-hi sempre, en tot moment (Maria Coma)

ÍNDEX

ÍNDIX

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS	1
INTRODUCCIÓ	3
I. METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS	5
1. Oxidació dels àcids grassos	7
1.1. Alliberament dels àcids grassos.....	7
1.2. Entrada al citosol cel·lular i activació a acils-CoA.....	7
1.3. Distribució intracel·lular.....	9
1.4. Entrada a la matriu mitocondrial.....	9
1.5. Oxidació a acetil-CoA.....	10
II. SISTEMA CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA	12
1. Carnitina palmitoïltransferasa 1 (CPT1).....	13
2. Carnitina acilcarnitina translocasa (CACT).....	13
3. Carnitina palmitoïltransferasa 2 (CPT2).....	14
4. Mecanismes de control del sistema CPT.....	15
4.1. Regulació transcripcional.....	16
4.2. Regulació post-traducciona l.....	17
4.3. Influència de l'entorn membranós	18
4.4. Inhibició per malonil-CoA.....	21
4.5. Inhibició farmacològica	23
5. Deficiència humana	25
III. CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1	27
1. Expressió heteròloga de proteïnes CPT1 en llevat.....	29
2. Determinació de paràmetres enzimàtics.....	30
3. Isotips de CPT1	30
3.1. CPT1A.....	32
3.1.1. Efecte del dejú i llocs d'unió al malonil-CoA.....	33
3.1.2. Determinants moleculars de la sensibilitat al malonil-CoA.....	34
3.1.3. Disposició de CPT1A en la membrana: formació d'oligòmers i mecanisme de transport de les acilcarnitines a l'espai intermembrana	37
3.1.4. Models estructurals de CPT1A.....	39
3.2. CPT1B.....	43
3.2.1. Principals diferències respecte CPT1A	44
3.2.2. Determinants moleculars de la sensibilitat al malonil-CoA.....	45
3.3. CPT1C	47
3.3.1. Organització gènica i isoformes de la <i>CPT1C</i> humana	48
3.3.2. Patró d'expressió i distribució subcel·lular de la proteïna	50
3.3.3. Estudi de l'activitat enzimàtica de CPT1C.....	51
3.3.4. Fenotip resultant de la modificació dels nivells d'expressió de <i>Cpt1c</i>	52
3.3.5. Regulació transcripcional de la <i>CPT1C</i> humana	55
4. La CPT1 de porc.....	56

ÍNDIX

IV. ÀCIDS GRASSOS I CONTROL DE LA INGESTA	58
1. Metabolisme dels àcids grassos en el cervell.....	58
2. Control de la ingesta	59
2.1. Els àcids grassos com a molècules senyalitzadores.....	61
2.2. Malonil-CoA hipotalàmic	64
MATERIALS I MÈTODES	67
I. MATERIALS	69
1. Soques bacterianes.....	69
2. Soques de llevat	69
3. Línies cel·lulars establertes	70
3.1. Les cèl·lules Neuro2A són un bon model d'estudi <i>in vitro</i> de l'expressió de <i>Cpt1c</i>	70
4. Vectors	71
4.1. Vectors de subclonatge	71
4.2. Vectors d'expressió procariota	71
4.3. Vectors d'expressió en llevats.....	71
4.4. Vectors d'expressió en cèl·lules de mamífer.....	72
4.5. Vectors reporters.....	72
5. Oligonucleòtids	73
6. Anticossos.....	73
6.1. Anticossos primaris	73
6.2. Anticossos secundaris	74
7. Material radioactiu	74
8. Pèptids	74
9. Animals.....	75
10. Reactius	75
10.1. Cultiu de cèl·lules de mamífer	75
10.2. Cultiu de bacteris i llevats	75
10.3. Marcadors de pes molecular	76
10.4. Altres	76
11. Eines informàtiques.....	76
11.1. Anàlisi de seqüències de DNA	76
11.2. Anàlisi de seqüències proteiques.....	76
11.3. Altres	77
II. MÈTODES	78
1. Obtenció de DNA.....	78
1.1. Cultius bacterians.....	78
1.2. Preparació del DNA plasmídic.....	78
1.3. Precipitació i quantificació del DNA	78
1.3.1. Precipitació del DNA	78

ÍNDIX

1.3.2. Extracció amb fenol-cloroform.....	79
1.3.3. Quantificació del DNA.....	79
1.4. Resolució, identificació i purificació de fragments de DNA.....	79
1.4.1. Separació de fragments de DNA en gels d'agarosa/TAE/bromur d'etidi.....	79
1.4.2. Purificació de fragments de DNA de gels d'agarosa.....	80
2. Modificació enzimàtica del DNA.....	80
2.1. Digestió del DNA.....	80
2.2. Desfosforilació del DNA.....	80
2.3. Generació d'extrems roms.....	81
2.4. Lligació de DNA.....	81
3. Construcció de molècules de DNA recombinant.....	82
3.1. Subclonatge de fragments de DNA.....	82
3.2. Transformació de cèl·lules <i>E.coli</i> : mètode del CaCl ₂	82
3.3. Selecció de plasmidis recombinants.....	83
4. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	83
4.1. Amplificació de DNA.....	83
4.2. PCRpreps.....	84
4.3. Mutagènesi dirigida de DNA mitjançant la tècnica de la PCR.....	85
4.3.1. Introducció de dianes de restricció.....	85
4.3.2. Introducció de mutacions puntuals.....	85
5. Seqüenciació automàtica del DNA.....	85
6. Obtenció i anàlisi de l'RNA.....	85
6.1. Obtenció de l'RNA total.....	85
6.2. Quantificació de l'RNA total.....	86
6.3. RT-PCR.....	86
6.4. PCR quantitativa en temps real (qRT-PCR).....	87
7. Obtenció i anàlisi de proteïnes.....	88
7.1. Obtenció d'extracte cru de proteïnes a partir de cèl·lules en cultiu.....	88
7.2. Obtenció d'extracte cru de proteïnes a partir de teixit.....	88
7.3. Transcripció i traducció <i>In vitro</i>	89
7.4. Quantificació de proteïnes: Mètode de Bradford.....	89
7.5. Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	89
7.6. Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliacrilamida (BN-PAGE).....	90
7.7. Anàlisi de proteïnes per tinció de <i>Comassie Brilliant Blue</i>	91
7.8. Anàlisi de proteïnes per immunotransferència: <i>Western blot</i>	91
7.9. Anàlisi de proteïnes per fluorografia.....	92
7.10. Anàlisi de proteïnes per immunofluorescència indirecta en cultius cel·lulars.....	93
7.10.1. Tinció de membrana mitocondrial.....	93
7.10.2. Fixació aldèhica de les cèl·lules.....	93
7.10.3. Permeabilització.....	94
7.10.4. Bloqueig.....	94
7.10.5. Incubació amb els anticossos.....	95

ÍNDIX

7.10.6. Muntatge de les mostres sobre portaobjectes i anàlisi en el microscopi confocal	95
7.11. Expressió i purificació de proteïnes de fusió	95
7.11.1. Inducció dels cultius	96
7.11.2. Obtenció i purificació de proteïnes de fusió a la GST	96
7.11.3. Obtenció i purificació de proteïnes de fusió a la NusA	97
7.12. Anàlisi d'interaccions proteïna-proteïna	99
8. Anticossos per a la immunodetecció de CPT1C	100
8.1. Generació d'anticossos anti-CPT1C	100
8.1.1. Síntesi de l'immunogen, inoculació i sagnat dels conills.	100
8.1.2. Purificació de les Immunoglobulines	101
8.1.3. Anàlisi dels anticossos mitjançant la tècnica de <i>Western blot</i>	101
8.2. Immunodetecció amb l'anticòs anti-CPT1A	102
8.3. Immunodetecció amb altres anticossos	103
9. Espectroscopia de diroisme circular	103
10. Cultius cel·lulars	104
10.1. Condicions de cultiu	104
10.2. Condicions de diferenciació cel·lular	105
10.3. Congelació de cèl·lules	106
10.4. Descongelació de cèl·lules	106
11. Transfeccions cel·lulars	106
11.1. Transfecció transitòria amb reactius lipídics comercials	106
11.2. Obtenció d'extractes cel·lulars i assaig d'activitat luciferasa	107
12. Infecció de cèl·lules amb adenovirus	107
12.1. Adenovirus usats i protocol d'infecció	107
13. Cultiu de llevats: <i>Pichia pastoris</i>	108
13.1. Transformació	108
13.1.1. Preparació de cèl·lules electrocompetents	108
13.1.2. Preparació del DNA	108
13.1.3. Electroporació	109
13.2. Selecció de transformants	109
13.3. Obtenció de la fracció total	109
13.4. Obtenció de la fracció mitocondrial	109
13.5. Obtenció de la fracció microsomal	110
14. Assaig d'activitat Carnitina palmitoiltransferasa	110
14.1. Assaig d'activitat en extractes mitocondrials de llevat	110
14.2. Assaig d'activitat en cèl·lules de mamífer	111
14.3. IC_{50} per Malonil-CoA	112
14.4. K_m i V_{max} per Palmitoil-CoA	112
14.5. K_m i V_{max} per Carnitina	112
15. Experimentació animal	113
16. Anàlisi estadístic	113

ÍNDIX

RESULTATS	115
I. CARACTERITZACIÓ ENZIMÀTICA DE LA CPT1A DE RATA	117
1. Els primers 18 residus de l'extrem aminoterminal de l'enzim CPT1A de rata exerceixen un efecte dominant en determinar la sensibilitat al malonil-CoA respecte les posicions Glu ⁵⁹⁰ i Met ⁵⁹³	118
II. ESTUDI DE DETERMINANTS MOLECULARS DE CPT1B	121
1. Anàlisi de determinants moleculars de la inhibició per malonil-CoA	121
1.1. Els primers 18 aminoàcids de la CPT1B de porc es comporten com un determinant positiu per a la sensibilitat al malonil-CoA	121
1.2. L'intercanvi de la regió N-terminal entre els enzims CPT1B humà i de porc afecta la sensibilitat al malonil-CoA	123
1.3. La posició Glu ¹⁷ és responsable en part de la major sensibilitat al malonil-CoA de la CPT1B de porc.	124
2. Estructura tridimensional de l'enzim CPT1B humà <i>in silico</i>	126
2.1. Model estructural preliminar	126
2.2. Model revisat de la interacció entre les regions amino- i carboxiterminal	128
III. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE <i>Cpt1c</i> I ESTUDI DE LA PROTEÏNA	132
1. Estudi de la regulació transcripcional del gen <i>Cpt1c</i>	132
1.1. <i>Cpt1c</i> no és regulat pel dejuni	132
1.2. La disminució del pes corporal observada en disminuir l'expressió del gen <i>Hmgcs2</i> en fetge no es correlaciona amb canvis en l'expressió del gen <i>Cpt1c</i>	133
1.3. La diferenciació de les cèl·lules Neuro2A no modifica l'expressió de <i>Cpt1c</i>	135
1.4. El tractament amb forskolina no afecta l'expressió de <i>Cpt1c</i> en cèl·lules Neuro2A	136
1.5. AKT no regula els nivells d'expressió de <i>Cpt1c</i> en cèl·lules Neuro2A	137
2. Clonatge i caracterització del promotor del gen <i>CPT1C</i> humà	138
2.1. Anàlisi <i>in silico</i> de la regió 5' del gen	139
2.2. La regió 5' del gen <i>CPT1C</i> humà (-916/+41) té activitat promotora	140
2.3. Caracterització del promotor mínim de <i>CPT1C</i> humà	140
2.4. La regió promotora de <i>CPT1C</i> humà s'activa en resposta a FoxA2	141
2.5. La regió promotora de <i>CPT1C</i> humà s'activa en resposta a CREB	142
3. Estudi de l'activitat enzimàtica de la CPT1C humana	143
3.1. La CPT1C humana recombinant expressada en llevat no té activitat carnitina palmitoiltransferasa	144
3.2. La CPT1C humana recombinant sobreexpressada en cèl·lules de mamífer no té activitat carnitina palmitoiltransferasa	145
3.3. La manca d'activitat CPT1 de la proteïna CPT1C no és deguda a l'extensió C-terminal que presenta	145
3.4. L'extensió C-terminal característica de CPT1C afecta la sensibilitat al malonil-CoA i l'afinitat pels substrats carnitina i palmitoil-CoA de l'enzim CPT1A de rata	146
4. L'anàlisi del TM2 de CPT1C per espectroscopia de dicroisme circular presenta el mateix patró d'estructura secundària que el TM2 de CPT1A	147
5. Anàlisi de la distribució subcel·lular de la CPT1C humana	149
6. Isoforma AK299866 del gen <i>CPT1C</i> humà	150
6.1. Estudi de diferents isoformes del gen <i>CPT1C</i>	150

ÍNDIX

6.2. Identificació d'una nova isoforma de <i>CPT1C</i> expressada en cervell humà	151
6.3. Clonatge i expressió heteròloga de la isoforma AK299866.....	152
6.3.1. La isoforma AK299866 expressada en un sistema eucariota és soluble	152
6.3.2. La isoforma AK299866 expressada en un sistema procariota és soluble.....	153
6.4. La isoforma AK299866 no presenta activitat CPT1 <i>in vitro</i>	154
6.5. La isoforma AK299866 no competeix amb la CPT1A de rata pel malonil-CoA	155
DISCUSSIÓ	157
I. ANÀLISI DE DETERMINANTS MOLECULARS DE LA INHIBICIÓ PER MALONIL-CoA DE L'ENZIM CPT1	159
1. Anàlisi de determinants moleculars de la inhibició de la CPT1A de rata	160
2. Anàlisi de determinants moleculars de la inhibició de la CPT1B humana.....	162
3. Estructura tridimensional de la CPT1B humana.....	165
3.1. Model estructural preliminar	166
3.2. Model revisat de la interacció entre les regions amino- i carboxiterminal	168
II. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE <i>Cpt1c</i> I ESTUDI DE LA PROTEÏNA	173
1. Estudi de la regulació transcripcional de <i>Cpt1c</i>	174
2. Clonatge i caracterització del promotor del gen <i>CPT1C</i> humà	176
3. Anàlisi de l'estructura de la CPT1C humana	178
4. Estudi de l'activitat enzimàtica de la CPT1C humana.....	179
5. Distribució subcel·lular de la CPT1C humana	181
6. Estudi de diferents isoformes del gen <i>CPT1C</i> humà	182
7. Paper del gen <i>CPT1C</i> humà.....	184
CONCLUSIONS	187
BIBLIOGRAFIA.....	191
APÈNDIXS	219
I. ABREVIATURES.....	221
II. CONSTRUCCIONS	222
1. Plasmidis d'expressió en procariotes	222
2. Plasmidis d'expressió en llevats	223
2.1. Construccions amb el cDNA de la CPT1A de rata.....	223
2.2. Construccions amb el cDNA de la CPT1B de porc.....	223
2.2. Construccions amb el cDNA de la CPT1B humana.....	223
2.3. Construccions quimèriques entre els cDNAs de la CPT1B humana i de porc.....	225
2.4. Altres construccions	225
3. Plasmidis d'expressió en eucariotes	226
4. Plasmidis reporters de luciferasa	226
III. OLIGONUCLEÒTIDS	227

ÍNDEX

1. Oligonucleòtids de vectors	227
2. Oligonucleòtids que hibriden amb gens	227
2.1. Oligonucleòtids del gen <i>Cpt1a</i> de rata	227
2.2. Oligonucleòtids del gen <i>CPT1B</i> humà	227
2.3. Oligonucleòtids del gen <i>CPT1C</i> humà	228
2.4. Oligonucleòtids d'altres gens	229
IV. MUTANTS DESCRITS DE DIFERENTS CARNITINA ACILTRANSFERASES	229
PUBLICACIONS	235

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS

L'obesitat es caracteritza per una acumulació d'àcids grassos en el teixit adipós, donant lloc a múltiples problemes de salut (Frühbeck and Gómez-Ambrosi 2003; Medina-Gomez and Vidal-Puig 2005; Slawik and Vidal-Puig 2006). Sabem que és deguda a un desequilibri entre la ingesta i el gast energètic, i que és la causa principal de resistència a insulina i diabetis tipus 2, però, quins canvis es donen en l'organisme per donar lloc a aquesta patologia? Considerant que la incidència d'obesitat i els desordres relacionats estan augmentant fins a índexs pandèmics a nivell mundial, s'estan centrant grans esforços per conèixer els mecanismes moleculars de control de la ingesta i el balanç energètic.

Els animals obtenim l'energia necessària per al funcionament dels òrgans a partir dels nutrients que ingerim en la dieta, essent els dos grans generadors d'energia la glucosa i els àcids grassos. Després d'un àpat, una part dels nutrients s'utilitzen directament per a la producció d'energia, i l'altra part és emmagatzemada en forma de glucogen i triglicèrids per quan hi hagi una manca de substrats energètics en sang. En una situació en què l'aport exogen de nutrients es trobi disminuït (dejuni) o en què els requeriments energètics estiguin augmentats (exercici físic), l'energia s'obté d'aquests dipòsits, i teixits com el teixit adipós blanc i el fetge alliberen glucosa, cossos cetònics i àcids grassos lliures al torrent sanguini per al manteniment del funcionament de l'organisme. El risc a sobrepès i obesitat apareix quan, de forma prolongada, l'aport de nutrients és major al gast energètic, o bé no s'allibera suficient energia dels dipòsits quan aquesta és requerida.

Davant la demanda energètica, els teixits poden seleccionar entre els diferents substrats disponibles, depenent de les condicions metabòliques específiques. L'enzim Carnitina palmitoïltransferasa 1 (CPT1) permet l'entrada dels àcids grassos de cadena llarga a la matriu mitocondrial per tal de ser degradats i utilitzats així com a substrat energètic. El malonil-CoA, primer intermediari en la síntesi d'àcids grassos, és un inhibidor al·lostèric de CPT1, fet que permet una regulació coordinada entre la síntesi i l'oxidació d'àcids grassos en un mateix teixit, evitant així que es donin ambdós processos alhora. Una inhibició específica de CPT1, doncs, és una bona aproximació farmacològica per al tractament de desordres metabòlics que impliquin acumulació d'àcids grassos i resistència a insulina, com la diabetis tipus 2 i l'obesitat.

La present tesi doctoral s'ha centrat en l'estudi de la regulació per malonil-CoA dels isotips hepàtic (CPT1A) i muscular (CPT1B) de CPT1, així com en l'estudi de l'isotip més recentment descrit de la proteïna d'expressió en cervell, CPT1C. Concretament, els objectius d'aquest treball han estat:

1. Analitzar quin efecte exerceix la regió aminoterminal dels enzims CPT1A i CPT1B sobre la regulació per l'inhibidor fisiològic, malonil-CoA.
2. Construir un model tridimensional de la proteïna CPT1B humana, que expliqui les diferències de comportament cinètic que presenta respecte la CPT1A.
3. Estudiar la regulació transcripcional del gen *CPT1C* humà, així com la funció de la proteïna.

INTRODUCCIÓ

I. METABOLISME DELS ÀCIDS GRASSOS

Els lípids, principalment en forma de triglicèrids (TG), constitueixen entre un 5 i un 25% del pes corporal dels mamífers, acumulats majorment en el teixit adipós. Són el major dipòsit d'energia metabòlica, principalment per teixits com el múscul i el fetge, l'oxidació del qual proporciona 2.25 vegades més energia calòrica que del glicogen o dipòsits proteics. A més a més, els lípids participen d'altres processos tan importants per l'organisme com són la formació de membranes cel·lulars, hormones, vitamines, aïllants tèrmics i reguladors metabòlics.

Els TG procedents de la dieta no poden ser absorbits per l'intestí, per això són hidrolitzats per acció de lipases específiques del tub digestiu, alliberant una molècula de glicerol i tres àcids grassos, un procés conegut com **lipòlisi**. Una petita porció d'aquests àcids grassos és capaç de circular lliurement pel torrent sanguini (FFA, *free fatty acids*), però degut a la seva naturalesa hidrofòbica, són molècules insolubles en un medi aquós. Així, cal que siguin complexats a albúmina, o bé esterificats de nou al glicerol, formant TG que seran empaquetats en partícules lipoproteïques per al seu transport, com poden ser els quilomicrons. Per acció de la lipoproteïna lipasa (LPL), associada a cèl·lules endotelials dels capil·lars, els àcids grassos (FA) seran novament alliberats permetent la seva captació per part dels teixits (Figura I.1).

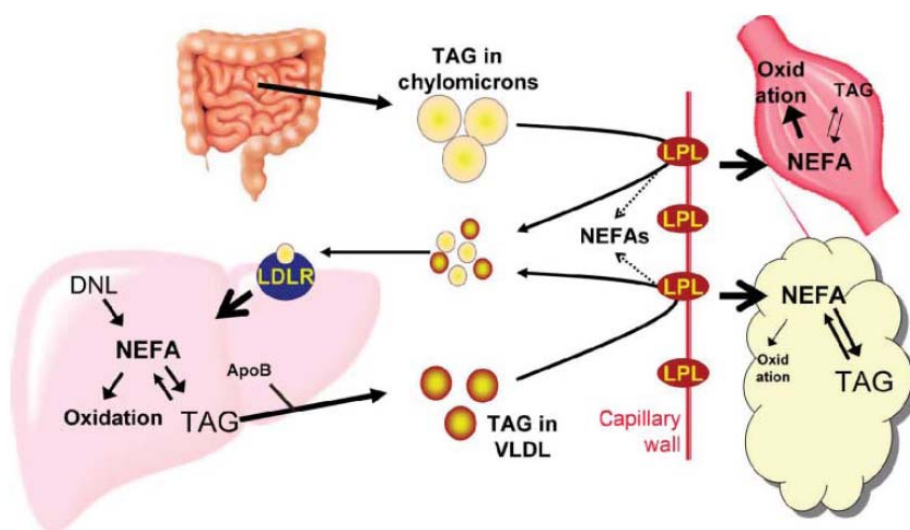


Figura I.1. Esquema resum del trànsit de FFA i TG en l'organisme. TAG, triglicèrids; NEFA, àcids grassos lliures; LPL, lipoproteïna lipases; VLDL, lipoproteïna de molt baixa densitat; DNL, lipogènesi *de novo*; LDLR, receptor d'LDLs, lipoproteïna de baixa densitat. Extret de (Macfarlane, Forbes et al. 2008).

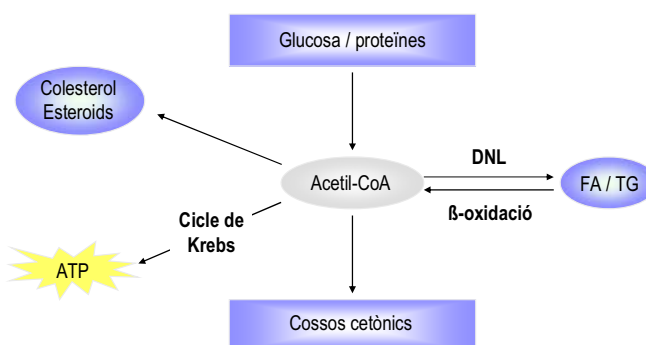
INTRODUCCIÓ

En el cas dels àcids grassos de cadena curta o mitja (de 4 a 12 carbonis) la difusió a través dels enteròcits es dona de forma passiva, així que són absorbits directament del tub digestiu al torrent sanguini, per on circulen lliurement com la resta de nutrients.

Com s'observa a la figura I.1, en el teixit adipós els FFA són principalment reesterificats i emmagatzemats com a TG en el citoplasma, agrupats en gotes lipídiques, formant un gran glòbul que pot arribar a ocupar gairebé tot el volum cel·lular. Alternativament, teixits com el fetge o el múscul empren els FFA circulants principalment com a substrat energètic, tot i que també reserven petits dipòsits en forma de TG.

En situacions d'estrès metabòlic (dejuni o exercici físic), hormones com el glucagó i l'adrenalina activen la lipasa sensible a hormona (HSL) del teixit adipós alliberant FFA al torrent sanguini, (Stamp 1966; Berg, Tymoczko et al. 2007), per tal que puguin ser utilitzats com a combustible energètic per la resta de teixits. La insulina, que en situacions de dejuni prolongat es troba en molt baixos nivells en sang, inhibeix aquest procés. En el fetge, una part d'aquests FA seran re-esterificats a TG i secretats al torrent sanguini en forma de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), o bé parcialment β -oxidats en el mitocondri donant lloc a acetil-CoA. Aquest acetil-CoA serà utilitzat per a la síntesi de cossos cetònics, que seran també alliberats a la sang com a recurs energètic per a teixits com el cervell (Kersten, Seydoux et al. 1999). Així, la lipòlisi és un procés que permet tant la mobilització de FA des dels seus dipòsits, com la seva oxidació per a l'obtenció d'energia.

Figura I.2. Destí metabòlic de l'acetil-CoA cel·lular. La glucosa, les proteïnes i els àcids grassos (FA) són oxidats per produir acetil-CoA. Aquest acetil-CoA es pot incorporar, a continuació, al cicle de Krebs 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 per produir cossos cetònics. La síntesi de colesterol així com de components de membrana és un destí comú de l'acetil-CoA en tots els teixits.



La **lipogènesi** o síntesi *de novo* (DNL, *De novo lipogenesis*) que es dona en teixits com el teixit adipós o el fetge és una altra font de FA en el torrent sanguini. L'etapa limitant d'aquest procés és la síntesi de malonil-CoA a partir d'acetil-CoA, reacció catalitzada per l'ACC (*Acetyl-*

INTRODUCCIÓ

CoA carboxylase). Posteriorment, el complex citosòlic enzimàtic FAS (*Fatty acid synthase*), condensarà malonil-CoA i acetil-CoA per a la síntesi de FA de cadena llarga saturada. Contràriament a la lipòlisi, la insulina activa aquest procés, mentre que l'adrenalina, el glucagó i els propis FFA l'inhibeixen (Hillgartner, Salati et al. 1995). Recentment, s'ha relacionat la DNL amb el control fisiològic de la ingesta (López, Lage et al. 2008).

1. Oxidació dels àcids grassos

La degradació dels àcids grassos és essencial en situacions amb elevada demanda energètica com el dejuni o l'exercici físic quan, a més a més, l'organisme no consumeix glucosa principalment procurant mantenir-ne uns nivells basals per la utilització per teixits com el cervell. Representen el major substrat metabòlic del cos humà, ja que es troben acumulats en forma anhidra al teixit adipós, amb una densitat energètica superior a la glucosa.

1.1. Alliberament dels àcids grassos

El primer pas que es dona en l'oxidació dels FA és la hidròlisi de TG per les lipases (lipòlisi), ja sigui en el mateix tub digestiu com en el teixit adipós, amb el posterior alliberament de FA al torrent sanguini. Una porció molt petita circulen lliurement (FFA), tot i que la gran majoria circulen complexats a l'albumina, que disposa de tres llocs d'unió d'alta afinitat als FA (Spector 1986). Així, la disponibilitat dels llocs d'unió a l'albumina és un factor limitant del transport de FA a la resta de teixits. De tota manera, es coneix que el *turnover* dels àcids grassos en sang és molt elevat, de manera que el procés de sortida, transport i entrada als teixits és un procés molt ràpid (Pownall and Hamilton 2003).

1.2. Entrada al citosol cel·lular i activació a acils-CoA

Els àcids grassos de cadena llarga (LCFA, més de 12 àtoms de carboni) no poden travessar la membrana citoplasmàtica per difusió passiva, sinó que el principal sistema d'entrada al citoplasma cel·lular és a través de transportadors específics. El sistema de transport dels FA a l'interior cel·lular és un procés altament regulat, que es dona per dos mecanismes diferents: un transport directe a través de la membrana, mediat pels transportadors FAT/CD36 (*Fatty acid translocase*) i FABP_{pm} (*Fatty acid binding protein membrane bound*), i un transport acoblat a l'esterificació amb un CoA, mediat en aquest cas pel transportador FATP (*Fatty acid transport protein*) juntament amb la FACS (*Fatty acyl-CoA synthetase*) [revisat per (Kalant and Cianflone 2004)].

INTRODUCCIÓ

La FAT/CD36 és una proteïna unida a la membrana plasmàtica de la família dels receptors *scavengers* (Abumrad, el-Maghrabi et al. 1993; Harmon and Abumrad 1993). Es coneix que pot unir-se a diferents tipus de molècules a part dels FA, i que facilita la transducció de senyals responsables de l'activació d'enzims que catalitzen la conversió de l'àcid araquidònic a diferents metabòlits bioactius (Abumrad, Harmon et al. 1998). Recentment, s'ha demostrat que FAT/CD36 no es troba en contacte amb CPT1 en els *contact sites* (CS, Introducció, apartat II.4.3), com s'havia considerat anteriorment, sinó a la membrana mitocondrial externa, amb un possible rol regulador de la FACS, contribuint al transport dels LCFA a la matriu mitocondrial (Smith, Jain et al. 2011).

La FABP_{mp} és idèntica a l'aspartat amino transferasa mitocondrial (mAspAT) i la seva expressió es correlaciona amb la captació d'oleic, que pot ser selectivament inhibida amb anticossos contra la proteïna (Stremmel, Lotz et al. 1985; Stremmel and Theilmann 1986; Berk 1996).

L'any 1994 es van identificar dues proteïnes, FATP i FACS, capaces d'augmentar l'acumulació intracel·lular de FA (Schaffer and Lodish 1994). Amb el temps s'han identificat fins a sis isoformes diferents de FATP (enumerades de la 1 a la 6). Es coneix que FATP1 és una proteïna integral de membrana, que té un paper fonamental en el transport dels LCFA a través de la membrana citoplasmàtica i en l'activació dels VLCFA a acils-CoA (Hirsch, Stahl et al. 1998).

La FACS, que pertany a la gran família de proteïnes *ATP-AMP binding proteins*, juga un paper també crucial en el transport i activació dels FA. De fet, s'ha observat un efecte sinèrgic amb la FATP en la captació dels LCFA, co-localitzant ambdues proteïnes a la membrana plasmàtica (Gargiulo, Stuhlsatz-Krouper et al. 1999), i s'ha vist que la pròpia FATP1 té activitat FACS (Hall, Smith et al. 2003). El fet que es pogués mesurar la seva activitat tant en extractes de membrana com en extractes solubles de bacteri, suggerí que l'enzim es mou entre el citosol i la membrana citoplasmàtica per facilitar l'esterificació dels FA exògens al Coenzim A (Overath, Pauli et al. 1969). Posteriorment, però, es van descriure diferents FACS associades a mitocondris de mamífers, segons la longitud de la cadena carbonada del FA que reconeixen. Així, les FACS per FA de cadena curta (SCFA) i mitja (MCFA), es localitzen a la matriu mitocondrial i el mateix enzim per als LCFA sembla ser una proteïna transmembrana associada a la membrana mitocondrial externa amb, com a mínim, el domini d'unió a CoA citosòlic (Eaton, Bartlett et al. 1996). S'ha suggerit que la formació d'acils-CoA evitaria la sortida dels LCFA de la

INTRODUCCIÓ

cèl·lula i alhora, disminuiria la concentració intracel·lular de FFA, creant un gradient extra-intracel·lular que afavoriria l'entrada d'aquests (Black and DiRusso 2003).

1.3. Distribució intracel·lular

Un cop a l'interior cel·lular, segons el teixit i l'estat metabòlic de l'animal, aquests acils-CoA poden derivar-se cap a l'oxidació, la cetogènesi, l'esterificació a colesterol i esfingolípids o la síntesi de TG, fosfolípids, ceramides, diacilglicerol i àcid araquidònic, així com actuar de reguladors de l'expressió gènica en el nucli (McGarry and Foster 1980; Zammit 1984; Prentki and Corkey 1996; Faergeman, Black et al. 2001).

Com s'observa a la figura 1.3, els FA són distribuïts mitjançant les FABP (*Fatty-acid binding protein*), que els confereixen solubilitat i faciliten el transport des de la membrana citoplasmàtica cap als diferents orgànuls on es donen els seus diferents destins metabòlics. Així, i donat que tant els FA, com els seus derivats lipídics, tenen una influència directa o indirecta en diferents processos cel·lulars, la correcta funcionalitat de les FABP té un paper important en modular totes aquestes funcions [revisat per (Zimmerman and Veerkamp 2002)].

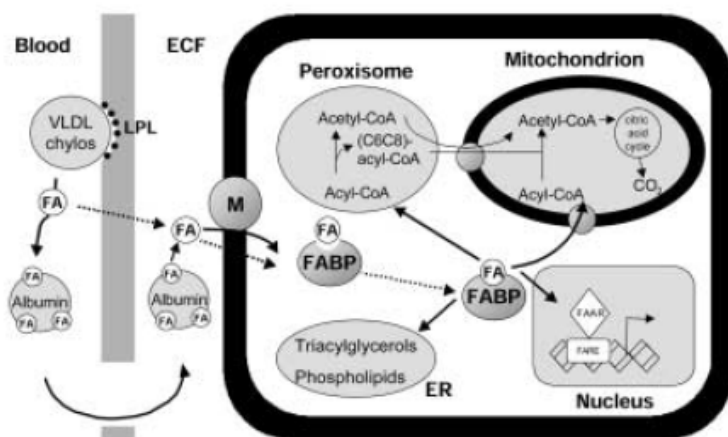


Figura 1.3. Representació esquemàtica del paper de les FABPs en la captació i el trànsit intracel·lular dels FA. Un cop a l'interior cel·lular, els FA són distribuïts entre compartiments subcel·lulars mitjançant les FABP, de les quals també se n'ha descrit l'expressió a l'interior del nucli. Extret de (Zimmerman and Veerkamp 2002).

1.4. Entrada a la matriu mitocondrial

La β -oxidació dels FA té lloc principalment a la matriu mitocondrial. Els SCFA i MCFA poden travessar la membrana per difusió passiva i són activats a acils-CoA a la pròpia matriu mitocondrial abans de la seva oxidació. Contràriament, els LCFA, necessiten, un cop activats i convertits en acils-CoA, d'un sistema de transport que els permeti travessar la membrana mitocondrial, que els és impermeable. El sistema transportador és un complex enzimàtic

INTRODUCCIÓ

anomenat Carnitina palmitoiltransferasa (CPT), que estudiarem en profunditat a l'apartat II d'aquesta Introducció.

1.5. Oxidació a acetil-CoA

La β -oxidació dels FA de cadena lineal és el principal procés productor d'energia, tot i que no és l'únic. Alguns FA, com els de cadena impar, ramificada o els insaturats requereixen, per a la seva oxidació, modificacions de la β -oxidació o rutes metabòliques diferents, com poden ser l' α -oxidació (Casteels, Foulon et al. 2003), l' ω -oxidació (Wanders, Komen et al. 2011) o l'oxidació peroxisòmica (Wanders 2004). En aquesta línia, altres orgànuls com els peroxisomes o el reticle endoplasmàtic poden també captar els acils-CoA citosòlics i obtenir-ne acetil-carnitines o altres metabòlits de rutes diferents a la β -oxidació, com són la síntesi de TG o el manteniment del *pool* d'acetil-CoA de la cèl·lula. Així, s'ha postulat que els àcids grassos de cadena més llarga, abans d'incorporar-se a la β -oxidació mitocondrial, són degradats als peroxisomes per acció de la COT (Carnitina octanoiltransferasa) fins a octanoil-CoA.

Aquí ens centrarem a detallar només els processos que tenen lloc durant la β -oxidació mitocondrial, un cop els FA es troben activats a acils-CoA.

En la β -oxidació mitocondrial, un acil-CoA saturat es degrada mitjançant una seqüència repetitiva de quatre reaccions: oxidació lligada a FAD, hidratació, oxidació lligada a NAD⁺ i tiòlisi per CoA. Així, es van eliminant seqüencialment unitats de dos àtoms de carboni des de l'extrem carboxil de l'acil-CoA generant-se FADH₂, NADH i acetil-CoA, que s'incorpora al cicle de Krebs per continuar la seva oxidació fins a CO₂. El procés rep aquest nom perquè és el carboni C3= β del FA el que s'oxida, originant un cetoàcid previ al trencament de l'enllaç C2-C3 de l'acil-CoA.

Com s'observa a la figura 1.4, la primera reacció en cada cicle de degradació és catalitzada per l'acil-CoA deshidrogenasa, donant lloc a un enoïl-CoA amb un doble enllaç trans entre els carbonis C2 i C3. Existeixen diferents enzims per cada pas de la via, que es diferencien en l'especificitat per la llargada de la cadena hidrocarbonada del FA. Així, s'han descrit la SCAD (*short-chain acyl-CoA dehydrogenase*), la MCAD (*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*) i la LCAD (*long-chain acyl-CoA dehydrogenase*), tots tres enzims situats a la matriu mitocondrial (Thorpe and Kim 1995), i la VLCAD (*very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*), situat a la membrana mitocondrial interna (Izai, Uchida et al. 1992). Cadascun d'aquests enzims catalitza la formació de 2-enoïl-CoA corresponent a l'éster saturat del FA.

INTRODUCCIÓ

La següent etapa és la hidratació del doble enllaç trans entre C2 i C3 i és catalitzada per la 2-enoil-CoA hidratasa, generant L-3-Hidroxiacil-CoA. De nou una deshidrogenasa (L-3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) realitzarà la segona oxidació del procés, que converteix el grup C3 en un grup *ceto* tot generant NADH. Finalment, una cetoacil-CoA tiolasa (β -cetotiolasa) s'encarrega d'escindir una molècula d'acetil-CoA de l'acil-CoA, ara amb dos carbonis menys que a l'inici del procés.

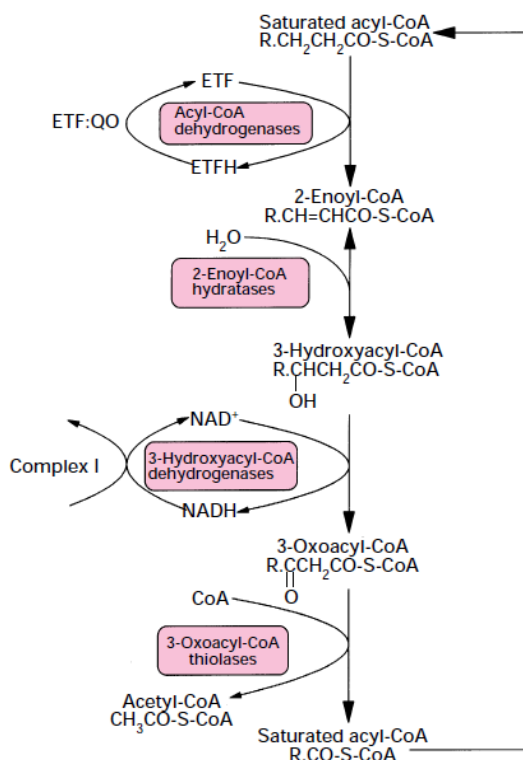


Figura I.4. Enzims de la β -oxidació mitocondrial.

El procés de β -oxidació consta de quatre reaccions enzimàtiques catalitzades per: 1.- Acil-CoA deshidrogenasa, 2.- 2-Enoil-CoA hidratasa, 3.- 3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa i 4.- 3-Oxoacil-CoA tiolasa. 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. Extret de (Eaton, Bartlett et al. 1996).

Mentre hi hagi els reactius necessaris de cada reacció, l'acil-CoA escurçat anirà experimentant cicles d'oxidació fins degradar-se completament a acetil-CoA. Així, per exemple, l'oxidació completa del palmitoil-CoA (16 àtoms de carboni) requereix set cicles de reacció, alliberant 2 molècules d'acetil-CoA en l'últim cicle, per tant, 8 molècules en total. L'energia en forma d'ATP obtinguda prové, doncs, de l'oxidació per la cadena respiratòria de les molècules de NADH i $FADH_2$ formades i, en cas que l'acetil-CoA s'hi incorpori, de l'energia obtinguda al degradar-se pel cicle de Krebs. En teixits com el fetge i en condicions de manca de substrats metabòlics, el principal destí de l'acetil-CoA format en la β -oxidació és la cetogènesi.

II. SISTEMA CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA

El sistema Carnitina palmitoïltransferasa (CPT) regula la translocació dels àcids grassos de cadena llarga a través de la membrana mitocondrial per tal de ser oxidats. Alteracions en la funcionalitat d'aquest sistema enzimàtic tenen efectes simultanis en el metabolisme dels àcids grassos i la glucosa. Per aquest motiu, s'ha proposat el sistema CPT com una diana farmacològica per al tractament de malalties com l'obesitat i la diabetis tipus 2, caracteritzades per una resistència a insulina perifèrica i una desregulació del metabolisme lipídic.

A diferència dels SCFA i els MCFA, els LCFA no poden travessar la membrana mitocondrial per difusió passiva, sinó que requereixen un sistema de transport específic: el sistema CPT. Aquest sistema està format per tres enzims: la Carnitina Palmitoïltransferasa 1 (CPT1), que catalitza la reacció de transesterificació d'acils-CoA a acilcarnitina (Introducció, apartat III); la Carnitina Acilcarnitina Translocasa (CACT), que intercanvia molècules d'acilcarnitina per carnitina lliure a través de la membrana mitocondrial interna; i la Carnitina Palmitoïltransferasa 2 (CPT2), que catalitza la reacció inversa a la CPT1, alliberant una molècula de carnitina lliure, i l'acil-CoA resultant a la matriu mitocondrial per tal de ser β -oxidat (Figura I.5).

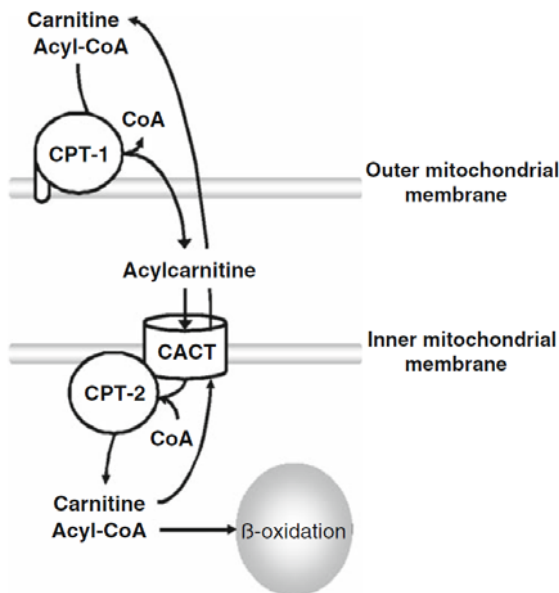


Figura I.5. Entrada dels FA al mitocondri facilitada pel sistema CPT. La β -oxidació mitocondrial s'inicia amb l'entrada dels LCFA activats (acils-CoA) a la matriu mitocondrial pel sistema Carnitina palmitoïltransferasa, que inclou els enzims: CPT1 (carnitina palmitoïltransferasa 1), CACT (carnitina acilcarnitina translocasa) i CPT2 (carnitina palmitoïltransferasa 2). Extret de (Rufer, Thoma et al. 2009).

La CPT1 és l'enzim clau de la via, és a dir, el rendiment de β -oxidació de la cèl·lula depèn de la seva funcionalitat, essent la inhibició de l'activitat CPT1 per malonil-CoA el principal punt de regulació del sistema (Introducció, apartat II.4.4). Donat que el malonil-CoA és el primer intermediari en la síntesi de FA, la inhibició que aquest exerceix sobre CPT1 és un punt de regulació coordinada entre la síntesi i la degradació de grasses en un mateix teixit.

INTRODUCCIÓ

1. Carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1)

La CPT1 és un enzim de la família de les carnitina aciltransferases, que catalitza la reacció de transesterificació dels acils-CoA de cadena llarga (LCFA-CoA) amb carnitina tot generant acilcarnitines de cadena llarga (Figura I.5).

De la resta de membres de la família, és la única que té un accés directe al *pool* citosòlic d'acils-CoA [revisat per (Ramsay and Zammit 2004)]. 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 irreversiblement per molècules 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 (Introducció, apartat III).

2. Carnitina acilcarnitina translocasa (CACT)

La CACT catalitza la translocació per difusió passiva de molècules de carnitina lliure per acilcarnitines de cadena llarga, permetent així la seva entrada a la matriu mitocondrial (Figura I.5). Es troba principalment situada a la membrana mitocondrial interna, formant part del sistema CPT de transport dels acils-CoA de cadena llarga a la matriu mitocondrial. S'ha descrit també la seva localització a la membrana peroxisomal, facilitant no només l'entrada de les acilcarnitines de cadena llarga, sinó també la sortida dels productes de la β -oxidació peroxisomal per tal que puguin ser transportats al mitocondri i així oxidar-se totalment a acetil-CoA (Fraser and Zammit 1999).

La proteïna fou identificada i purificada de fetge de rata l'any 1990 (Indiveri, Tonazzi et al. 1990), i el gen humà va ser clonat i mapejat en el locus cromosòmic 3p21.31, caracteritzant una proteïna de 33.13KDa (301 aminoàcids) (Huizing, Iacobazzi et al. 1997). No s'han descrit diferents isoformes del gen, i s'expressa constitutivament en tots els teixits. De la família de transportadors mitocondrials, es tracta d'una proteïna integral de membrana, organitzada en tres unitats estructurals en tàndem, plegades en dos dominis transmembrana. Així, els extrems amino- i carboxiterminal i dos petits *loops* hidrofòbics es troben encarats a l'espai intermembrana, mentre que els altres tres *loops*, més grans, estan exposats a la cara citosòlica de la membrana.

Conté una seqüència específica d'unió a la carnitina propera a la regió carboxiterminal: R(A,S)(V,F)PANAA(T,C)F (De Lucas, Domínguez et al. 1999), i s'ha descrit que deleccions i

INTRODUCCIÓ

insercions en la seqüència de la proteïna produeixen efectes dràstics en la seva estructura. S'han realitzat diferents estudis amb mutacions puntuals de la proteïna (Tonazzi, Giangregorio et al. 2009; Giangregorio, Tonazzi et al. 2010; Tonazzi, Console et al. 2012).

S'han descrit diferents substrats de la CACT, 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. Així, en condicions normals, la direcció de translocació dels acils-CoA és cap a la matriu mitocondrial, en una relació 1:1 respecte molècules de carnitina lliure transportades (Indiveri, Tonazzi et al. 1994). Però s'ha vist que en determinades condicions, els enzims CACT i CPT2/CAT poden operar en direcció contrària, tot disminuint la concentració d'acils-CoA de cadena curta, mitja i llarga a l'interior mitocondrial, que podrien afectar la seva integritat per les seves propietats detergents. De la mateixa manera, els productes de l'oxidació peroxisomal poden ser translocats per la CACT per tal de ser β -oxidats a la matriu mitocondrial [revisat per (Kerner and Hoppel 2000)].

3. Carnitina palmitoïltransferasa 2 (CPT2)

La CPT2, membre de la família de les carnitina aciltransferases, catalitza la reacció inversa de la CPT1, generant acils-CoA que podran ser β -oxidats a la matriu mitocondrial (Figura 1.5).

La proteïna és inicialment sintetitzada com un precursor amb un pèptid de direccionament mitocondrial a l'extrem aminoterminal. Un cop dins el mitocondri, el pèptid és escindit, resultant en una proteïna madura de 71kDa, dèbilment associada a la membrana interna mitocondrial (Brown, Esser et al. 1991). Posteriorment es relacionà la regió aminoterminal de CPT1, absent en CPT2, amb la sensibilitat al malonil-CoA de CPT1 (Kolodziej and Zammit 1993; Cohen, Kohl et al. 1998), fet que explica que CPT2 sigui insensible a la inhibició (Murthy and Pande 1987; Finocchiaro, Colombo et al. 1990; Woeltje, Esser et al. 1990).

El tractament d'extractes mitocondrials amb detergents permet la solubilització i purificació de la proteïna nativa, que pot ser expressada en alt rendiment en *Escherichia coli* (Brown, Sen et al. 1993). Tot i que inicialment es postulà una possible associació de CPT2 en forma d'homotetràmers (Finocchiaro, Colombo et al. 1990), la publicació de l'estructura cristal·lina de la proteïna (Hsiao, Jogl et al. 2006; Rufer, Thoma et al. 2006) i d'un model *in silico*

INTRODUCCIÓ

d'aquesta associada a membrana (Rufer, Lomize et al. 2007) suggereix que, *in vivo*, l'enzim es troba en forma de monòmer.

A diferència de CPT1, existeix una sola isoforma de CPT2 que presenta una expressió ubíqua tant en rates com en humans (Demaugre, Bonnefont et al. 1990; Woeltje, Esser et al. 1990; Woeltje, Esser et al. 1990), que no es veu significativament alterada per ni pel naixement ni per la dieta rica en grasses de les rates nounades (Thumelin, Esser et al. 1994; Asins, Serra et al. 1995). S'ha descrit que 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, Serra et al. 1994; Chatelain, Kohl et al. 1996). En els teixits hepàtic i renal de rates i ratolins adults, el dejuni provoca un augment de l'activitat CPT2 (Thumelin, Esser et al. 1994; Hashimoto, Cook et al. 2000). S'ha identificat un sol locus cromosòmic de *CPT2* que, en humans, es localitza en el 1p32 (Gellera, Verderio et al. 1994).

Igual que en el cas de la CACT, el fet que la CPT2 pugui operar en direcció contrària en determinades condicions, pot ser important pel manteniment de la integritat mitocondrial, evitant l'acumulació d'acils-CoA de cadena llarga i acilcarnitines, que exerceixen un efecte detergent [revisat per (Kerner and Hoppel 2000)].

4. Mecanismes de control del sistema CPT

L'activitat de CPT1 augmenta durant el dejuni (Grantham and Zammit 1987) i disminueix en resposta a la insulina (Park, Mynatt et al. 1995), mentre que la COT, per exemple, no és regulada durant el dejuni (Saggerson and Carpenter 1981). Igualment, els nivells d'mRNA i activitat de CPT2 es troben augmentats durant el dejuni i la diabetis [revisat per (Ramsay, Gandour et al. 2001)].

La inhibició del sistema CPT en fetge produeix una disminució de la cetogènesi, en inhibir la producció d'acetyl-CoA que es dona en la β -oxidació (McGarry and Foster 1980). A més a més, però, també es veuran afectats molts altres processos que van des de la síntesi, secreció i regulació de la sensibilitat a la insulina, com el control de la ingesta, donat que tant els ésters d'acils-CoA com els productes del seu metabolisme (diacilglicerols, ceramides) afecten processos que controlen la funció de diferents tipus cel·lulars implicats en funcions fisiològiques importants [revisat per (Zammit 2008)].

INTRODUCCIÓ

En aquest capítol analitzarem els diferents estímuls que regulen la funcionalitat del sistema CPT.

4.1. Regulació transcripcional

Els nivells d'mRNA de *CPT1A* augmenten just després del naixement, coincidint amb la lactància, una dieta rica en grasses i baixa en carbohidrats (Thumelin, Esser et al. 1994). A més a més, també es troben augmentats durant el dejuni i en la diabetis, situacions en què es dona un augment de FFA i de disponibilitat de glucosa, i la insulina inhibeix l'expressió del gen en fetge (Park, Mynatt et al. 1995). En el mateix sentit, el dejuni augmenta l'expressió de la *CACT* (Sekoguchi, Sato et al. 2003) i la resistència a insulina la disminueix (Peluso, Petillo et al. 2002), mentre que la *CPT2* no és regulada per insulina (Thumelin, Esser et al. 1994; Chatelain, Kohl et al. 1996).

Estudis en hepatòcits primaris de rata (Chatelain, Kohl et al. 1996) mostraren un augment de l'expressió de *CPT1A* en resposta als LCFA-CoA, tant saturats com insaturats, efecte antagonitzat per la insulina (Assimacopoulos-Jeannet, Thumelin et al. 1997) i mediat en part pel factor de transcripció PPAR. De fet, aquest factor de transcripció és activat pels àcids grassos i al seu torn està implicat en la regulació de nombrosos gens del metabolisme lipídic, com la lipoproteïna lipasa, la *FABP*, l'acil-CoA oxidasa i molts altres (Keller, Dreyer et al. 1993; Gulick, Cresci et al. 1994; Schoonjans, Staels et al. 1996; Kliewer, Sundseth et al. 1997; Latruffe and Vamecq 1997). Així, s'han descrit elements de resposta a PPAR α funcionals en els promotors humans de *CPT1A* (Leone, Weinheimer et al. 1999; Gilde and Van Bilsen 2003; Napal, Marrero et al. 2005), *CPT1B* (Brandt, Djouadi et al. 1998; Mascaró, Acosta et al. 1998; Yu, Lu et al. 1998) i *CPT2* (Barrero, Camarero et al. 2003). Sembla que PPAR β/δ són activadors encara més potents que PPAR α de l'expressió de *CPT1B* (Gilde, van der Lee et al. 2003; Oishi, Manabe et al. 2008).

S'ha descrit que l'expressió de la *CACT* és induïda en múscul esquelètic per PPAR γ (Lapsys, Kriketos et al. 2000) i en fetge per PPAR α i PPAR δ (Gutgesell, Wen et al. 2009). Recentment, estudis del nostre grup han demostrat que PGC1 β indueix l'activació transcripcional de la *CACT* a través de la unió d'ERR α a un ERRE localitzat a la regió promotora del gen (Gacias, Pérez-Martí et al. 2012).

Estudis amb hepatòcits fetals mostraren un augment en l'expressió de *CPT1A* en resposta als LCFA (i no als LCFA-CoA), que presenten alts nivells per la dieta rica en grasses

INTRODUCCIÓ

aportada per la llet materna (Chatelain, Kohl et al. 1996). Posteriorment es demostrà que era una activació independent de PPAR α , tant per una activació directa del gen a través d'elements del primer intró (Louet, Chatelain et al. 2001; Le May, Caüzac et al. 2005), com per una estabilització del seu mRNA (Park, Mynatt et al. 1995).

L'hormona tiroidea (T3) és un altre regulador de l'expressió de *CPT1A* amb importants efectes en la β -oxidació hepàtica (Heimberg, Olubadewo et al. 1985; Barrero, Marrero et al. 2000; Jansen, Cook et al. 2000; Louet, Le May et al. 2001), efectes mediatos pel receptor de l'hormona tiroidea formant heterodímer amb RXR (*Retinoid X Receptor*). S'ha descrit que PGC1 α (Song, Zhang et al. 2004; Zhang, Ma et al. 2004) i PGC1 β (Sadana, Zhang et al. 2007) actuen com a *enhancers* de la inducció de *CPT1A* mediada per l'hormona tiroidea, tot i que existeixen diferències en el mecanisme d'acció d'ambdues isoformes.

En resposta al glucagó, l'augment dels nivells d'AMPc intracel·lulars activen la PKA que al seu torn fosforila CREB, capaç de regular la transcripció de gens clau del metabolisme glucídic i lipídic (Montminy, Koo et al. 2004), tot promovent el canvi d'utilització de glucosa a àcids grassos en situacions de dejuni i exercici físic (Herzig, Long et al. 2001). Louet i col·laboradors demostraren que l'activació de *CPT1A* en resposta al glucagó requereix la formació d'un complex multiproteic de resposta a l'AMPc (CRU: *cAMP Reponse Unit*) a la regió promotora del gen (Roesler 2000), que inclou el co-activador PGC1, HNF4 i CREB (Louet, Hayhurst et al. 2002).

D'altra banda, en resposta a la insulina, l'activació de la via d'AKT/PI3K (Alessi, James et al. 1997) resulta en una repressió de l'expressió dels gens d'oxidació de FA com la *CPT1A* a través de la fosforilació dels factors de transcripció FoxOs (Wolfrum, Asilmaz et al. 2004; Silva, von Meyenn et al. 2009).

Sorprenentment, i a diferència de *CPT1A*, la *CPT1B* no és regulada pel dejuni (Paulson, Ward et al. 1984), ni per l'hormona tiroidea ni per insulina (Cook, Otto et al. 1980; Bremer 1981; Cook and Park 1999).

4.2. Regulació post-traducciona

La modificació post-traducciona més descrita dels enzims CPT és la fosforilació. Recentment s'ha relacionat la fosforilació *in vitro* de *CPT1A* dels residus Ser⁷⁴¹ i Ser⁷⁴⁷ amb un augment de l'activitat catalítica de la proteïna i una regulació de la sensibilitat a l'inhibidor malonil-CoA (Kerner, Distler et al. 2004). Tot i que aquestes posicions no es troben conservades en *CPT2*, el model estructural situa la regió corresponent d'aquesta proteïna (residus 627-633)

INTRODUCCIÓ

en un *loop* fàcilment accessible per a modificacions post-traduccionals (Kerner, Distler et al. 2004; Distler, Kerner et al. 2007).

Altres llocs de fosforilació identificats *in vivo* són els residus Thr⁵⁸⁸ i Thr⁶⁰⁴ (Kerner, Distler et al. 2004; Distler, Kerner et al. 2007), que per homologia es corresponen a les posicions Thr⁴⁸⁵ i Thr⁵⁰¹ de CPT2 de rata. La fosforilació d'aquests residus tindria un efecte en l'afinitat pels substrats i en l'activitat catalítica dels enzims. La localització en el model, però, mostra que són llocs estèricament inaccessibles per una quinasa convencional, motiu pel qual s'ha suggerit que la reacció de fosforilació es podria donar durant la transcripció de CPT1A (Indiveri, Tonazzi et al. 1994).

No es coneix encara quin efecte en l'estructura podria tenir la fosforilació d'aquests residus, però és evident que provocaria canvis en la unió als substrats i a l'inhibidor, i per tant, calen estudis més profunds en aquest aspecte, sobretot, de cara a conèixer la diferència en els efectes produïts pels inhibidors de CPT1.

S'han descrit altres modificacions post-traduccionals de CPT1, com poden ser la nitració dels residus Tyr²⁸² i la posició altament conservada Tyr⁵⁸⁹ (Tyr⁴⁸⁶ en CPT2 de rata), així com l'acetilació de l'Ala² de CPT1, tot i que es creu que es podria tractar de mecanismes més aviat al·lostèrics o patològics de regulació de l'activitat i l'estabilitat de l'enzim [revisat per (Rufer, Thoma et al. 2009)].

4.3. Influència de l'entorn membranós

El mitocondri és un orgànul d'estructura complexa i dinàmica, amb habilitat per dividir-se i fusionar-se contínuament. En conseqüència, la membrana pot presentar grans variacions en la seva composició, fluïdesa, disposició i permeabilitat, motiu pel qual s'han descrit diferents observacions sobre la disposició dels diferents enzims del sistema CPT a la membrana mitocondrial.

El nombre i la superfície que ocupen les crestes mitocondrials, o protuberàncies de la membrana interna cap a la matriu mitocondrial, presenten gran variabilitat entre organismes, teixits, tipus cel·lulars i estat fisiològic (Harner, Körner et al. 2011). Els **llocs de contacte** de la membrana mitocondrial (*contact sites*, CS) són àrees definides de la superfície del mitocondri on s'uneixen les dues membranes. En mitocondris aïllats, es poden distingir com les àrees on les dues membranes s'acosten fins a només 4nm de distància una de l'altra. Representen entre un 5 i un 10% de la superfície total de la membrana mitocondrial externa (Pfanner, Rassow et al.

INTRODUCCIÓ

1992), tot i que es creu que *in vivo* encara podrien ser més abundants. Tenen una participació molt activa en funcions mitocondrials com la interacció amb proteïnes del citoesquelet, import de proteïnes, i la transferència de fosfolípids entre els mitocondris i una població especialitzada de membranes del reticle endoplasmàtic. El rendiment d'aquests processos varia molt en funció dels requeriments energètics de la cèl·lula, fet que fa pensar que el nombre de CS dependrà de l'estat energètic de la cèl·lula [revisat per (Zammit 1999)].

S'ha descrit que el 40% del total de molècules de CPT1 i CPT2 de la cèl·lula es localitzen en els CS de la membrana mitocondrial (Fraser and Zammit 1998), tot i que en estudis posteriors només es pogué demostrar la presència de CPT2 en aquestes estructures (Kerner and Hoppel 2000). Globalment, aquestes observacions es corresponen amb el fet que la sensibilitat de CPT1A al seu inhibidor, malonil-CoA, varia en funció de l'estat nutricional de l'animal, és a dir, de la localització de l'enzim en la membrana del mitocondri (Cook, Otto et al. 1980; Ontko and Johns 1980; Bremer 1981; Grantham and Zammit 1986; Grantham and Zammit 1988).

Molt recentment s'ha demostrat l'efecte estabilitzador de l'activitat de CPT1 i CPT2 d'un dels lípids majoritaris dels llocs de contacte de la membrana mitocondrial: la **cardiolipina** (difosfatidilglicerol) (Palsdottir and Hunte 2004). En afegir-la a extractes de membrana mitocondrial, aquesta era capaç d'augmentar l'activitat específica dels enzims i la sensibilitat per l'inhibidor fisiològic malonil-CoA, així com disminuir l'afinitat per la carnitina. A més a més, es detectaren importants interaccions entre CPT2 i la cardiolipina. Considerant que estudis anteriors també havien demostrat l'activació enzimàtica dels enzims FACS i CACT per cardiolipina (Noël and Pande 1986; Rubio-Gozalbo, Bakker et al. 2004), els autors del treball proposen un model en què la cardiolipina manté els enzims del sistema CPT en una conformació funcionalment activa entre les membranes mitocondrials (Kashfi, Mynatt et al. 2011).

S'ha purificat la CACT també d'extractes de CS mitocondrials, tot i que en menor proporció que CPT1 i CPT2 (Fraser and Zammit 1999), indicant així la formació de complexos proteics en els CS on tots els enzims de transport i entrada al mitocondri dels FA hi són representats, amb major o menor activitat depenent de la situació fisiològica. S'ha postulat, a més, la participació d'altres proteïnes implicades en el transport a la matriu, com veurem més endavant en detall (Introducció, apartat III.3.1.3).

INTRODUCCIÓ

Diferents evidències experimentals han atorgat al **citosquelet** un paper en la regulació de diferents vies metabòliques, sistemes de transducció de senyals i dinàmiques mitocondrials (Forgacs 1995). L'observació que la major part de la proteïna CPT1 es troba a la cara citosòlica de la membrana mitocondrial externa (Fraser, Corstorphine et al. 1997), suggerí la possibilitat que CPT1 establís interaccions amb el citoesquelet, sobretot després de demostrar que l'estat d'agregació del citoesquelet, regulat per fosforilació o desfosforilació de determinats components o bé per desestabilització farmacològica, podia modular l'activitat CPT1, per un mecanisme independent de malonil-CoA, en alliberar la proteïna de constriccions inhibidores. Estudis realitzats en hepatòcits adjudicaren aquest paper a les citoqueratines 8 i 18, activades al seu torn per l'AMPK o la proteïna cinasa 2 depenent de calci i calmodulina (Ca^{2+} /CM-PKII) (Velasco, Geelen et al. 1998).

Un altre factor important en regular la funció de l'enzim és la **fluïdesa de la membrana** mitocondrial, que al seu torn depèn, entre altres, del *ratio* colesterol:fosfolípids. Estudis amb mitocondris aïllats de rates dejunades, alimentades, o diabètiques mostren que a major fluïdesa de la membrana, menor sensibilitat a l'inhibidor, i que no es troba relacionat amb grans canvis en la composició lipídica de la membrana *in vivo*. Així, rates diabètiques amb un augment en la fluïdesa de la membrana mostraren alteracions en les interaccions entre els dominis amino- i carboxiterminal de CPT1A, resultant en una disminució en la sensibilitat a l'inhibidor (Zammit, Corstorphine et al. 1998). Observacions similars *in vitro* mostraren un augment de la sensibilitat a l'inhibidor en disminuir la temperatura de l'assaig, resultant en una disminució de la fluïdesa de la membrana (Kolodziej and Zammit 1990).

Tant la composició lipídica (Ardail, Lerme et al. 1991) com proteica (Pfanner, Rassow et al. 1992) dels CS és altament específica i diferent respecte la resta de membrana mitocondrial. Fraser i col·laboradors demostraren que CPT1A presentava diferent afinitat al palmitoïl-CoA i sensibilitat al malonil-CoA depenent del microambient membranós on l'enzim es trobés localitzat. Observaren que el tipus d'inhibició per malonil-CoA era competitiva amb el substrat només quan CPT1A es trobava en els CS, mentre que a la membrana mitocondrial externa l'enzim era més sensible al malonil-CoA, que podia inhibir l'activitat fins i tot a altes concentracions de substrat, sense afectar-ne l'activitat específica. D'aquesta manera, a major nombre de CS, major rendiment de la β -oxidació mitocondrial. Els autors postulen doncs, que els canvis en l'estructura podrien ser específics del lloc d'unió a l'acil-CoA, corresponent al centre catalític de l'enzim (Fraser, Padovese et al. 2001).

INTRODUCCIÓ

Resulta evident, doncs, la dificultat afegida en la caracterització de l'activitat i la sensibilitat a l'inhibidor de les isoformes de CPT *in vitro*, depenent del lípid o detergent escollit per a la reconstitució, que pot bloquejar l'enzim en un estat que no sigui representatiu de la condició metabòlica d'interès.

4.4. Inhibició per malonil-CoA

El principal punt de control de la β -oxidació mitocondrial és a través de la inhibició al·lostèrica, competitiva i reversible que exerceix el malonil-CoA sobre l'enzim clau de la via: CPT1 (McGarry, Mannaerts et al. 1977; McGarry, Mannaerts et al. 1978). Els nivells de malonil-CoA depenen del *ratio* entre la seva síntesi, catalitzada per l'ACC (Acetil-CoA carboxilasa), i la seva degradació, mitjançant la MCD (Malonil-CoA descarboxilasa). Metabòlit de *turnover* molt elevat, els seus nivells intracel·lulars són similars en fetge, cor i múscul, que oscil·len de 13 a 25nmol/g en rates alimentades, i disminueixen a la meitat durant el dejuni, amb valors de fins a 4-6nmol/g (Guynn, Veloso et al. 1972; McGarry, Stark et al. 1978), valors que es corresponen amb 1-1.4 μ M en la re-alimentació, i 0.1-0.2 μ M en el dejuni (Hu, Cha et al. 2003).

El malonil-CoA és sintetitzat a partir de la condensació de dues molècules d'acetil-CoA, essent aquest el pas limitant de la síntesi de FA (Gregolin, Ryder et al. 1966). L'any 1989 s'identificà una segona isoforma de l'enzim responsable d'aquesta reacció, l'ACC2, principalment expressada en teixits no lipogènics i amb alts nivells de β -oxidació com el cor o el múscul (Thampy 1989). La isoforma ACC1, d'altra banda, es troba principalment expressada en fetge i teixit adipós, on el principal destí metabòlic dels FA és la lipogènesi (Abu-Elheiga, Jayakumar et al. 1995). Aquestes observacions generaren la hipòtesi de l'existència de diferents *pools* cel·lulars de malonil-CoA a l'interior cel·lular: mentre que l'ACC1 subministra el *pool* de malonil-CoA citosòlic utilitzat com a precursor en la síntesi de FA, l'ACC2 sembla que subministra el *pool* específic de malonil-CoA destinat a la regulació de l'oxidació mitocondrial de FA, idea reforçada pel fet que es trobi també ancorada a la membrana mitocondrial externa, propera a la CPT1 (Abu-Elheiga, Almarza-Ortega et al. 1997) (Figura I.6).

Posteriorment, ratolins KO de l'ACC2 presentaren nivells augmentats de β -oxidació muscular, i un menor dipòsit lipídic en teixit adipós. Interessantment, els nivells de lipogènesi no es veieren afectats, demostrant així que el malonil-CoA generat per l'ACC2 no és necessari per a la síntesi de FA (Abu-Elheiga, Matzuk et al. 2001). Estudis en múscul de pacients humans mostraren un augment del 50% en els nivells d'mRNA d'ACC2 en obesos. L'expressió de l'ACC2 mitocondrial era 20 vegades superior a l'expressió de l'ACC1 tant en pacients obesos com

INTRODUCCIÓ

control, consistent amb una major regulació del sistema CPT respecte la lipogènesi en múscul. En aquesta línia, els nivells d'mRNA de la *MCD* eren 40 vegades els de la *FAS*, confirmant així la prevalència de la degradació més que la lipogènesi com a destí metabòlic del malonil-CoA en múscul (Pender, Trentadue et al. 2006).

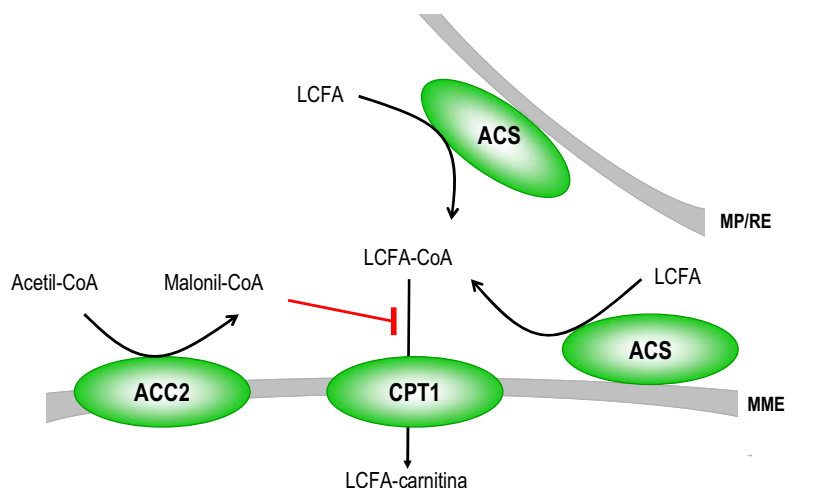


Figura I.6. Representació esquemàtica de la regulació coordinada entre l'activació dels LCFA per l'ACS, el transport cap a la matriu mitocondrial per la CPT1, i la síntesi del principal regulador de la β -oxidació per l'ACC: el malonil-CoA. Els mamífers expressen 5 tipus diferents d'ACS específics pels LCFA, i es troben localitzats en membranes com la plasmàtica (MP), la membrana del reticle endoplasmàtic (RE) i la mitocondrial externa (MME). Adaptat de (Schreurs, Kuipers et al. 2010).

L'activitat ACC és regulada al·lostèricament per citrat i LCFA-CoA que activen i reprimeixen l'enzim, respectivament [revisat per (Ruderman, Saha et al. 1999; Saha, Laybutt et al. 1999; Ruderman and Prentki 2004)] i per mecanismes de fosforilació/desfosforilació a través de diferents serina/treonina cinases (PKA: *cAMP dependent protein kinase*, PKC: *protein kinase C* i AMPK: *AMP-activated protein kinase* (Ferrer, Caelles et al. 1985) que fosforilen l'enzim, inactivant-lo [revisat per (Rasmussen and Wolfe 1999; Ronnett, Kim et al. 2005)]. A nivell hormonal, la insulina és capaç d'activar l'ACC, disminuint els nivells d'AMPc i activant fosfatases que inhibeixen l'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

INTRODUCCIÓ

control adaptatiu on situacions com el dejú perllongat o l'exercici habitual afecten l'expressió dels gens *CPT1* i *ACC* (Rasmussen and Wolfe 1999). Guzmán i col·laboradors proposen un model on l'activitat de l'enzim depèn de tres factors: 1) l'activitat de l'ACC i/o els nivells de malonil-CoA, 2) canvis en el citoesquelet que afecten l'estructura de *CPT1*, i 3) la localització intracel·lular de l'ACC (Guzmán, Velasco et al. 2000).

S'ha descrit la regulació per malonil-CoA d'altres membres de la família de les carnitina aciltransferases, com la COT, per exemple (A'Bháird and Ramsay 1992). D'aquesta, s'han descrit les posicions His¹³¹ i His³⁴⁰ com crucials per a la unió de l'inhibidor malonil-CoA (Morillas, Clotet et al. 2000; Hegardt, Bach et al. 2001; Morillas, Gómez-Puertas et al. 2002).

D'altra banda, *CPT2* és insensible al malonil-CoA (McGarry, Leatherman et al. 1978; Murthy and Pande 1987; Ghadiminejad and Saggerson 1990; Traufeller, Gellerich et al. 2004).

4.5. Inhibició farmacològica

En general, els inhibidors de l'oxidació de FA redueixen la gluconeogènesi hepàtica indirectament, mitjançant la disminució dels nivells d'acetil-CoA, potent activador de l'enzim gluconeogènic piruvat carboxilasa. Són, per tant, molècules efectives en el tractament de la diabetis tipus 2 i com a agents hipoglucemiants (Foley 1992; Anderson 1998). Com a principal inconvenient però, presenten inespecificitat entre isotips i un augment dels nivells d'acils-CoA que, en tractaments de llarga durada, produirà lipotoxicitat i manca de substrat per a la síntesi d'altres components lipídics.

El mecanisme de regulació de *CPT1* per malonil-CoA encara no està totalment descrit, i la manca d'un cristall de la proteïna dificulta l'estudi del centre alostèric d'inhibició per malonil-CoA, específic de *CPT1*. Després de la publicació de l'estructura cristal·lina de *CPT2* (Hsiao, Jogl et al. 2004), i donat que *CPT1* i *CPT2* comparteixen una elevada identitat de seqüència en el centre catalític de l'enzim (~30%), els programes de *drug-discovery* s'han centrat en l'estudi d'inhibidors de *CPT1* que s'uneixin al centre catalític de la proteïna. Per aquest motiu, l' α -cetoàcid Ro25-0187 és l'únic inhibidor de *CPT1* descrit fins al moment que s'uneix al lloc alostèric d'unió al malonil-CoA (Cook, Mynatt et al. 1994; Yang, Kays et al. 2005).

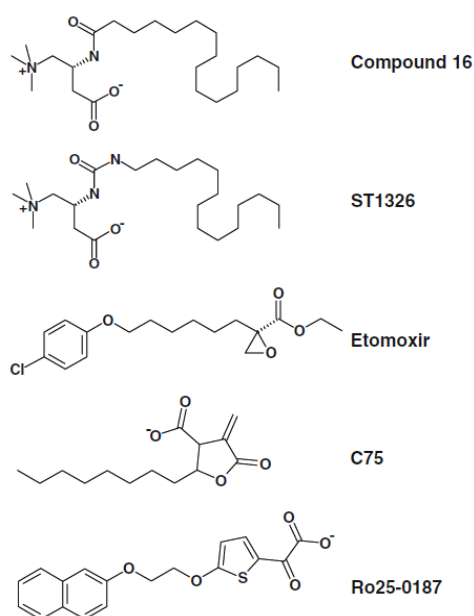
La majoria d'inhibidors descrits fins al moment són derivats de la L-aminocarnitina, que s'uneixen al lloc d'unió al malonil-CoA competitiu amb l'acil-CoA de *CPT1* (Jenkins and Griffith 1986; Giannessi, Chiodi et al. 2001; Giannessi, Pessotto et al. 2003; Chegary, te Brinke et al. 2008), i poden, per tant, inhibir també l'activitat de *CPT2* (Traufeller, Gellerich et al. 2004) així

INTRODUCCIÓ

com de la CACT (Chegary, te Brinke et al. 2008). Ésters de la D-carnitina, acil(+)-carnitines de cadena mitja i llarga (6-16C), també regulen la β -oxidació a través de la inhibició de la CACT (Baillet, Mullur et al. 2000). Les molècules amb major efecte hipoglucemiant i anti-cetogènic són els anàlegs de la palmitoïlcarnitina, el principal substrat de CPT *in vivo*. El principal inconvenient d'aquests inhibidors, però, és la inespecificitat entre els diferents enzims i els seus isotips del sistema CPT, donant lloc a efectes cardíacs no desitjats (Bressler, Gay et al. 1989) i, probablement, resistència a la insulina en múscul (Dobbins, Szczepaniak et al. 2001).

Els derivats de l'àcid glicídic són potents inhibidors de CPT que s'uneixen de forma covalent i irreversible als enzims CPT, essent les molècules més estudiades l'àcid tetradecilglicídic (TDGA), l'etomoxir i els carboxilats fenilalquílics de l'oxirà (POCA) (Tutwiler, Kirsch et al. 1978; Bone, Sherratt et al. 1982; Kiorpes, Hoerr et al. 1984; Wolf and Engel 1985). S'ha vist, però, que cal que siguin activats a ésters de CoA per exercir la seva funció, de manera que són molècules precursors d'inhibidors (Selby and Sherratt 1989). No s'ha descrit encara cap estructura cristal·lina de la unió covalent de l'etomoxir amb CPT2, tot i que les dades disponibles fan pensar que l'enllaç s'estableixi amb la posició Ser⁵⁹⁰ [revisat per (Rufer, Thoma et al. 2009)]. De nou, però, el principal inconvenient d'aquestes molècules és la inespecificitat que presenten.

Figura I.7. Lligands que modifiquen l'activitat dels enzims CPT1. Extret de (Rufer, Thoma et al. 2009)



L'estructura 3-D de CPT2 unida a l'inhibidor teglicar (ST1326) localitzà la interfície d'unió de l'inhibidor al túnel catalític de CPT2 i mostrà una visió detallada del tipus d'unió amb quatre ponts d'hidrogen del cap polar de l'aminocarnitina amb els residus His³⁷², Ser⁵⁹⁰, i Tyr⁴⁸⁶ i amb

INTRODUCCIÓ

una molècula d'aigua, sense cap unió covalent aparent (Rufer, Thoma et al. 2006). Estudis recents amb teglicar, mostren que és un inhibidor altament selectiu per CPT1A, sense alterar els nivells de PPAR, capaç de disminuir la gluconeogènesi i amb capacitat per millorar l'homeòstasi de la glucosa, tant *in vitro* com en models animals (Giannessi, Pessotto et al. 2003; Conti, Mannucci et al. 2011). El tractament de ratolins *db/db* resultà en una disminució dels nivells de glucèmia mentre que la insulina i altres paràmetres com els TG en sang no estaven alterats. Estudis recents *in vivo* mostraren una millora de la hiperglicèmia després de 4 dies de tractament amb teglicar seguit d'1 dia amb metformina. Assajos clínics de fase 2 mostraren només una lleugera millora dels valors d'insulina en pacients diabètics (Valentini, Bianchetti et al. 2008).

El compost C75 va ser inicialment sintetitzat com un inhibidor de la FAS (Kuhajda, Pizer et al. 2000). En contra del que caldria esperar, però, s'ha vist que produeix un augment de la β -oxidació en animals amb obesitat induïda per la dieta (Thupari, Landree et al. 2002; Thupari, Kim et al. 2004), que resulta, a més, en una disminució de la ingesta i una pèrdua de pes corporal dels animals (Loftus, Jaworsky et al. 2000; Gao and Lane 2003; Kim, Miller et al. 2004). Tot i que inicialment es demostrà que aquest efecte era degut a un increment de l'activitat CPT1 (Thupari, Landree et al. 2002; Landree, Hanlon et al. 2004; Nicot, Napal et al. 2004; Thupari, Kim et al. 2004), més recentment s'ha descrit que el C75 és activat a C75-CoA *in vitro* (Bentebibel, Sebastián et al. 2006) i *in vivo* (Mera, Bentebibel et al. 2009) en hipotàlem de ratolins, tot inhibint la CPT1.

Diferents autors postulen que una inhibició selectiva i reversible de l'activitat de CPT1A seria una bona aproximació farmacològica, cada cop més factible, pel tractament de desordres metabòlics caracteritzats per una excés d'oxidació de FA. Tal com es detallarà més endavant en estudiar els diferents isotips de CPT1 (Introducció, apartat III), un inhibidor selectiu de CPT1A seria altament eficaç per revertir la cetoacidosi aguda en la diabetis tipus 1 o com a agent hipoglucemiant pel tractament crònic de la diabetis tipus 2 (Foley 1992; Deems, Anderson et al. 1998). D'altra banda, un inhibidor selectiu de CPT1B seria d'aplicació pel tractament d'isquèmies coronàries (Lopaschuk, Belke et al. 1994; Stanley, Lopaschuk et al. 1997; Kantor, Dyck et al. 1999).

5. Deficiència humana

D'entre totes les carnitina aciltransferases, la CPT2 és la que presenta més mutacions naturals. Una deficiència en CPT2, el desordre més comú del metabolisme lípidic muscular (Taroni, Verderio et al. 1992), pot aparèixer en diferents moments i presentar diferents fenotips.

INTRODUCCIÓ

La severitat de la malaltia depèn del grau de deficiència, des de l'anomenada forma "muscular", sovint diagnosticada en adults, a les formes més serioses, sovint fatals, presents en la infància. Fins al moment, però, no s'ha pogut establir una marcada correlació entre les mutacions anotades i els fenotips observats, ja que existeixen clares excepcions. Es coneix, per exemple, que la mutació homozigota R631C en pacients no relacionats presenta variacions en la simptomatologia (Bonfont, Demaugre et al. 1999).

Una deficiència de CPT1A és menys freqüent, i per tant, no està tan caracteritzada, però es coneix que es presenta durant el primer any de vida amb episodis d'hipoglucèmia hipocetòtica i altres manifestacions semblants al síndrome de Reye [revisat per (Bonfont, Demaugre et al. 1999)].

S'ha relacionat una variació del gen *CPT1B* (E531K) amb la ingesta de grassa, que es correspon amb un fenotip d'obesitat (Robitaille, Houde et al. 2007), tot i que no s'han descrit pacients amb deficiència de *CPT1B* probablement per la seva contribució crítica a la funció cardíaca. Tampoc es coneixen fins al moment deficiències humanes de l'isotip més recentment descrit, *CPT1C*.

Tot i que no és molt freqüent, s'han descrit casos de deficiència de CACT, que es sol presentar en el període neonatal amb alts índexs de mortalitat. La simptomatologia típica és hipoglucèmia hipocetòtica, hepatomegàlia, arrest cardíac, debilitat muscular i disfunció hepàtica (Rubio-Gozalbo, Bakker et al. 2004).

Diferents treballs han revisat les mutacions descrites per cada proteïna causants de deficiència en humans (IJlst, Mandel et al. 1998; Brown, Mullur et al. 2001; Bonfont, Djouadi et al. 2004; Morillas, López-Viñas et al. 2004). De tota manera, i com recentment han demostrat Nyman i col·laboradors en alimentar ratolins amb diferents dietes, una desregulació a la tolerància a la glucosa en animals amb una deficiència en CPT1A és la combinació del component genètic amb el tipus de dieta ingerida (Nyman, Tian et al. 2011).

III. CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA 1

CPT1 és un membre de la família de les carnitina aciltransferases, enzims encarregats de catalitzar la transferència reversible de grups acil entre la carnitina i el coenzim A. Són membres de la família els enzims Carnitina palmitoïltransferasa 1 i 2 (CPT1, CPT2), la Carnitina octanoïltransferasa (COT), i la Carnitina acetiltransferasa (CrAT), amb preferència de substrat per grups acil de cadena llarga, mitja i curta, respectivament. L'alineament de seqüències proteiques mostra una identitat de seqüència del ~30% en el domini catalític, localitzat a la regió C-terminal (Figura I.8).



Figura I.8. Les carnitina aciltransferases. Organització dels dominis de diferents proteïnes de la família de les carnitina aciltransferases. Verd, domini catalític, groc, seqüència d'import mitocondrial, lila, segments transmembrana. Modificat de (Jogl, Hsiao et al. 2005).

Com ja hem mencionat anteriorment, CPT1 és una proteïna altament modulada a nivell transcripcional, traducciona i post-traducciona, essent el malonil-CoA el principal regulador de la seva activitat catalítica (McGarry, Mannaerts et al. 1977). L'absència de sensibilitat al malonil-CoA d'un enzim CPT1 de rata amb l'extrem aminoterminal deletionat, suggerí que aquesta regió era important en determinar el grau d'unió a l'inhibidor de CPT1A (von Heijne 1992; Shi, Zhu et al. 1998) i CPT1B (Jackson, Zammit et al. 2000; Shi, Zhu et al. 2000). Pel mateix motiu, s'ha relacionat aquesta regió N-terminal amb l'import mitocondrial (residus 123-148) i ancoratge a la membrana de CPT1 (Cohen, Kohl et al. 1998), considerant que els enzims de la família mancats d'aquesta regió són dèbilment associats a membrana, com la CPT2 (Murthy and Pande 1990), o bé solubles, com la COT o la CrAT [revisat per (Ramsay, Gandour et al. 2001)].

Com s'observa a la figura I.9, CPT1 és una proteïna integral de membrana amb els extrems amino i carboxil exposats al citosol i dos dominis transmembrana (TM) en α -hèlix, que inclouen els residus 50-73 (TM1) i 102-123 (TM2) (Fraser, Corstorphine et al. 1997; Jenei,

INTRODUCCIÓ

Borthwick et al. 2009). Tot i que es localitza principalment a la membrana mitocondrial, se n'ha detectat l'expressió en microsomes i peroxisomes (Fraser, Corstorphine 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. La naturalesa dels residus immediatament posteriors al TM2 fa que actuïn com a senyal de parada de l'import mitocondrial, i la proteïna es quedi ancorada a la membrana (Cohen, Kohl 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, Guillerault et al. 2001). La substitució de l'extrem aminoterminal de l'enzim CPT1A per la seqüència Tom70p, que dirigeix i fixa la proteïna a la membrana mitocondrial externa, fa que CPT1 adopti una conformació menys plegada de l'extrem carboxi-terminal i presenti una activitat reduïda (Cohen, Kohl et al. 1998). Aquest mecanisme, inicialment descrit pels isotips hepàtics, seria probablement extrapolable als isotips musculars per la similitud de seqüències que indica un mateix grau d'hidrofobicitat i unes estructures secundàries molt similars.

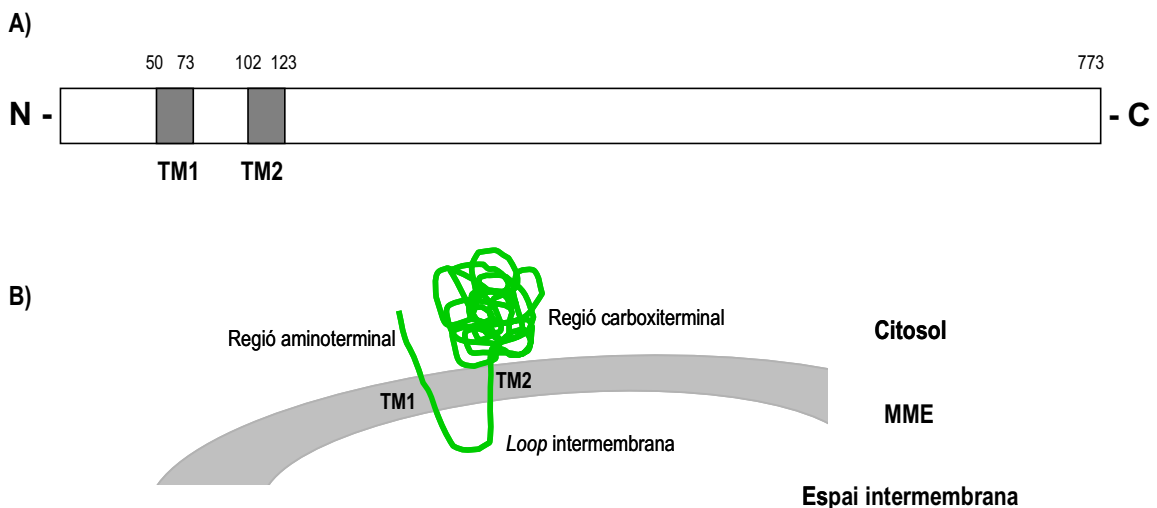


Figura I.9. Representació esquemàtica de l'estructura i ancoratge a la membrana mitocondrial de CPT1. A) Esquema de la seqüència primària de la proteïna, indicant els residus d'entrada i sortida a la membrana (TM1 i TM2). B) Representació de l'ancoratge de la proteïna a la membrana mitocondrial externa (MME).

1. Expressió heteròloga de proteïnes CPT1 en llevat

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.

L'expressió heteròloga en llevats és una eina àmpliament utilitzada per a l'expressió i anàlisi de proteïnes eucariotes. A diferència dels sistemes procariotes, l'organització eucariota subcel·lular que els llevats presenten garanteix l'empaquetament i processament post-traduccionals requerits per a la producció de proteïnes "autèntiques" i bioactives. D'altra banda, es mantenen els avantatges d'un organisme unicel·lular, de creixement ràpid en medi de cultiu relativament econòmic i fàcil manipulació genètica (Buckholz and Gleeson 1991).

En aquest treball s'ha emprat la soga *Pichia pastoris* per a l'estudi de les proteïnes CPT1 generades, soga genèticament ben caracteritzada i que presenta major rendiment en la producció de proteïnes respecte *Saccharomyces cerevisiae* (Cregg, Vedvick et al. 1993). *Pichia pastoris* és un organisme mancat de sistema CPT endogen on es coneix que l'expressió heteròloga de CPT1 resulta en una localització mitocondrial de l'enzim.

L'ús del vector pHWO10 (Materials, apartat 4.3) per expressar els cDNAs de les CPT1 sota el control del promotor de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (P_{GAP}) en *Pichia pastoris* GS115 i el clonatge dels cDNAs amb una diana EcoRI de restricció just abans de l'ATG codificant (Nicot, Hegardt et al. 2001) dona lloc a enzims amb valors cinètics molt propers als descrits de mitocondris aïllats de teixit (McGarry, Mills et al. 1983; de Vries, Arvidson et al. 1997; Zhu, Shi et al. 1997). L'ús d'altres soques de llevat, vectors, o cDNAs subclonats seguint altres estratègies donen lloc a enzims CPT1 amb sensibilitats a malonil-CoA molt diferents a les detectades en mitocondris de fetge i múscul esquelètic de rata (Jackson, Cameron et al. 1999; Jackson, Cameron et al. 2000; Jackson, Zammit et al. 2000; Jackson, Price et al. 2001).

Aquest sistema d'expressió, doncs, ha permès la realització de gran nombre d'estudis per avançar en el coneixement de la relació estructura-funció dels enzims CPT1A i CPT1B, així com dels determinants moleculars de sensibilitat al malonil-CoA que presenten.

INTRODUCCIÓ

2. Determinació de paràmetres enzimàtics

Per la manca d'una estructura cristal·lina, el mecanisme exacte de catàlisi encara no es coneix. S'han postulat dues teories diferents, ambdues implicant la His⁴⁷³ com a centre catalític de la proteïna. En la primera, la histidina desprotona la carnitina mentre una serina propera estabilitza l'intermediari enzimàtic format (Jogl and Tong 2003). Més recentment, en estudis sobre la seqüència de la CPT1B, s'ha proposat un segon mecanisme suggerint una tríada catalítica entre els residus Cys³⁰⁵, His⁴⁷³ i Asp⁴⁵⁴, implicant en aquest cas un intermediari enzimàtic formant un enllaç covalent amb la Cys³⁰⁵ (Liu, Zheng et al. 2005).

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 and McMillin 1988; Prip-Buus, Cohen et al. 1998).

El càlcul dels paràmetres IC₅₀ d'inhibició pel malonil-CoA i K_m d'afinitat pels substrats carnitina i palmitoïl-CoA (Mètodes, apartat 14) han permès realitzar estudis comparatius dels diferents isotips de diferents espècies, per tal d'avançar en l'estudi de la relació estructura funció de les proteïnes CPT1.

3. Isotips de CPT1

Fins al moment s'han descrit tres isotips de CPT1: CPT1A, CPT1B i CPT1C. Encara que siguin productes gènics diferents, amb marcades diferències en la seva funcionalitat, tenen gran identitat de seqüència (superior al 50%). De fet, les generalitats de CPT1 respecte funcionalitat i regulació comentades fins ara són d'aplicació per als isotips CPT1A i CPT1B, però no s'ha pogut demostrar encara que siguin totalment aplicables per CPT1C (Introducció, apartat III.3.3).

INTRODUCCIÓ

	CPT1A	CPT1B	CPT1C
Sinònims	CPT1α, L-CPT1	CPT1β, M-CPT1	
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 μM	≈0,07μM	-
K _m palmitoil-CoA	≈40 μM	≈40 μM	*
K _m carnitina	≈100 μM	≈500 μM	*
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 I.1. Resum del patró d'expressió i característiques de les CPT1 descrites. Modificat de (McGarry and Brown 1997) amb dades enzimàtiques dels treballs (de Vries, Arvidson et al. 1997; Zhu, Shi et al. 1997). * , paràmetre analitzat en la publicació (Sierra, Gratacós et al. 2008), veure en el text.

Els tres isotips de CPT1 descrits presenten diferents patrons d'expressió que, a més a més, no són fixes i, encara avui, no està del tot clar la distinció entre teixits que expressin un o altre isotip. Per ser l'enzim clau de la β-oxidació, les característiques cinètiques de la CPT1 es correlacionen amb el tipus de metabolisme lipídic del teixit on es troba. El fetge és un teixit típicament lipogènic que, en condicions de manca de substrats metabòlics, presenta elevats índexs de cetogènesi. Com s'observa a la taula I.1, la CPT1A, principalment expressada en fetge, presenta una elevada afinitat per la carnitina (baixa K_m) i poca sensibilitat a l'inhibidor (alta IC₅₀), de manera que es garanteix una elevada producció d'acetil-CoA en tot moment. 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 (similars als nivells hepàtics) sempre són superiors a la concentració necessària per mantenir la CPT1 totalment inhibida, ja que presenta una sensibilitat a l'inhibidor molt elevada (baixa IC₅₀).

INTRODUCCIÓ

Així, s'ha observat una relació inversa entre la K_m per la carnitina i la IC_{50} per malonil-CoA en la majoria d'enzims CPT1, que a més a més, va en sentit contrari entre ambdós isotips hepàtic i muscular (veure a continuació).

Diferents laboratoris han qüestionat la capacitat enzimàtica de CPT1C, com veurem en detall a l'apartat III.3.3.3. La sobreexpressió de la proteïna en la línia neuronal PC12 resultà en un enzim actiu, tot i que amb una activitat específica 100 vegades menor que CPT1A. CPT1C presentà una menor afinitat per palmitoil-CoA (major K_m) i major afinitat per la carnitina (menor K_m) que CPT1A, i no es pogué mesurar la IC_{50} pel malonil-CoA degut als baixos nivells d'activitat enzimàtica mesurats (Sierra, Gratacós et al. 2008).

El naixement implica importants canvis en l'expressió dels gens del metabolisme lipídic, consistent amb el canvi de dieta que es dona entre el període fetal i la lactància post-part en mamífers. Així, el desenvolupament post-natal ha estat estretament relacionat amb l'activació del sistema CPT, principalment CPT1, i amb el canvi dels patrons d'expressió dels isotips en diferents teixits per tal d'adaptar-se a les necessitats energètiques i a la disponibilitat de substrat de cada moment. Estudis en miocardi de rates (Brown, Weis et al. 1995), i ovelles (Bartelds, Takens et al. 2004), identificaren una mescla d'ambdós isotips CPT1A i CPT1B en el període fetal, moment en què els principals substrats energètics són glucosa i lactat. El canvi de dieta durant la lactància, abundant en LCFA, coincideix amb una expressió clarament predominant de CPT1B i una dràstica disminució en l'expressió de CPT1A a la primera setmana de vida, després d'un augment transitori just després del part (Bartelds, Takens et al. 2004). Aquest canvi en els nivells es correlaciona directament amb els nivells de carnitina, baixos en néixer i insuficients pel bon funcionament de l'isotip B, que presenta baixa afinitat per la carnitina, però suficients per l'isotip A, que presenta una afinitat superior per la carnitina (veure a continuació).

3.1. CPT1A

CPT1A és l'isotip més estudiat. El primer cDNA aïllat va ser el de l'isotip CPT1A de rata a partir d'una llibreria de cDNA hepàtic (Esser, Britton et al. 1993), predient una proteïna de 773 aminoàcids (88.15kDa). El cDNA humà va ser aïllat poc després (Britton, Schultz 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.

L'expressió en el llevat *P. pastoris* (de Vries, Arvidson et al. 1997) va permetre per primer cop produir un enzim CPT1A amb una sensibilitat al malonil-CoA ($IC_{50}=1.9\mu M$) similar al valor

INTRODUCCIÓ

obtingut en aïllar l'enzim de mitocondris de fetge de rata ($IC_{50}=1-2\mu M$) (McGarry, Mannaerts et al. 1978). La incubació de CPT1 amb concentracions creixents del seu principal substrat, el palmitoil-CoA, pot desplaçar la unió a l'inhibidor malonil-CoA, i viceversa, indicant que ambdós s'uneixen de forma competitiva a la proteïna (Mills, Foster et al. 1983; McGarry and Brown 1997; Rufer, Thoma et al. 2009).

S'ha descrit la importància de les arginines conservades en el plegament de CPT1A i el manteniment dels ponts salins intramoleculars: les mutacions puntuals R601A i R655A en la CPT1A de rata resultaren en enzims inactius, de manera que probablement són dos residus amb un paper crucial pel manteniment de la configuració del centre actiu de la proteïna (Dai, Zhu et al. 2000). Paral·lelament, la mutació R505N (corresponent a la posició R655 de CPT1) en la COT bovina produí una disminució d'unes 1650 vegades en l'afinitat per la carnitina de l'enzim (Cronin 1997), suggerint que aquesta posició és important per a la unió del substrat, tot formant un pont salí amb el motiu carboxil de la carnitina (Cronin 1997).

Dai i col·laboradors estudiaren l'efecte de la mutació puntual a alanina d'altres arginines i triptòfans conservats en la seqüència proteica de CPT1A, com són R388A, R451A, R606A, W391A, i W452A, resultant en tots els casos en una pèrdua de més del 50% d'activitat respecte l'enzim *wild-type*, assolint en alguns enzims el 98% de pèrdua d'activitat catalítica. En aquest estudi es determinaren aquestes posicions, doncs, com a crucials en la configuració del centre actiu de l'enzim CPT1A, contribuint a l'estabilització del complex enzim-substrat per neutralització de càrrega (arginines) o interaccions hidrofòbiques (triptòfans) (Dai, Zhu et al. 2000).

3.1.1. Efecte del dejú i llocs d'unió al malonil-CoA

En contrast amb les altres isoformes de CPT1, varis autors han descrit importants diferències en el comportament cinètic de la CPT1A depenent de l'estat nutricional de l'organisme (Cook, Otto et al. 1980; Ontko and Johns 1980; Bremer 1981; Grantham and Zammit 1986; Grantham and Zammit 1988; Kerner, Parland et al. 2008). Així, mitocondris aïllats de fetge de rates alimentades presentaren una IC_{50} de $2.8\mu M$ pel malonil-CoA, mentre que el mateix anàlisi en rates dejunades i diabètiques, mostrà una disminució important en la sensibilitat de CPT1A a l'inhibidor, que presentà una IC_{50} de $9.1\mu M$ (McGarry, Mannaerts et al. 1978; Ontko and Johns 1980; Kerner, Parland et al. 2008).

Més tard, es realitzaren assajos *in vitro* per estudiar aquest efecte. S'incubaren mitocondris aïllats de fetge de rates (alimentades) amb malonil-CoA durant diferents períodes,

INTRODUCCIÓ

previ a l'assaig d'activitat. Els resultats mostraren que l'enzim presentava major sensibilitat a l'inhibidor com més llarg havia estat el període d'incubació amb el mateix, suggerint que la proteïna retenia en "memòria" una conformació més o menys susceptible a la inhibició depenent de la situació fisiològica del teixit de partida, fet que justificà la correlació entre els nivells de malonil-CoA *in vivo* i la sensibilitat dels enzims mesurada *in vitro* (Zammit 1983; Zammit, Corstorphine et al. 1984).

Totes aquestes observacions dugueren a pensar en dues conformacions estructurals de la proteïna, depenent de l'estat fisiològic de la cèl·lula: una de baixa afinitat per l'inhibidor i una segona d'alta afinitat induïda pel mateix malonil-CoA, com s'observa a la figura I.10 (Bird and Saggerson 1984; Zammit 1984; Shi, Zhu et al. 1999). Varis estudis posteriors confirmaren la correlació d'aquestes dues conformacions amb dos llocs d'unió al malonil-CoA: un de més baixa afinitat, on inhibidor i substrat competeixen per l'entrada al centre catalític de l'enzim (Zammit, Corstorphine et al. 1984; Cook, Mynatt et al. 1994; Kashfi, Mynatt et al. 1994; Morillas, Gómez-Puertas et al. 2002; López-Viñas, Bentebibel et al. 2007); i un segon de més alta afinitat i no competitiu amb l'acil-CoA, d'unió al·lostèrica (Grantham and Zammit 1986).

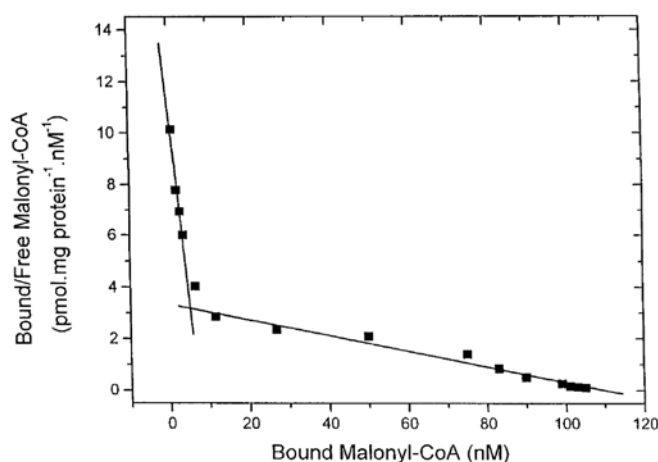


Figura I.10. Corbes Scatchard del grau d'unió del malonil-CoA a la CPT1A de rata. Les dues pendents indiquen dos graus d'unió diferents al malonil-CoA, un de més baixa afinitat (a altes concentracions d'inhibidor) i un de més alta afinitat (a baixes concentracions de malonil-CoA). Extret de (Shi, Zhu et al. 1999).

3.1.2. Determinants moleculars de la sensibilitat al malonil-CoA

En aquest treball s'entèn per determinant molecular aquella característica fisicoquímica d'una proteïna que, en modificar-la, produeix canvis en la seva funció, en aquest cas, en la sensibilitat per l'inhibidor fisiològic de CPT1, malonil-CoA.

INTRODUCCIÓ

Tot i que s'han realitzat nombrosos estudis, encara no es coneix el mecanisme exacte de regulació de les CPT1 per malonil-CoA, sobretot per la falta d'un cristall representatiu de l'estat natiu de la proteïna, com ja s'ha comentat.

La mutagènesi dirigida de la seqüència de la proteïna ha permès la identificació de diferents determinants de la sensibilitat a l'inhibidor en la regió aminoterminal de la CPT1A. La mutació dels residus Glu³ i His⁵ provoca una pèrdua important en la sensibilitat de la CPT1A de rata a l'inhibidor ($IC_{50}=200\mu\text{M}$ i $25\mu\text{M}$, respectivament, vs. $2\mu\text{M}$ del *wt*). (Shi, Zhu et al. 1999), mentre que un canvi a alanina dels residus Ser²⁴ i Gln³⁰ fan la proteïna més sensible al malonil-CoA (Jackson, Price et al. 2001). De tota manera, la combinació d'aquestes mutacions que actuen en sentit contrari sobre la sensibilitat a l'inhibidor no reverteix la pèrdua de sensibilitat produïda per la mutació E3A, resultant en un enzim menys sensible en tots els casos. La posició Glu³, doncs, és un fort determinant positiu de sensibilitat al malonil-CoA de CPT1A de rata, ja que confereix més sensibilitat a l'enzim.

La deleció de diferents fragments de la regió aminoterminal resulta en enzims menys sensibles al malonil-CoA. En concret, s'han identificat els primers 18 residus de CPT1A de rata com un determinant positiu de sensibilitat al malonil-CoA, ja que la seva deleció produeix un enzim menys sensible a l'inhibidor ($IC_{50}=380\mu\text{M}$) (Shi, Zhu et al. 1998). D'altra banda, els residus 19 al 30 es comporten com un determinant negatiu, produint l'efecte contrari ($IC_{50}=1.1\mu\text{M}$ vs $38\mu\text{M}$ del *wt*). La manca d'aquest determinant negatiu en els isotips B, explica la major sensibilitat al malonil-CoA que aquests presenten respecte els isotips hepàtics (Jackson, Zammit et al. 2000). La deleció dels primers 82 aminoàcids produeix un enzim insensible al malonil-CoA (Shi, Zhu et al. 1998), tot i que la mateixa proteïna generada i expressada en un altre laboratori i una soca de llevat diferent, resultà en un enzim inactiu (Jackson, Zammit et al. 2000).

Es coneix també la importància de determinats residus de la regió carboxiterminal de l'enzim implicats també en aquesta regulació pel malonil-CoA. Així, s'han identificat els aminoàcids Arg³⁸⁸, Arg⁴⁵¹ i Trp⁴⁵² que, mutats a alanina, produeixen enzims insensibles al malonil-CoA (Dai, Zhu et al. 2000), com també és el cas de les posicions Arg⁶⁰¹, Glu⁶⁰³ i Arg⁶⁰⁶, que mutades a alanina, produeixen enzims menys sensibles a l'inhibidor (Treber, Dai et al. 2003).

Estudis del nostre grup en col·laboració amb el grup de Woldegiorgis, identificaren el residu Glu⁵⁹⁰ com una posició clau propera el centre catalític de la proteïna que, mutada a diferents aminoàcids, alterava l'estabilitat del centre actiu i la sensibilitat per l'inhibidor (Napal,

INTRODUCCIÓ

Dai et al. 2003). S'identificà també el residu Met⁵⁹³ com a important en aquest mateix sentit, ja que mutat a diferents aminoàcids, produïa un enzim menys sensible en tots els casos, amb alteracions en l'activitat específica (Morillas, Gómez-Puertas et al. 2003).

Observacions de Kolodziej i col·laboradors suggerien que interaccions intramoleculares entre les regions amino- i carboxiterminal de la proteïna o bé entre els dos TMs afectaven el grau de sensibilitat a l'inhibidor, i que canvis en l'estat fisiològic alteraven aquestes interaccions (Kolodziej and Zammit 1990; Pan, Cohen et al. 2002). La generació de proteïnes quimèriques entre els isotips A i B de CPT1 de rata, de marcades diferències en el comportament cinètic, va permetre confirmar aquestes observacions. Els enzims generats combinaven la regió N-terminal d'un isotip amb la regió C-terminal de l'altre, intercanviant també els fragments TM i el *loop* intermembrana entre ells. Els resultats confirmaren la importància de les interaccions intramoleculares entre aquestes dues regions en determinar la sensibilitat dels enzims al malonil-CoA, i mostraren que la CPT1B és molt menys sensible a canvis en aquestes interaccions, amb una regió C-terminal molt més rígida que la CPT1A (Jackson, Zammit et al. 2000). Més endavant, l'elevada identitat de seqüència entre els enzims CPT1A de porc i de rata (per ser el mateix isotip), que també presentaren marcades diferències en el comportament cinètic, va permetre generar proteïnes quimèriques que combinessin diferents fragments de la regió C-terminal per tal d'identificar determinants moleculars de la sensibilitat al malonil-CoA en aquesta regió (Introducció, apartat III.4).

Estudis posteriors demostraren finalment l'existència d'una interacció física entre les regions N- i C-terminal de la proteïna que determina la sensibilitat al malonil-CoA de CPT1A de rata, mitjançant l'ús d'un *crosslinker* de 15.8Å de llargada de braç. Els autors postularen que els residus implicats en l'enllaç podrien ser una lisina de la regió aminoterminal (posicions 40 a 47) amb una cisteïna de la regió carboxiterminal, i que canvis en l'estat fisiològic (dejú, per exemple) alteren aquesta interacció. A més a més, demostraren que els canvis observats en la sensibilitat al malonil-CoA de CPT1A en introduir mutacions a la regió aminoterminal de la seqüència de la proteïna, són resultat d'alteracions en aquestes interaccions intramoleculares (Faye, Borthwick et al. 2005).

INTRODUCCIÓ

3.1.3. Disposició de CPT1A en la membrana: formació d'oligòmers i mecanisme de transport de les acilcarnitines a l'espai intermembrana

El fet que la sensibilitat de CPT1A al malonil-CoA es vegi afectada per la naturalesa de la membrana i l'estat fisiopatològic de l'organisme, així com per interaccions entre la regió amino- i carboxiterminal de l'enzim, va fer pensar en un rol dels fragments TMs de la proteïna en determinar la distància entre aquestes dues regions i per tant la sensibilitat a l'inhibidor (Lemmon, Treutlein et al. 1994; Popot and Engelman 2000).

Borthwick i col·laboradors van demostrar que la regió TM2 i els residus immediatament anteriors a aquesta seqüència (que formen part del *loop* intermembrana) són crucials en determinar l'angle d'ancoratge de la proteïna a la membrana i per tant el *docking* entre ambdós extrems amino- i carboxiterminal de l'enzim. La inserció o deleció d'una seqüència de residus en aquesta regió o bé la modificació dels residus implicats augmentà significativament la sensibilitat de CPT1A de rata al malonil-CoA, validant aquesta hipòtesi (Borthwick, Jackson et al. 2006). Aquests canvis no són deguts a la seqüència específica del *loop* intermembrana, ja que l'intercanvi d'aquesta regió entre l'isotip A i el B no produeix canvis en la sensibilitat respecte la proteïna nativa (Swanson, Foster et al. 1998), confirmant la importància dels residus del *loop* propers al TM2 i el TM2 en sí mateix en determinar el grau de sensibilitat de la CPT1A a l'inhibidor (veure més endavant).

El malonil-CoA exerceix una inhibició cooperativa positiva i al·lostèrica sobre la CPT1A, resultant en una relació sigmoidea entre la concentració de substrat (palmitoil-CoA) i l'activitat enzimàtica de l'enzim (McGarry, Mannaerts et al. 1978; Saggerson and Carpenter 1981). Així, la unió del malonil-CoA podria produir un canvi conformacional que resulti o bé en una millor unió d'una segona molècula de malonil-CoA, o bé en una pitjor unió d'una segona molècula de LCFA-CoA. Es creu que les proteïnes amb aquest tipus d'efectes cooperatius es troben formant complexes de dos o més subunitats, fet que plantejà la hipòtesi que la CPT1A pogués formar oligòmers un cop importada al mitocondri. L'anàlisi d'extractes mitocondrials de CPT1A de rata nativa i expressada en llevats mostrà que efectivament la proteïna s'associa en oligòmers, principalment trimers, tot i que no observaren diferències en l'estat d'agregació de la proteïna en animals diabètics o en dejú respecte els control (Faye, Esnous et al. 2007). Considerant que la permeabilitat de la MME no permet el pas de les acilcarnitines formades a la cara citosòlica de la membrana per CPT1 (Benz 1994), Faye i col·laboradors postularen en aquest treball dos possibles mecanismes de transport a l'interior mitcondrial (Figura I.11).

INTRODUCCIÓ

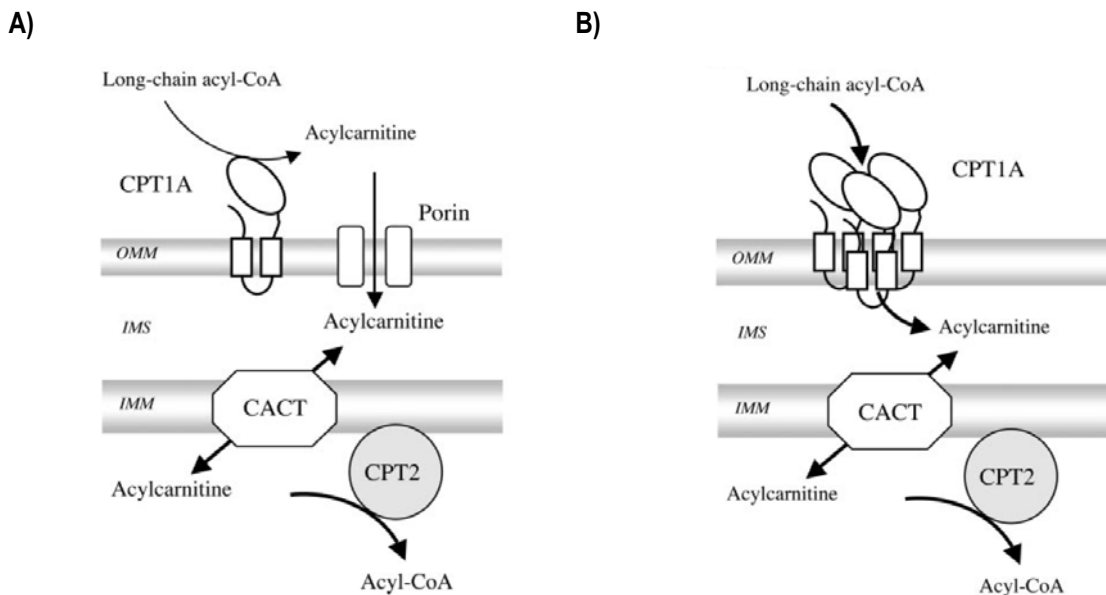


Figura I.11. Possibles mecanismes de transport dels LCFA-CoAs a l'interior mitocondrial.
Extret de (Faye, Esnous et al. 2007).

Com s'observa a la figura I.11A, un mecanisme implica la porina com a molècula que transporta les acilcarnitines sintetitzades en el citosol per CPT1. La porina, o VDAC (*Voltage dependent anion selective channel*) és una proteïna altament expressada a la MME, encarregada de la regulació de la permeabilitat de la membrana a ions i metabòlits (Benz 1994; Rostovtseva and Colombini 1996). La inhibició específica d'aquesta porina aboleix totalment l'oxidació del palmitat i el palmitoil-CoA en fetge i cor de rata, sense alterar l'oxidació d'altres substrats com el glutamat, piruvat i la palmitoilcarnitina (König, Kocsis et al. 1977; Turkaly, Kerner et al. 1999). Corroborant aquestes observacions, s'ha identificat aquest canal en els llocs de contacte de la membrana mitocondrial, formant part dels complexos MICOS (*Mitochondrial Contact Site*) (Harner, Körner et al. 2011), on podria trobar-se proper a la resta d'enzims del sistema CPT formant part d'una mateixa unitat funcional (Kashfi, Mynatt et al. 2011) (Introducció, apartat II.4.3). En aquest cas, les acilcarnitines de cadena llarga produïdes al citosol serien introduïdes a l'espai intermembrana a través de la porina, i posteriorment translocades a la matriu mitocondrial a través de la CACT (Faye, Esnous et al. 2007).

El segon mecanisme mostrat a la figura I.11B suggereix que la catàlisi enzimàtica es dona en un canal format per l'associació de monòmers de CPT1, trobant-se el centre catalític dels enzims en la interfase de les subunitats, com es dona en el cas de la CAT (cloramfenicol acetiltransferasa) (Leslie, Moody et al. 1988). Un parell d'anys més tard es confirmà l'agregació de CPT1 en analitzar per espectroscopia de dicromisme circular i electroforesi en gel natiu un

INTRODUCCIÓ

pèptid corresponent al TM2 de la CPT1A de rata, veient que aquesta era la regió responsable de l'agregació de la proteïna (Jenei, Borthwick et al. 2009). Més recentment, s'ha demostrat que el motiu GXXXG-GXXXA del TM2 és el responsable de l'oligomerització de la proteïna, i que mutacions d'aquests residus disminueixen l'estat d'agregació d'hexàmer a trímer, o fins i tot menor i augmenten la sensibilitat de l'enzim al malonil-CoA (Jenei, Warren et al. 2011).

Recentment s'ha proposat un tercer model, després de la identificació de les proteïnes VDAC (porina) i ACSL (FACS de cadena llarga) formant part d'un complex enzimàtic heteroligomèric juntament amb CPT1, que confirmaria aquesta hipòtesi (Figura I.12).

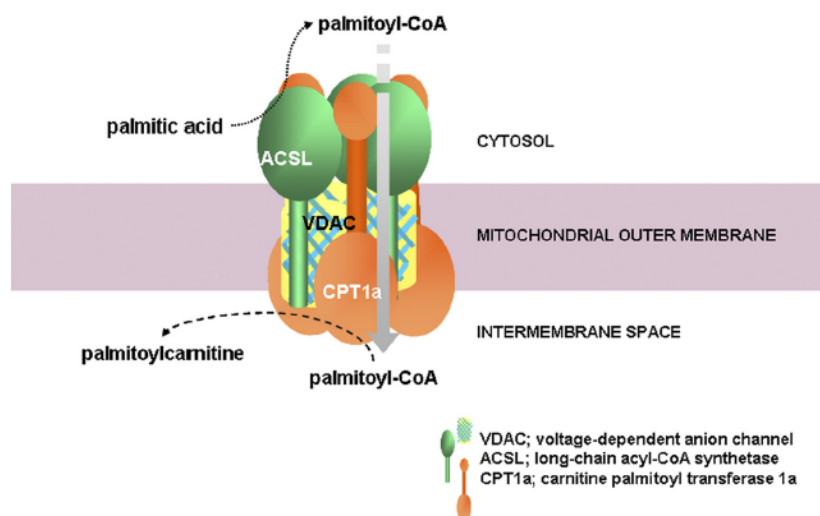


Figura I.12. Model proposat de formació d'un complex hetero-oligomèric que implica els enzims CPT1A, ACSL i el canal VDAC. El palmitoil-CoA format per l'ACSL al citosol és canalitzat a través de la VDAC a l'espai intermembrana, on es transesterificarà a palmitoilcarnitina per acció de la CPT1A. Extret de (Lee, Kerner et al. 2011).

A diferència de les anteriors observacions, aquest model situa el centre actiu de la CPT1 a l'espai intermembrana, de manera que la transesterificació del palmitoil-CoA a palmitoilcarnitina tindria lloc en l'espai intermembrana i no a la cara citosòlica de la MME (Lee, Kerner et al. 2011). Altres autors havien situat el lloc d'unió a l'acil-CoA de la proteïna a l'espai intermembrana, però han acabat desestimant aquesta opció (Murthy and Pande 1987; Kashfi and Cook 1999; Kashfi, Mynatt et al. 2011).

3.1.4. Models estructurals de CPT1A

Diferents autors han generat evidència experimental per tal d'aprofundir en l'estudi de l'estructura tridimensional de la CPT1A de rata, extrapolable a la proteïna humana per l'alta identitat de seqüència que comparteixen (Jackson, Zammit et al. 2000; Jogl and Tong 2003;

INTRODUCCIÓ

Morillas, López-Viñas et al. 2004). Per la manca d'un cristall de la proteïna, les estructures descrites fins al moment s'han obtingut per homologia de seqüència amb altres enzims de la família de les carnitina aciltransferases com la COT o la CrAT, especialment del domini catalític de la proteïna. De tota manera, l'alineament de la seqüència de la CrAT de ratolí amb la CPT1A humana mostra importants insercions en *loops* de la superfície fora del centre actiu que cal tenir presents a l'hora d'extrapolar evidències experimentals (Gobin, Thuillier et al. 2003). A continuació es presenten les principals característiques dels dos models estructurals més recentment descrits per CPT1A.

López-Viñas i col·laboradors presentaren l'any 2007 un model estructural que expliqués el tipus d'inhibició que exerceix el malonil-CoA sobre la CPT1A de rata, confirmant dos llocs d'unió per l'inhibidor, tal com s'havia descrit prèviament (Bird and Saggerson 1984; Zammit 1984; Zammit, Corstorphine et al. 1984; Grantham and Zammit 1986; Cook, Mynatt et al. 1994; Kashfi, Mynatt et al. 1994; Morillas, Gómez-Puertas et al. 2002).

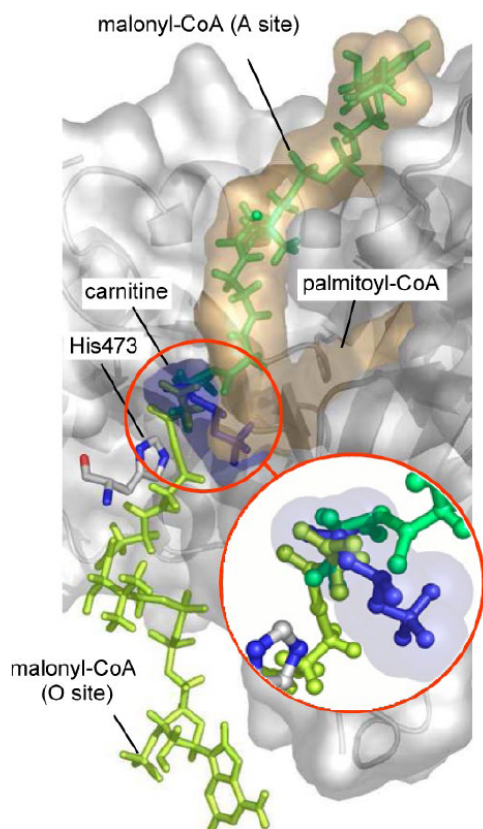


Figura I.13. Secció longitudinal de l'estructura de CPT1A indicant els dos putatius llocs d'unió al malonil-CoA. Es representa la molècula d'inhibidor en el lloc A en verd, i en el lloc O en groc. Els lloc d'unió del palmitoil-CoA i la carnitina són les zones ombrades en marró i blau, respectivament. Una molècula de carnitina en blau mostra la interferència que exerceix el malonil-CoA, en ambdues posicions (mostrat també en detall). Extret de (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007).

Tal com s'observa a la figura I.13, es situaren els dos llocs d'unió al malonil-CoA en els extrems distals del túnel catalític predit per l'enzim. S'anomena centre "A" al lloc d'unió de baixa afinitat per l'inhibidor, proper a la interacció entre els extrems N- i C-terminals de la proteïna, on

INTRODUCCIÓ

el malonil-CoA competeix amb l'acil-CoA (substrat) per l'entrada al centre catalític (Grantham and Zammit 1986). El motiu CoA es posicionaria a la part més exterior del túnel. Molècules com el CoA lliure, l'acetil-CoA i el propionil-CoA inhibeixen CPT1 unint-se al lloc d'unió a l'acil-CoA (Kashfi and Cook 1999). El centre "O" es troba al lloc Qposat del túnel catalític, i és el lloc d'unió exclusiva i d'alta afinitat per l'inhibidor. En aquest lloc, la interacció de l'inhibidor amb l'enzim depèn majorment del grup dicarbonílic (CO-CH₂-CO o bé CO-CO) més que del CoA amb els residus propers. Ambdós llocs comparteixen el centre d'unió a la carnitina.

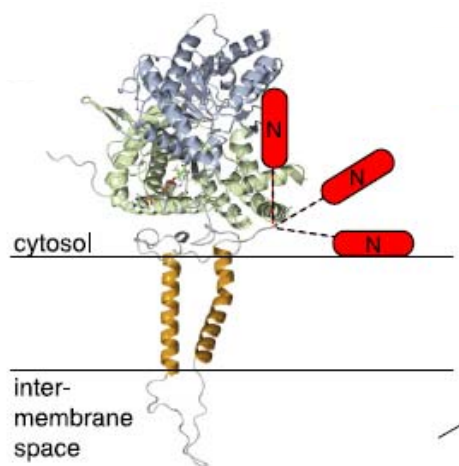
Es realitzà una predicció *in silico* de la regió aminoterminal de la proteïna per homologia de seqüència amb el factor de transcripció IIIA de *X. laevis* (entrada 1TF3, del *Protein Data Bank*). L'estructura construïda prediu 4 fulles beta (E1, residus 12–14; E2, residus 20 –22; E3, residus 27–30; E4, residus 34 –37) i una α -hèlix (H1, residus 38–47). Aquesta predicció es corresponia amb observacions anteriors, on s'havia predit que els residus 15-19 estarien formant part d'un gir entre fulles β que, en el model, seria entre la primera i la segona fulla (Jackson, Zammit et al. 2000).

El *docking* de la regió amino- sobre l'extrem carboxiterminal mostrà que la interacció entre els residus E26-K561 seria determinant del grau d'unió del malonil-CoA al lloc "A", fet que es confirmà en mutar ambdues posicions en experiments de *swapping* i comprovar que la mutació puntual dels residus provocava la pèrdua de sensibilitat de la CPT1A de rata al malonil-CoA (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007).

Més recentment Jenei i col·laboradors presentaren un segon model estructural de la CPT1A humana (Rao, Warren et al. 2011). S'analitzà per NMR un pèptid corresponent als 42 residus N-terminals de la proteïna i identificaren dues possibles disposicions en l'espai, respecte la regió C-terminal, que podrien determinar el grau d'activitat o inhibició de l'enzim. Considerant que l'anàlisi per NMR d'una proteïna solubilitzada és molt més real que la seva cristal·lització, i que la regió aminoterminal de tots els models de CPT1A dissenyats fins al moment es corresponia a altres proteïnes i no a la seqüència nativa de la proteïna, podem dir que aquest és el model més real que s'ha publicat fins al moment d'aquest enzim (Figura I.14).

INTRODUCCIÓ

Figura I.14. Representació esquemàtica per homologia de l'estructura de la CPT1A, excepte de la regió N-terminal (N), per la qual no existeix una estructura homòloga. Es representen els possibles estats d'associació de la regió N: associada a la MME, lliure en el citosol, i associada a la regió C-terminal. Es coneix la topologia de membrana de la CPT1A (Fraser, Corstorphine et al. 1997), però no les orientacions relatives entre els TMs i la regió C-terminal. Es mostra una possible conformació. Extret de (Rao, Warren et al. 2011).



Tal com s'observa a la figura I.14, s'identificaren dos possibles estats conformationals dels primers 25 residus de l'extrem aminoterminal de la proteïna: un estat catalíticament actiu de la proteïna (anomenat conformació N β), i un estat d'inhibició (conformació N α). La conformació N β de la regió aminoterminal consisteix en el plegament en dues fulles beta antiparal·leles dels residus 10-14 i del 19-23, seguit d'una hèlix α (anomenada α 2) dels residus 25-39. Els autors prediuen que en aquest estat conformational, l'extrem amino- es trobaria interaccionant amb l'extrem carboxitèrminal de la proteïna, i les fulles beta no permetrien l'entrada de l'inhibidor. En la conformació N α , la desestabilització de les cadenes β provocaria la formació d'una hèlix α (anomenada α 1) dels residus 2 al 8, de manera que la regió N-terminal passaria a interaccionar amb la membrana mitocondrial externa i l'absència de les cadenes β permetria l'entrada de l'inhibidor.

La desestabilització de les fulles β i el posterior *switch* a la conformació N α seria conseqüència de canvis en l'estat metabòlic a curt plaç (indicat per les concentracions de malonil-CoA) i a llarg plaç (que produeix canvis en la curvatura, composició i fluïdesa de la membrana) que alhora poden alterar la localització de l'enzim a la membrana (Jenei, Warren et al. 2011; Rao, Warren et al. 2011).

A diferència del model proposat per López-Viñas i col·laboradors, els autors en aquest cas oferiren dues possibles solucions de *docking* entre els regions amino- i carboxitèrminal, situant la regió N-terminal propera al lloc d'unió dels acils-CoA (unió competitiva amb el malonil-CoA), o bé al lloc d'unió exclusiu pel malonil-CoA (unió alostèrica). En ambdues solucions, la col·locació d'una molècula de malonil-CoA en el model mostrarà que és necessari un desplaçament de la carnitina per permetre la unió de l'inhibidor a l'enzim. Aquest model d'unió és

INTRODUCCIÓ

reforçat per observacions prèvies (Jogl and Tong 2003), on s'havia descrit que l'oxidació del grup sulfhidril del CoA a àcid sulfònic ocupa el lloc d'unió a la carnitina carboxilada. S'explica així la relació inversa que existeix entre la sensibilitat a l'inhibidor i l'afinitat per la carnitina de l'enzim (Bird and Saggerson 1985), observada tant en l'enzim natiu aïllat (McGarry, Mills et al. 1983; de Vries, Arvidson et al. 1997), com en la proteïna recombinant expressada en sistemes heteròlegs (Zhu, Shi et al. 1997; Swanson, Foster et al. 1998; Jackson, Zammit et al. 2000; Shi, Zhu et al. 2000). De tots els enzims CPT1 descrits, l'enzim hepàtic de porc és l'únic que no compleix aquesta característica (Introducció, apartat III.4).

3.2. CPT1B

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, Mills 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, Esser et al. 1990; Weis, Esser et al. 1994).

El cDNA de la CPT1B de rata va ser aïllat a partir d'una llibreria de cDNA de teixit adipós marró i d'una altra de múscul cardíac (Yamazaki, Shinohara et al. 1995; Esser, Brown 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, Shinohara et al. 1996; Britton, Mackey 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.

Analitzada en un gel SDS-PAGE, CPT1B presenta una mobilitat electroforètica aparent de 82kDa, quan el seu pes real són 88.23kDa. 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, Brown 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 de l'mRNA (Yu, Lu et al. 1998) 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

INTRODUCCIÓ

per malonil-CoA (Kim, Koves et al. 2002). Finalment, s'ha demostrat que es tracta de proteïnes catalíticament inactives (van der Leij, Cox et al. 2002).

Com en el cas de la CPT1A, s'han publicat diferents treballs que mostren una associació de CPT1B amb proteïnes transportadores de FA com la FAT/CD36 i la FATP1 (Campbell, Tandon et al. 2004; Schenk and Horowitz 2006; Sebastián, Guitart et al. 2009) en mitocondris de cor i múscul esquelètic, que facilitaria l'oxidació mitocondrial dels LCFA. A diferència de CPT1A, però, no s'han publicat estudis sobre una possible oligomerització de la proteïna.

Es considera que un 60-80% del requeriment energètic del miocardi prové de l'oxidació de FA (Whitmer, Idell-Wenger et al. 1978). Però alhora es coneix que els nivells de malonil-CoA són sempre superiors a la IC_{50} de CPT1B. Com s'entén doncs que la via oxidativa estigui tan activada en un teixit com aquest? S'explicaria en part per la regulació transcripcional de *CPT1B* per LCFA a través de PPAR α . Així, els LCFA activen PPAR α , que heterodimeritza amb RXR (*9-cis retinoic acid receptor*) i s'uneixen a l'element de resposta a FA de la regió promotora de *CPT1B* activant la seva transcripció (Brandt, Djouadi et al. 1998; Mascaró, Acosta et al. 1998; Yu, Lu et al. 1998).

Una segona hipòtesi suggerida és que l'increment d'acils-CoA de cadena llarga generats pel propi sistema CPT activi l'AMPK, inhibeixi l'activitat de l'ACC disminuint per tant la síntesi de malonil-CoA (Gamble and Lopaschuk 1997). Aquesta hipòtesi queda reforçada pel fet que l'ACC2 (isoforma majoritària en múscul i cor) es trobi associada a la membrana mitocondrial externa, de manera que el malonil-CoA sintetitzat en aquesta regió sigui l'únic *pool* intracel·lular d'inhibidor que pugui inactivar la CPT1B.

D'altra banda, l'activitat CPT1 també es pot veure modificada, sobretot en situacions d'exercici intens, per la disponibilitat de carnitina i pel pH intracel·lular (Sahlin 1978; Hiatt, Regensteiner et al. 1989; Starritt, Howlett et al. 2000).

3.2.1. Principals diferències respecte CPT1A

La primera gran diferència entre ambdós isotips és el patró d'expressió: mentre CPT1A s'expressa principalment en tipus cel·lulars implicats en la detecció dels nivells de glucosa (cèl·lules pancreàtiques, hepatòcits, neurones hipotalàmiques...), els nivells de CPT1B són elevats en teixits amb elevada capacitat oxidativa, com el teixit adipós marró o el cor.

INTRODUCCIÓ

Tot i que ambdós isotips comparteixen una elevada identitat de seqüència, presenten marcades diferències en les seves característiques enzimàtiques: CPT1B és un enzim altament sensible al malonil-CoA (baixa IC_{50}) però baixa afinitat per la carnitina (alta K_m), com es mostra a la taula I.2.

	IC_{50} Malonil-CoA (μM)	K_m Carnitina (μM)	K_m Palmitoil-CoA (μM)
Rat CPT1A	1.9 ^a	100 ^b	43
Human CPT1B	0.069 ^c	666	42

Taula I.2. Característiques enzimàtiques de CPT1A de rata i CPT1B humana. Dades obtingudes de mitocondris de llevats *P. pastoris* soca GS115 recombinants. ^a, ^b, ^c (de Vries, Arvidson et al. 1997; Zhu, Shi et al. 1997; Dai, Zhu et al. 2000).

A diferència de CPT1A, s'ha vist que la sensibilitat al malonil-CoA de l'isotip muscular no varia en rates dejunades respecte els animals control (Paulson, Ward et al. 1984; Park and Cook 1998). A més a més, mentre que en CPT1A es pot desplaçar la unió de l'inhibidor en afegir concentracions creixents de palmitoil-CoA, aquest no és el cas de CPT1B, que sembla que presenta una inhibició més al·lostèrica que no competitiva pel malonil-CoA, on el grau d'inhibició depèn de la unió d'alta afinitat i, per tant, hauria de ser directament proporcional a la concentració de malonil-CoA a la cèl·lula (Bird and Saggerson 1984).

En els estudis de Jackson i col·laboradors s'intercanvià el *loop* intermembrana i el TM2 entre isotips de la CPT1 expressada en llevats i observaren que la regió carboxiterminal de l'isotip B és una estructura molt més rígida i menys sensible a canvis en la membrana i les interaccions entre les regions N- i C-terminal que l'isotip A, fet que explicaria la manca d'efecte del dejú i la fluïdesa de la membrana respecte la CPT1A (Jackson, Cameron et al. 2000).

3.2.2. Determinants moleculars de la sensibilitat al malonil-CoA

Els estudis realitzats fins al moment no expliquen les diferències en el comportament cinètic entre els isotips hepàtics i musculars de CPT1.

Diferents grups han generat proteïnes quimèriques entre ambdós isotips hepàtic i muscular de rata. Els resultats mostraren que la substitució de la regió N-terminal (residus 1-82) de la CPT1A amb la regió N-terminal de la CPT1B no alterà la sensibilitat al malonil-CoA de les proteïnes quimèriques, suggerint que les interaccions intramoleculares entre els extrems N- i C-terminal de la proteïna no eren l'únic factor implicat en determinar les diferències cinètiques entre

INTRODUCCIÓ

isotips de la CPT1 (Introducció, apartat II) (Swanson, Foster et al. 1998; Jackson, Cameron et al. 2000).

El mateix tipus d'experiment realitzat en les proteïnes humanes mostrà que la interacció dels dos TMs de l'enzim era crucial en determinar el grau de sensibilitat a l'inhibidor. Així, una CPT1A amb els primers 79 residus de la CPT1B, incloent el TM1, mostrà una disminució en la sensibilitat al malonil-CoA ($IC_{50}=9\mu M$ vs $2\mu M$ del *wild-type*), mentre que el mateix enzim amb els primers 130 aminoàcids de la CPT1B, incloent el TM1 i el TM2, no mostrà canvis en el grau d'inhibició respecte l'enzim *wild-type* (Shi, Zhu et al. 2000).

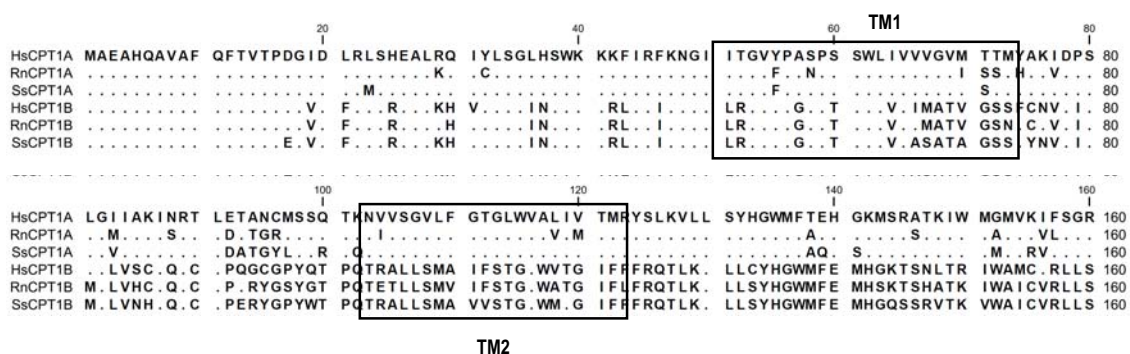


Figura I.15. Alineament de seqüències aminoacídiques dels primers 160 residus de diferents proteïnes CPT1. Les àrees enquadrades corresponen als fragments transmembrana (TM1 i TM2). HsCPT1A, CPT1A humana; RnCPT1A, CPT1A de rata; SsCPT1A, CPT1A de porc; HsCPT1B, CPT1B humana; RnCPT1B, CPT1B de rata; SsCPT1B, CPT1B de porc.

Com s'observa a la figura I.15, la seqüència proteica de la CPT1 humana, de rata i ratolí dels primers 18 residus d'ambdós isotips és idèntica. De tota manera, la deleció dels primers 18 residus de la CPT1B humana no té el mateix efecte que en la CPT1A de rata i de porc (Shi, Zhu et al. 1998; Nicot, Hegardt et al. 2001), provocant només una lleugera disminució de la sensibilitat al malonil-CoA ($IC_{50}=0.3\mu M$ vs $0.07\mu M$ del *wild-type*). D'altra banda, la deleció dels primers 28 residus disminueix 100 vegades la sensibilitat a l'inhibidor, comportant-se doncs, com un fort determinant positiu de la sensibilitat al malonil-CoA de la CPT1B humana ($IC_{50}=7.5\mu M$) (Shi, Zhu et al. 2000), mentre que la deleció dels residus 19-30 de la CPT1B de rata no modificà la IC_{50} per l'inhibidor respecte l'enzim *wild-type* (Jackson, Zammit et al. 2000). Aquestes observacions suggeriren que efectivament aquesta era una regió crucial en explicar les diferències entre ambdós isotips. Per tal d'elucidar quins residus serien importants en marcar aquestes diferències, es generaren mutants puntuals de les posicions Val¹⁹, Leu²³, Ser²⁴ i Ser²⁸ a alanina, tot i que cap dels enzims generats presentà canvis en l'activitat ni la sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA. Mutants dobles i triples d'aquests residus tampoc produïren canvis en

INTRODUCCIÓ

les constants enzimàtiques dels enzims resultants. De tota manera, en combinar la mutació de les quatre posicions a alanina amb la deleció dels primers 18 residus, es generà un enzim menys sensible al malonil-CoA que els mutants $\Delta 18$ i $\Delta 28$ *Human* CPT1B ($\Delta 18+V19AL23AS24AS28A$, $IC_{50}=10\mu M$) (Zhu, Shi et al. 2003).

Com en la CPT1A de rata, s'han identificat residus de la regió N-terminal de la proteïna que, mutats puntualment, produeixen canvis molt importants en la sensibilitat pel malonil-CoA. Així, la mutació del residu Glu³ a alanina produeix un augment d'unes 60 vegades de la seva IC_{50} , efecte similar a l'observat en introduir el mateix canvi a l'enzim hepàtic. D'altra banda, la mutació del residu His⁵ a alanina no modificà la sensibilitat de la proteïna a l'inhibidor, tot i que mostrà una disminució en la unió de baixa afinitat a l'inhibidor. La combinació de la mutació E3A amb les mutacions V19A, L23A i S24A mostrà una sensibilitat similar al mutant $\Delta 18+V19AL23AS24AS28A$, suggerint que aquests quatre residus formen part del lloc d'unió al malonil-CoA de la CPT1B. Els autors postulen que la mutació E3A probablement podria estar implicant un pont d'hidrogen o salí amb un d'aquests residus o potser amb un altre residu del lloc d'unió al malonil-CoA i/o del centre actiu (Zhu, Shi et al. 2003).

La deleció dels primers 80 residus de la CPT1B de rata en la soca X-33 de *P. pastoris* produí un enzim amb similar activitat i menor sensibilitat a l'inhibidor fisiològic que la proteïna *wild-type* ($IC_{50}=11.1\mu M$ vs. $3.3\mu M$ del *wild-type*) (Jackson, Zammit et al. 2000). Alternativament, el mutant equivalent de la CPT1B humana ($\Delta 83$) en la soca GS115 del mateix llevat resultà en un enzim inactiu (Shi, Zhu et al. 2000). A més a més, les activitats específiques dels diferents mutants deleccionats en aquest treball mostren una pèrdua de la capacitat catalítica de l'enzim a partir de la deleció dels primers 51 residus de la proteïna. Els autors suggereixen que el TM1 té un paper més destacat en els isotips B respecte els isotips hepàtics en determinar l'activitat catalítica de l'enzim.

3.3. CPT1C

L'isotip CPT1C és el més recentment descrit de CPT1. S'aïllà a partir d'ESTs (*expressed sequence tags*), petits fragments de nucleòtids transcrits i processats, que poden donar lloc a una proteïna o no (Nagaraj, Deshpande et al. 2007). 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. Segons les seqüències dels cDNAs de ratolí i humà, amb una identitat entre elles del 83.5%, es dedueix una proteïna de 803 aminoàcids que, analitzada amb anticossos específics, mostra un pes molecular

INTRODUCCIÓ

pròxim al dels isotips A i B. La similitud en la seqüència aminoacídica del 54.5% i el 52.7%, respectivament, preveu una estructura primària similar entre els tres isotips, amb dos fragments TM altament hidrofòbics que indiquen l'ancoratge de la proteïna a membranes biològiques (Price, van der Leij et al. 2002).

Com a fet diferencial respecte els isotips A i B, CPT1C presenta una extensió de 32 residus a la regió carboxiterminal de la proteïna que, analitzats amb programes predictors de dominis estructurals, no correspon a cap estructura funcional coneguda (Figura I.16).

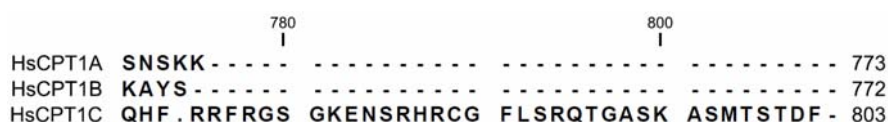


Figura I.16. CPT1C presenta una extensió de 32 residus a l'extrem C-terminal de la proteïna respecte als altres isotips. Alineament dels últims 40 residus de la seqüència proteica dels tres isotips descrits de la CPT1 humana.

3.3.1. Organització gènica i isoformes de la CPT1C humana

El gen humà *CPT1C* es localitza en el locus cromosòmic 19q13.33, adjacent a l'extrem 3' del gen que codifica per una proteïna Arginina N-metiltransferasa. Consta de 21 exons que originen dos trànscrips diferents d'unes 2.8Kb en humans: *transcript variant 1* (NM_001136052), que presenta el mateix ORF que la isoforma (BC_029104), amb la qual també s'ha treballat en aquesta tesi doctoral, i *transcript variant 2* (NM_152359). Encara que ambdós mRNAs són producte del mateix gen, difereixen en longitud i nombre d'exons codificants: en ambdues variants els exons 2 i parts de l'exó 16, i en la variant 2 també l'exó 3, no són codificants. Lohse i col·laboradors han estudiat recentment la funció d'aquests exons (veure Introducció, III.3.3.3).

Ambdós mRNAs contenen un uORF (*untranslated Open Reading Frame*) que comparteix el mateix codó d'inici de lectura, mentre que el codó de parada prové de l'exó 3 en un cas i de l'exó 4 en l'altre, respectivament. Així, l'uORF del trànscrip 1 comença al nucleòtid 97 i conté el codó de parada al nucleòtid 198, resultant en un pèptid de 34 residus, i en el cas del trànscrip 2 aquest s'inicia al nucleòtid 91 i finalitza al nucleòtid 206, resultant en un pèptid de 37 residus (Figura I.17). Cap dels pèptids produïts per uORFs de *CPT1C* presenta similitud amb proteïnes o dominis proteics coneguts (Lohse, Reilly et al. 2011).

INTRODUCCIÓ

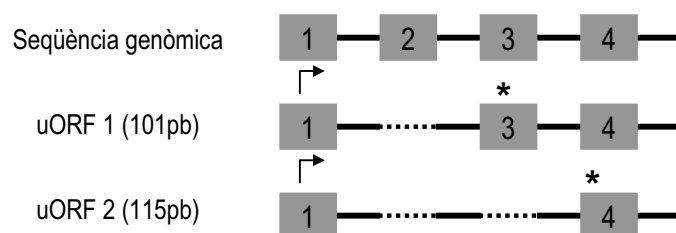


Figura I.17. Esquema dels uORFs presents a la regió 5' de la seqüència genòmica de la *CPT1C* humana. Representació esquemàtica dels primers 4 exons del gen (rectangles verds). Les fletxes indiquen l'inici de transcripció dels uORFs identificats i els asteriscs el codó de parada. Les línies discontinües marquen els exons no codificants.

A més dels dos trànscripats descrits, experiments d'aquesta tesi doctoral han demostrat l'expressió d'una tercera isoforma de la proteïna en cervell humà (Resultats, apartat III.6.2). L'eina *Evidence viewer* recull tota la informació biològica disponible sobre un determinat gen, agrupant tots els models RefSeq, mRNAs anotats a la base de dades *GenBank*, trànscripats coneguts o potencials, i ESTs que alineen amb l'àrea d'interès. Tal com s'observa a la figura I.18, la informació present en aquesta base de dades mostra fins a 16 mRNAs diferents corresponents al gen de la *CPT1C* humana.

INTRODUCCIÓ

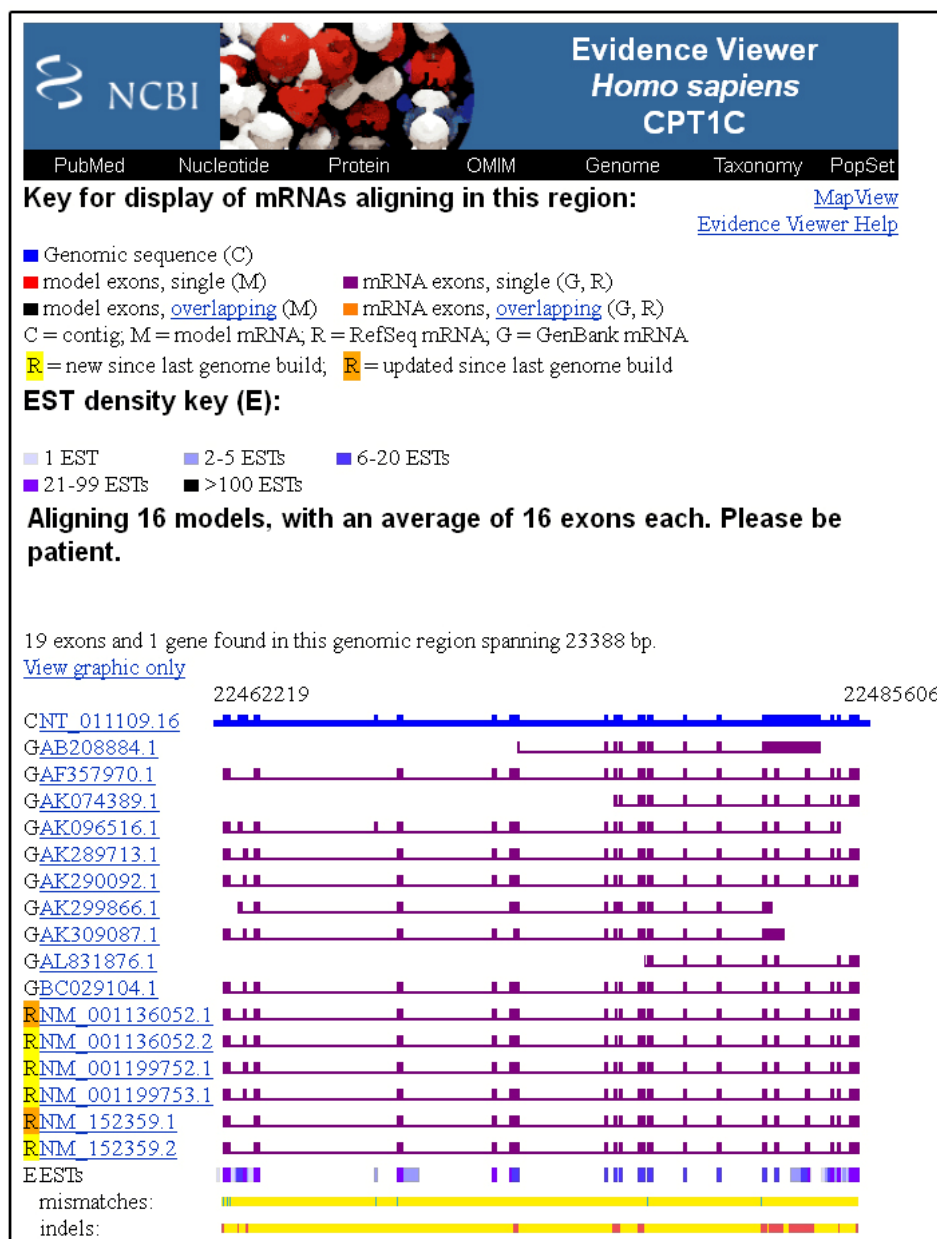


Figura I.18. Representació esquemàtica de totes les evidències biològiques corresponents al gen de la *CPT1C* humana. Informació disponible en la pàgina *Evidence Viewer* de la base de dades *Pubmed*.

3.3.2. Patró d'expressió i distribució subcel·lular de la proteïna

La *CPT1C* s'expressa principalment a cervell i nivells baixos de trànscrip es detecten en testicles i ovaris humans. A nivell cerebral es detecta l'expressió de la proteïna a gairebé totes les estructures, tot i que la seva expressió es concentra en àrees discretes directament implicades en el control de la gana i en el comportament alimentari: hipocamp i nuclis hipotalàmics paraventricular, arcuat i supraquiasmàtic (Price, van der Leij et al. 2002). Dai i col·laboradors mostraren per immunohistoquímica la localització únicament neuronal de *CPT1C*,

INTRODUCCIÓ

absent en cèl·lules gials (Dai, Wolfgang et al. 2007; Sierra, Gratacós et al. 2008), fet que contrastà amb l'observació que els gens implicats en el metabolisme dels FA en el SNC, com *CPT1A* o *HMGCS2* (Blázquez, Sánchez et al. 1998) s'expressin principalment en astròcits i minoritàriament en neurones (Introducció, apartat IV.1).

S'han descrit diferents localitzacions subcel·lulars de CPT1C. L'anàlisi per *Western blot* amb anticossos específics mostrà que, com en el cas de CPT1A, s'expressa en microsomes, peroxisomes i mitocondris (Price, van der Leij et al. 2002). Experiments d'immunohistoquímica localitzaren la proteïna endògena a la membrana mitocondrial de la línia cel·lular hipotalàmica GT1-7 (Dai, Wolfgang et al. 2007).

Posteriorment, i mitjançant immunofluorescència en diferents línies cel·lulars, es mostrà la co-localització de la proteïna de fusió CPT1C-GFP amb la calnexina, marcador de reticle endoplasmàtic, comparada amb l'expressió mitocondrial de CPT1A-GFP. En aquest estudi, a més a més, es generaren proteïnes quimèriques on s'havia substituït la regió N-terminal (els primers 152 residus, incloent el senyal d'import mitocondrial) de CPT1A amb la regió homòloga de CPT1C, i viceversa. S'observà que la seqüència d'import de CPT1A era capaç de dirigir CPT1C a la membrana mitocondrial, mentre que la regió homòloga de CPT1C dirigia CPT1A al reticle endoplasmàtic (Sierra, Gratacós et al. 2008).

3.3.3. Estudi de l'activitat enzimàtica de CPT1C

La CPT1C de ratolí expressada en *Pichia pastoris* dona lloc a una proteïna amb una alta afinitat pel malonil-CoA ($K_D=0.24\text{mM}$ respecte a *Rat* CPT1A $K_D=0.19\text{mM}$), però inactiva davant una àmplia varietat d'acil-CoAs de diferents longituds, tot i conservar les posicions clau per l'activitat carnitina aciltransferasa i la sensibilitat a malonil-CoA (Price, van der Leij et al. 2002). De la mateixa manera, no es pogué detectar la producció d'acilcarnitines en extractes mitocondrials de fibroblasts transfectats transitòriament amb la proteïna (Wolfgang, Kurama et al. 2006). Com a última aproximació experimental, els mateixos autors repetiren l'assaig enzimàtic en cèl·lules semi-intactes transfectades de forma estable amb la proteïna, de nou sense èxit (Wolfgang, Cha et al. 2008). Els resultats indicaven que la proteïna podria requerir modificacions covalents específiques de neurona o activacions al·lostèriques absents en els sistemes assajats.

La generació d'un ratolí *knock-out* (KO) de *Cpt1c* va permetre mesurar la producció endògena d'acils-CoA en diferents estructures cerebrals, sense observar diferències importants respecte els animals control. Però prediccions 3-D de la proteïna per homologia de seqüència

INTRODUCCIÓ

amb el cristall de la COT (no publicades) indicaven que el plegament de CPT1C ofereix un *pocket* prou gran per acomodar els LCFA i permetre la reacció enzimàtica típica de les CPT1 (Wolfgang, Cha et al. 2008).

Per aquest motiu, Sierra i col·laboradors posaren a punt un mètode molt més sensible de mesura per HPLC-MS/MS de les espècies produïdes a la reacció, que va permetre detectar una producció residual de palmitoïlcarnitina en cèl·lules neuronals en cultiu que expressaven la proteïna transfectada transitòriament. Aquesta activitat CPT1 residual no afectà els nivells de β -oxidació mitocondrial del palmitat, fet que els autors atribuïren a la distribució subcel·lular de la proteïna, localitzada en reticle endoplasmàtic. Es plantejà així com a hipòtesi que CPT1C podria actuar com a donador o acceptor de substrat (palmitoïl-CoA) ja que manté el lloc d'unió a la carnitina en l'estructura primària (Sierra, Gratacós et al. 2008).

3.3.4. Fenotip resultant de la modificació dels nivells d'expressió de *Cpt1c*

El primer ratolí KO de *Cpt1c* generat, fèrtil i viable, presentà una menor ingesta i menor pes corporal respecte els animals *wild-type*. Alimentats amb una dieta rica en grasses, els animals KO augmentaren de pes més ràpidament i eren més susceptibles a patir obesitat, amb una major tendència a desenvolupar resistència a insulina, respecte els animals control. Aquests animals, a més a més, presentaren una menor oxidació sistèmica de FA durant el dejuni. Per aquest motiu, es relacionà l'expressió d'aquest gen amb la regulació més que el metabolisme per sí mateix, i el control hipotalàmic de la ingesta (Wolfgang, Kurama et al. 2006).

Estudis posteriors del mateix grup demostraren que els animals KO no presentaven diferències respecte els animals control en els nivells hipotalàmics de malonil-CoA, com tampoc en l'oxidació d'oleat a CO₂ mesurada en explants hipotalàmics i corticals. L'anàlisi per RT-PCR del patró d'expressió gènica en hipocamp va descartar la manca d'efectes observats en interferir *Cpt1c* deguda a una compensació amb la resta de gens del metabolisme dels FA o altres acilcarnitines. Paral·lelament, tampoc s'observaren efectes en els nivells de carnitina lliure i acilcarnitines en plasma, indicant que el defecte en la β -oxidació sistèmica observat en el primer treball no era degut a canvis en els nivells de substrat en plasma. Els autors postularen que CPT1C estaria metabolitzant un producte lipídic en el SNC amb capacitat per modificar el pes corporal (Wolfgang, Cha et al. 2008). Posteriorment demostraren que l'augment de pes observat en aquests animals és degut a una disminució del gast energètic, suggerint que CPT1C és responsable de la resposta a la dieta i, probablement, un sensor dels nivells de glucosa en sang (Wolfgang, Cha et al. 2007).

INTRODUCCIÓ

Confirmant aquests resultats, ratolins als quals s'ha sobreexpressat la proteïna presenten el fenotip contrari. La injecció intrahipotalàmica d'un adenovirus codificant per CPT1C resultà en una resistència a l'obesitat induïda per una dieta rica en grasses dels animals injectats respecte els animals control. Alternativament, no s'observaren diferències en el pes dels animals quan eren alimentats amb dieta control (Dai, Wolfgang et al. 2007). Totes les observacions suggerien, doncs, un efecte de CPT1C sobre el control de la ingesta i la regulació de l'homeòstasi energètica, situant la proteïna com una diana dels nivells de malonil-CoA i, per tant, com un possible punt de tractament de desordres metabòlics que es presentin amb obesitat [revisat per (Wolfgang and Lane 2011)].

En contrast amb aquest fenotip, però, el segon animal KO generat per Gao i col·laboradors no presentà diferències de pes corporal respecte els animals control (Gao, Chen et al. 2009), fet que els autors atribuïren al canvi de soca de ratolins i a l'estratègia seguida per silenciar el gen. Alimentats amb una dieta rica en grasses, els animals KO també presentaren major susceptibilitat a l'obesitat i resistència a insulina que els animals control, validant així la desregulació en l'homeòstasi energètica observada en tots els animals on s'ha interferit aquest gen, principalment en resposta a una dieta amb alt contingut en grasses. El tercer animal KO de *Cpt1c* generat, en aquesta mateixa soca de ratolins, tampoc presenta diferències en el pes respecte els animals control [(Carrasco 2012), Tesi Doctoral].

La injecció en el nucli arcuat (Arc) d'un adenovirus codificant per la CPT1C humana fou capaç de revertir els efectes sobre els nivells de ceramides i la ingesta provocats per mirioquina, inhibidor del pas limitant de la síntesi de ceramides, suggerint que CPT1C augmenta la síntesi *de novo* de ceramides en el reticle endoplasmàtic, que al seu torn produeixen un increment de l'expressió d'NPY, regulant així la ingesta i el pes corporal (Gao, Zhu et al. 2011). Estudis més recents, però, han demostrat que encara no és clar el mecanisme pel qual CPT1C regula els nivells de ceramides, i que l'efecte no és a través de la síntesi *de novo* (Carrasco, Sahun et al. 2012). Les ceramides, principal constituent de les membranes plasmàtiques, estan formades per un àcid gras i una esfingosina, i la síntesi *de novo* s'inicia mitjançant la condensació d'una molècula de palmitoil-CoA amb una serina (Stryer 1995). En els últims anys s'ha abandonat la idea que les ceramides són només molècules estructurals i se'ls ha començat a donar importància com a molècules senyalitzadores, responsables de la regulació de processos tan importants com la diferenciació, proliferació, mort cel·lular programada i apoptosi (Cutler and Mattson 2001), així com el pes corporal i l'homeòstasi energètica (Yang, Badeanlou et al. 2009). Els autors postulen que CPT1C estaria actuant, doncs, en una via anabòlica més que catabòlica i

INTRODUCCIÓ

que la proteïna estaria permetent l'entrada del palmitoïl-CoA a l'interior del reticle endoplasmàtic, per tal de subministrar el principal substrat d'aquesta via metabòlica. De tota manera, considerant que l'expressió de CPT1C es troba restringida al SNC i testicles, i que la síntesi *de novo* de ceramides és una via metabòlica activa en tots els teixits de l'organisme, aquest no podria ser l'únic mecanisme de transport de palmitat a l'interior del reticle.

La sobreexpressió de la MCD en l'Arc produeix un augment de la ingesta en disminuir els nivells de malonil-CoA i bloquejar la inhibició de la ingesta induïda per leptina (He, Lam et al. 2006; Gao, Keung et al. 2011). En la mateixa línia, Gao i col·laboradors demostraren una relació entre els nivells de malonil-CoA en l'Arc i els nivells de ceramides, en observar que la sobreexpressió de la MCD incrementava els nivells de ceramides alhora que bloquejava la disminució de ceramides induïda per leptina en l'Arc (Gao, Zhu et al. 2011). Globalment, aquests resultats explicaren els efectes anorèctics de la leptina amb un augment dels nivells de malonil-CoA, la inhibició de l'activitat de CPT1C, que disminueix els nivells de ceramides i de l'expressió del pèptid orexigènic NPY.

Una altra funció coneguda del reticle endoplasmàtic és l'elongació dels àcids grassos sintetitzats en el citosol per acció de la FAS (Nugteren 1965). Una part significativa d'aquests àcids grassos, juntament amb àcids grassos provinents de la dieta, seran allargats fins a formar els anomenats àcids grassos de cadena molt llarga (VLCAD), que contenen un mínim de 18 àtoms de carboni. El primer pas en la síntesi d'aquestes molècules és la condensació d'una molècula de palmitoïl-CoA amb una de malonil-CoA, i es dona principalment a la cara interna de la membrana del reticle endoplasmàtic. Tot i que representin una petita porció del total de lípids de l'organisme, s'ha descrit que són crítics per al correcte funcionament neuronal, i petites alteracions poden resultar en importants patologies neurològiques (Rasmussen et al. 1994; Braiterman et al. 1999; Heinzer et al. 2003).

Estudis recents amb ratolins transgènics que sobreexpressen CPT1C presenten microencefàlia i una inhibició del creixement postnatal. S'observà una dramàtica disminució dels VLCFA quan els animals eren alimentats amb dietes amb baix contingut en grasses, relacionant així la proteïna amb l'elongació dels àcids grassos. El fet que el fenotip dels animals sigui diferent segons la composició de la dieta, reafirmà la idea d'una regulació de *Cpt1c* pel tipus de dieta (Reamy and Wolfgang 2011).

INTRODUCCIÓ

En aquesta mateixa línia, l'últim estudi funcional amb ratolins KO de *Cpt1c* mostra efectes sobre les funcions motores i la capacitat d'aprenentatge espacial dels animals, que els autors relacionen amb una disminució dels nivells de ceramides intracel·lulars, tot i que sense identificar encara el mecanisme molecular d'acció pel qual CPT1C modula aquests nivells (Carrasco, Sahun et al. 2012).

3.3.5. Regulació transcripcional de la CPT1C humana

En el moment d'iniciar el present treball no existia bibliografia relacionada amb la regulació transcripcional de *CPT1C*. En l'últim any, però, vàries publicacions han donat més pistes sobre la regulació del gen.

Molt recentment, en un *microarray* de cDNAs activats per p53, s'ha identificat *CPT1C* com un gen freqüentment expressat en tumors resistents a rapamicina i sobreexpressat en resposta a l'estrés metabòlic. De les 214 mostres tumorals analitzades, 168 presentaven una sobreexpressió de *CPT1C*, que es correlacionà inversament amb l'activació de la via d'mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Paral·lelament, es detectà un augment dels nivells d'mRNA també en pacients amb càncer de pulmó no microcític (NSCLC, *non-small-cells lung cancer*) tot i que en aquest cas per un mecanisme independent a p53, fet que implica *CPT1C* com una via independent de creixement tumoral controlada per factors desconeguts encara. La transfecció estable de *CPT1C* en línies cel·lulars tumorals produí un augment en l'oxidació de FA, la producció d'ATP i la resistència a la deprivació de glucosa o hipòxia. De la mateixa manera, cèl·lules canceroses on s'havia interferit l'expressió de *CPT1C* amb la tecnologia siRNA produeixen menys ATP i són més sensibles a l'estrés metabòlic. La depleció de *CPT1C* en injerts tumorals en ratolins, a més a més, retrassa el creixement tumoral, indicant que l'expressió d'aquest gen contribueix al creixement tumoral. Globalment, aquests resultats mostren que les cèl·lules tumorals poden emprar un mecanisme que implica *CPT1C* i el metabolisme dels FA com a protecció en situacions d'estrés metabòlic com són la hipòxia o la deprivació de glucosa. Per tant, i de manera rellevant, es proposa *CPT1C* com una nova diana terapèutica pel tractament de tumors hipòxics (Zaugg, Yao et al. 2011).

Relacionat amb aquestes observacions, recentment s'ha localitzat un uORF a la regió 5'UTR de la *CPT1C* humana que reprimeix la transcripció del gen en condicions normals. En resposta a estímuls específics d'estrés, com poden ser la deprivació de glucosa, el tractament amb palmitat-BSA, o la inhibició de l'AMPK, enzim postulat com un regulador de la sacietat, es perd aquesta repressió (Lohse, Reilly et al. 2011). Sembla ser que serien els FA els principals

INTRODUCCIÓ

protagonistes en mediar aquesta pèrdua de repressió exercida per l'uORF, a través de l'activació de l'AMPK, fet que explicaria l'aparició de fenotip en els animals transgènics de *CPT1C* en resposta a una dieta rica en grasses. Calen encara més estudis per aprofundir en aquest mecanisme de regulació del gen.

4. La CPT1 de porc

Una part dels estudis presentats en aquesta tesi doctoral s'ha realitzat en la proteïna CPT1 de porc, donat que és un animal que presenta unes característiques metabòliques peculiars, molt diferents als humans. En adults, la β -oxidació hepàtica és poc efectiva mentre que presenten una bona β -oxidació muscular, comportament contrari al que succeeix en humans. En nounats, els nivells de β -oxidació i cetogènesi es troben molt disminuïts respecte a altres mamífers (Heo, Lin et al. 2000).

	IC ₅₀ Malonil-CoA (μ M)	K _m Carnitina (μ M)	K _m Palmitoil-CoA (μ M)
<i>Rat</i> CPT1A	1.9 ^a	100 ^b	43
<i>Human</i> CPT1B	0.069 ^c	666	42
<i>Pig</i> CPT1A	0.141 ^d	126	35
<i>Pig</i> CPT1B	0.9 ^e	197	82

Taula I.3. Taula comparativa de les característiques enzimàtiques de CPT1A de rata, CPT1B humana i CPT1A i CPT1B de porc. Dades obtingudes de mitocondris de llevats *P. pastoris* soca GS115 recombinants. ^a (de Vries, Arvidson et al. 1997), ^b (Dai, Zhu et al. 2000), ^c (Zhu, Shi et al. 1997), ^d (Nicot, Hegardt et al. 2001), ^e (Relat, Nicot et al. 2004).

La CPT1A de porc ha resultat ser una quimera natural dels isotips A i B, amb una afinitat per la carnitina ($K_m=126\mu$ M) i el palmitoil-CoA ($K_m=35\mu$ M) similars a l'isotip hepàtic de rata (i humans), com s'observa a la taula I.3 (Nicot, Hegardt et al. 2001). De tota manera, l'enzim presenta una sensibilitat a malonil-CoA típica dels isotips B, molt major que la proteïna de rata ($IC_{50}=0.141\mu$ M, vs. $IC_{50}=2\mu$ M de CPT1A de rata), fet que explica la menor β -oxidació hepàtica que el porc presenta respecte les altres espècies estudiades (Duée, Pégrier et al. 1994; Schmidt and Herpin 1998; Nicot, Hegardt et al. 2001). Aquest enzim, a més a més, no manté la relació inversa entre l'afinitat per la carnitina i la inhibició per malonil-CoA observada en la resta d'enzims CPT1 estudiats, sinó que ambdues molècules s'hi uneixen amb alta afinitat. La concentració de carnitina en rates adultes és baixa (McGarry, Woeltje et al. 1989), fet que es correlaciona amb l'alta afinitat (baixa K_m) que l'enzim CPT1A de rata presenta. S'ha suggerit que aquest també sigui el cas de la CPT1A de porc.

INTRODUCCIÓ

Estudis en la CPT1A de porc demostraren que els primers 18 residus són crucials en determinar les diferències en la sensibilitat al malonil-CoA respecte la CPT1A de rata. D'altra banda, es generaren quimeres que combinaven les regions amino- amb les regions carboxiterminal entre les CPT1A de porc i de rata, i s'observà que la regió C-terminal també tenia un efecte important sobre la sensibilitat al malonil-CoA. A més, l'estudi de les K_m pels substrats de les quimeres generades indicà que no hi havia grans canvis en l'afinitat per la carnitina i el palmitoil-CoA respecte els enzims *wild-type*, indicant que ambdues proteïnes adopten conformacions semblants en el centre actiu (Nicot, Relat et al. 2002).

En aquest mateix estudi, i per tal d'identificar determinants moleculars de la regió carboxiterminal que expliquessin les diferències de comportament cinètic existents entre la CPT1A de rata i de porc, es generaren quimeres que combinaven diferents fragments de la regió C-terminal entre les proteïnes. El mateix tipus d'experiments realitzats en isotips diferents havien generat enzims inactius (Dr. Gebre Woldegiorgis, comunicació personal), però l'alta identitat de seqüència existent entre aquestes proteïnes (86%, comparat amb el 62% que existeix entre els isotips A i B de rata, per exemple) va permetre produir enzims actius. La determinació del paràmetre IC_{50} posà de manifest que la substitució de qualsevol fragment de la regió C-terminal de l'enzim de rata per la seqüència de l'enzim de porc, produïa enzims amb la mateixa sensibilitat al malonil-CoA que la CPT1A de porc *wild-type*, indicant que la regió C-terminal es comportava com un únic domini amb dues possibles conformacions que determinaven dos graus diferents d'inhibició pel malonil-CoA (Nicot, Relat et al. 2002). Segons tots aquests resultats, les CPT1 de porc són eines molt útils per a l'estudi de les diferències en les característiques cinètiques entre els isotips hepàtics i musculars de l'enzim.

La sensibilitat al malonil-CoA de l'isotip B de porc és menor ($IC_{50}=0.9\mu M$) que la de l'isotip A, a diferència del que passa en la majoria d'espècies, i presenta una baixa K_m per la carnitina similar a la dels isotips A de rata i porc ($K_m=197\mu M$, típica dels isotips A, vs. $K_m=100\mu M$ de CPT1A de rata) (Relat, Nicot et al. 2004). L'afinitat pel palmitoil-CoA és similar a la de les altres espècies (Heo, Lin et al. 2000). El fet que els enzims CPT1B humà i de porc presentin una gran diferència en la sensibilitat al malonil-CoA, ens va fer pensar que, de nou, la generació de quimeres producte de la combinació de regions entre les dues proteïnes podria ser una estratègia molt útil per a l'estudi de determinants moleculars que expliquessin aquesta diferència. L'elevada identitat de seqüència entre ambdues proteïnes (89%) feia predir que les quimeres resultants serien enzims actius i es podrien dur a terme experiments similars als realitzats entre les CPT1A de porc i de rata (Nicot, Relat et al. 2002).

IV. ÀCIDS GRASSOS I CONTROL DE LA INGESTA

1. Metabolisme dels àcids grassos en el cervell

El cervell, amb un 50% de la seva massa de naturalesa lipídica, és el teixit amb major contingut lipídic de l'organisme, després del teixit adipós blanc (Watkins, Hamilton et al. 2001). Es coneix que l'origen d'aquest contingut és tant la captació de FA del torrent sanguini, com la síntesi local, ja sigui *de novo* com a partir de cossos cetònics (Rapoport, Chang et al. 2001), i que es troben principalment formant part d'estructures cel·lulars així com de cascades de senyalització.

Per les seves característiques metabòliques i funcionals, cal distingir dos tipus cel·lulars clarament diferenciats en el SNC: les neurones, amb relativament poca capacitat metabòlica, encarregades de la transmissió de senyals, i la glia (principalment astròcits, però també oligodendròcits, microglia i cèl·lules endotelials) amb la principal funció de donar suport físic i metabòlic a les neurones, formant la barrera hematoencefàlica. Està descrit que la principal font d'energia en el cervell és la glucosa, substituïda per cossos cetònics només en situacions com un dejuni prolongat, diabetis, dieta rica en grasses i lactància, quan els nivells de cetonèmia són elevats (Morris 2005). Ambdues poblacions cel·lulars utilitzen glucosa i cossos cetònics per obtenir energia, tot i que els astròcits metabolitzen la glucosa en major rendiment que les neurones i són l'única població neuronal amb dipòsit d'energia, en forma de glucogen (Magistretti and Pellerin 1996; Vannucci, Maher et al. 1997).

La utilització i destí dels FA en el SNC és encara avui dia un tema de debat. S'ha identificat l'expressió en neurones de gens responsables del transport, síntesi i degradació de FA (Le Foll, Irani et al. 2009) i, en contra de la idea que el cervell no pot oxidar FA, diferents estudis han demostrat que, tot i que en baixa proporció, una part de l'energia generada en el SNC prové de la β -oxidació (Blázquez, Sánchez et al. 1998; López, Lage et al. 2008). Aquest procés, però, es dona exclusivament en astròcits on, a més a més, es dona en major proporció que la utilització de glucosa i cossos cetònics per a l'obtenció d'energia en condicions normals (Edmond, Robbins et al. 1987; Edmond 1992; Staub, Winkler et al. 1995).

Com en la resta de teixits, un destí metabòlic important dels FA i els cossos cetònics cerebrals és la síntesi *de novo* de ceramides, esterols, esfingolípid i altres lípids, que passaran a formar part de membranes cel·lulars, així com la lipoproteïna més destacada per al transport dels impulsos neuronals, la mielina.

INTRODUCCIÓ

Com a fet rellevant, es coneix que una dieta rica en grasses o molt abundant afavoreix l'aparició de malalties neurodegeneratives, mentre que una restricció de dieta i/o calòrica prevé l'aparició d'aquestes, allarga l'esperança de vida i afavoreix la neurogènesi (Park and Lee 2011).

Diferents estudis demostren que tant la cetogènesi (Volpe and Obert 1981; Edmond 1992; Cullingford, Bhakoo et al. 1998; Cullingford, Dolphin et al. 1998) com la gluconeogènesi (Cruz, Scott et al. 1998; Ghosh, Cheung et al. 2005) són vies actives en astròcits, actuant així com a donadors de substrats energètics a les neurones. El fet que els astròcits utilitzin preferentment FA com a font d'energia fins i tot en condicions normals, ha fet relacionar-los amb els hepatòcits, que també subministren substrats energètics a la resta de teixits de l'organisme. A més a més, ambdós tipus cel·lulars presenten similars nivells de β -oxidació, expressen el mateix isotip de CPT1 (Blázquez, Sánchez et al. 1998), amb similars nivells intracel·lulars de malonil-CoA així com d'expressió de la HMGCS2, ambdós principals elements reguladors del catabolisme dels FA (Blázquez, Sánchez et al. 1998).

2. Control de la ingesta

Diferents àrees especialitzades del cervell, properes a la barrera hematoencefàlica, com poden ser alguns dels nuclis hipotalàmics, tenen la capacitat de sensar l'estat energètic de l'organisme i emetre una resposta que moduli la ingesta i el gast energètic, regulant així l'homeòstasi energètica. Es coneix que la zona més especialitzada en el control de la ingesta són els nuclis ventromedial (VMH) i arcuat (Arc) de l'hipotàlem, on s'hi concentren principalment dues poblacions neuronals diferents: neurones activadores de la ingesta (orexigèniques) que expressen els neuropèptids NPY (*Neuropeptide Y*) i AgRP (*Agouti-related peptide*), i neurones que, un cop activades, secreten els neuropèptids anorexigènics CART (*Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) i POMC (*Pro-opiomelanocortin*) (van den Top, Lee et al. 2004). Ambdues poblacions neuronals envien les seves projeccions cap a neurones de segon ordre, d'altres nuclis de l'hipotàlem i altres regions del cervell, encarregades de mediar una resposta que afecti el comportament alimentari i el balanç energètic global (Coll, Farooqi et al. 2007).

INTRODUCCIÓ

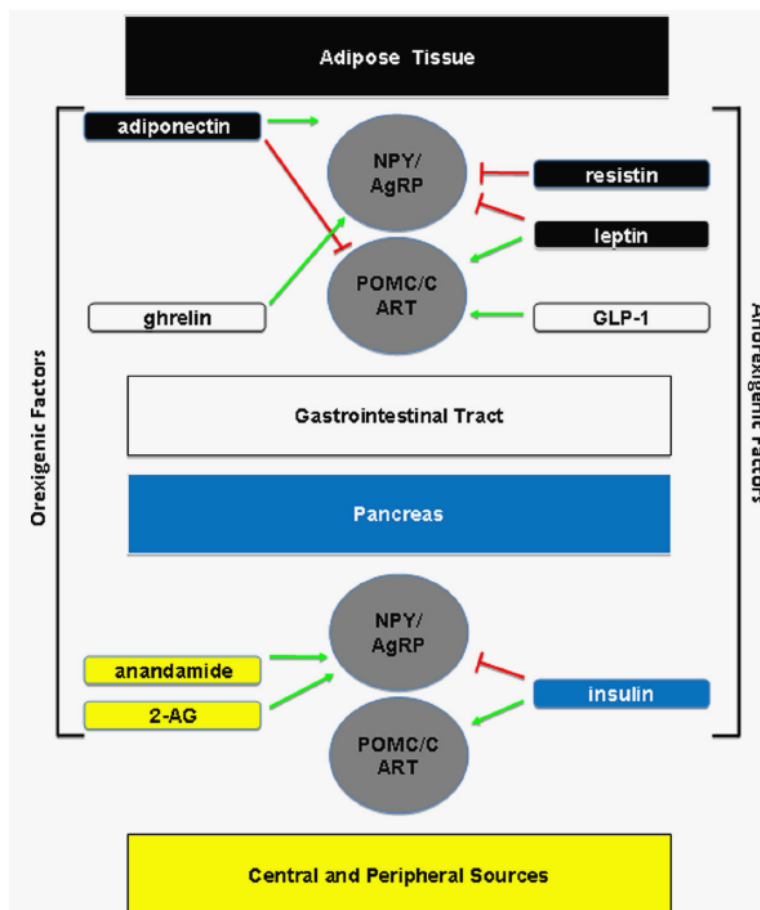


Figura 1.19. Representació esquemàtica dels factors que controlen l'activitat de les neurones hipotalàmiques NPY/AgRP i POMC/CART per tal de regular l'homeòstasi energètica. Les neurones hipotalàmiques integren varies senyals procedents del teixit adipós (en negre), el tracte gastrointestinal (en blanc), pàncrees (en blau), i altres fonts centrals i perifèriques (en groc) per tal de regular l'homeòstasi energètica. A l'esquerra de la figura es mostren les senyals amb efecte orexigènic, que augmenten la sensació de gana i/o disminueixen el gast energètic. Els factors anorexigènics, que disminueixen la gana i/o augmenten el gast energètic es troben a la dreta de la figura. Les fletxes verdes indiquen activació i les vermelles inhibició de la secreció i/o l'expressió d'aquests neuropèptids. 2-AG, 2-aracadonilglicerol. Extret de (Lopaschuk, Ussher et al. 2010).

Com s'observa a la figura 1.19, diferents senyals hormonals (leptina, insulina, adiponectina, grelina i resistina) així com nutricionals (glucosa, àcids grassos i cossos cetònics) convergeixen en el nucli arcuat, regulant l'expressió dels diferents neuropèptids.

Es coneix que la insulina i la leptina són les senyals perifèriques més importants en regular l'homeòstasi energètica i el metabolisme perifèric, ambdues amb un efecte anorèctic (Schwartz, Sipols et al. 1992; Kamohara, Burcelin et al. 1997; Plum, Belgardt et al. 2006). Altres hormones com la resistina i el GLP-1 presenten el mateix efecte.

INTRODUCCIÓ

Contràriament, l'adiponectina i la grelina, secretades principalment pel teixit adipós i l'estómac respectivament, tenen un efecte orexigènic, produint un augment de la ingesta [revisat per (Lopaschuk, Ussher et al. 2010)]. La melanocortina i les orexines són pèptids també orexigènics produïts en el mateix SNC per neurones del nucli lateral hipotalàmic que augmenten la seva expressió en dejuni i la disminueixen en resposta a leptina (Yamanaka, Beuckmann et al. 2003; Flier 2004).

En el cervell, i en concret en els nuclis hipotalàmics, co-existeixen neurones que són inhibides i altres que són excitades per la glucosa (Dunn-Meynell, Routh et al. 2002), així com pels FA (Ross, Rossetti et al. 2010; Migrenne, Le Foll et al. 2011). S'ha descrit que els nivells de glucèmia i d'insulinèmia actuen a nivell hipotalàmic produint una inhibició de la gluconeogènesi (Plum, Belgardt et al. 2006), i que una disminució en l'expressió del receptor d'insulina hipotalàmic produeix hiperfàgia i resistència hepàtica a la insulina (Obici, Feng et al. 2002). Un agonista del glucagó, per exemple, és capaç de regular els neuropèptids associats a la ingesta POMC, NPY, NT i grelina, exercint efectes anorèctics (Dalvi, Nazarians-Armavil et al. 2012).

S'ha vist que els FA també tenen un paper destacat en aquest sentit, que analitzarem en un capítol a part.

2.1. Els àcids grassos com a molècules senyalitzadores

La regulació del metabolisme hipotalàmic dels FA forma part del conjunt de canvis que es desencadenen en l'organisme en resposta a l'alimentació. El dejú estimula l'AMPK hipotalàmica i inhibeix l'activitat de l'ACC i la FAS, mentre que la re-alimentació desencadena els processos contraris (Minokoshi, Alquier et al. 2004; López, Lelliott et al. 2006; López, Lage et al. 2008), de manera que l'activitat de l'AMPK hipotalàmica és regulada per senyals perifèriques que són crucials pel manteniment del balanç energètic.

Hormones anorèctiques com la leptina, la insulina, GLP-1 i altres inhibeixen l'AMPK hipotalàmica i activen l'ACC i/o la FAS, mentre que senyals orexigèniques, com els cannabinoids, els glucocorticoids, l'adiponectina o la grelina, activen l'AMPK i inhibeixen l'ACC i la FAS (Lage, Diéguez et al. 2008). L'hormona tiroidea, per exemple, controla la termogènesi en el teixit adipós marró a través de l'acció específica sobre l'AMPK en el VMH (Lopez, Varela et al. 2010). A més a més, l'activitat d'aquests enzims és modulada per metabòlits intermediaris i nutrients com la glucosa (McCrimmon, Fan et al. 2004; Minokoshi, Alquier et al. 2004; Cha,

INTRODUCCIÓ

Wolfgang et al. 2008), l'àcid α -lipoic (Kim, Park et al. 2004), el citrat (Stoppa, Cesquini et al. 2008) i el lactat (Cha and Lane 2009).

Alhora, variacions diàries en les concentracions plasmàtiques de FA perifèrics són detectades pel SNC com una senyal, tot contribuint a la regulació del balanç energètic, de manera que un excés de FA o una disfunció metabòlica dóna lloc a una desregulació del control neuronal de l'homeòstasi energètica, contribuint a l'aparició d'obesitat i/o diabetis tipus 2 en pacients predisposats.

A nivell cel·lular, s'ha vist que neurones del nucli Arc i VMH són selectivament inhibides o activades per FA, ja siguin captats del torrent sanguini com produïts endògenament en el SNC (astròcits), tot i que no està clar encara el mecanisme molecular que això desencadena. Sembla ser que un possible efector podrien ser els canals iònics de clor o potassi, però s'ha vist que almenys la meitat de les respostes induïdes per FA en neurones hipotalàmiques són a través de la interacció amb el transportador FAT/CD36, que no requereix d'un metabolisme intracel·lular per activar una cascada de senyalització (Le Foll, Irani et al. 2009). El fet que els índexs més elevats de β -oxidació es donin en astròcits, i no en neurones, dóna suport a la hipòtesi que l'efecte mediat pels FA a nivell SNC sobre la ingesta no depengui del metabolisme pròpiament dit d'aquests FA. D'altra banda, i considerant que la β -oxidació, formació de malonil-CoA i altres acils-CoA poden ser efectivament mediadors dels efectes observats en realitzar infusions de FA *in vivo* (Dowell, Hu et al. 2005), es proposa que els canvis que es donen en el metabolisme de FA en astròcits activen una senyal que s'envia a les neurones, que emetran una resposta que afectarà la ingesta i la producció endògena de glucosa (Blázquez, Sánchez et al. 1998; Obici, Feng et al. 2002; Obici, Feng et al. 2003; Caspi, Wang et al. 2007; Escartin, Pierre et al. 2007; Migrenne, Le Foll et al. 2011). Migrenne i col·laboradors proposen els cossos cetònics sintetitzats en astròcits i captats per neurones, com la molècula que transmet aquest senyal.

De tota manera, cal considerar que no hi ha un gran augment de FA en plasma postprandialment, mentre que sí és evident l'augment que es dóna en dejuni, fet que posa en dubte que un augment en els nivells plasmàtics de FA actuï com una senyal de sacietat inhibint la ingesta (Stamp 1966; Ruge, Hodson et al. 2009).

INTRODUCCIÓ

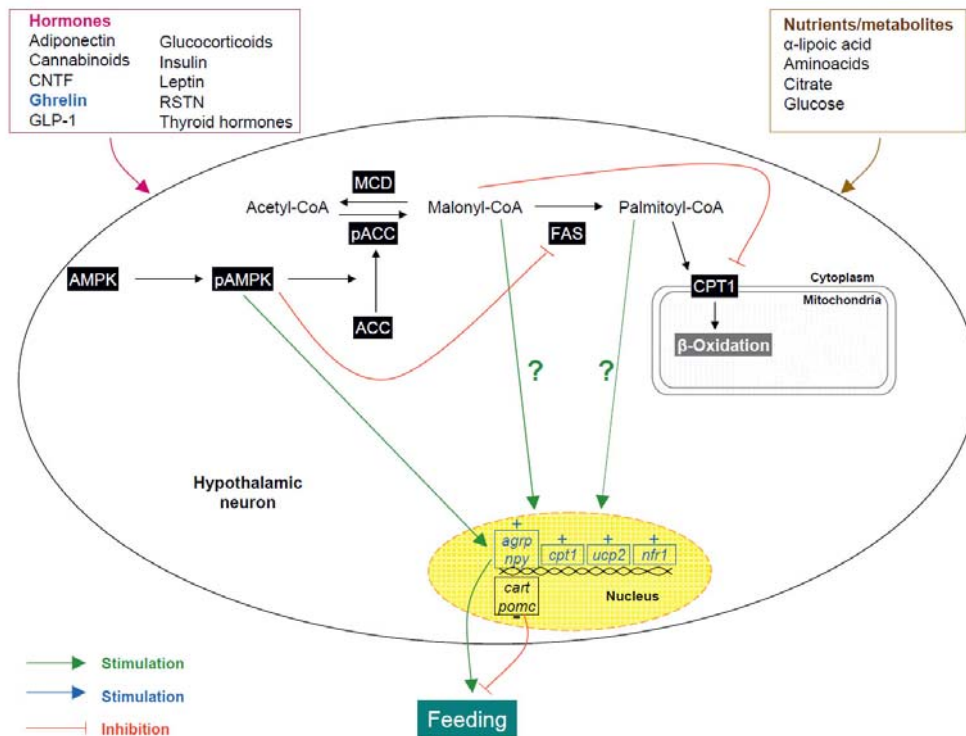


Figura I.20. El metabolisme dels FA hipotàlmics integra senyals perifèriques amb la regulació de l'expressió de neuropèptids. Diferents hormones, metabòlits i nutrients circulants actuen sobre el metabolisme dels FA modulant els nivells de palmitoil-CoA i malonil-CoA. Aquest efecte produeix canvis en els nivells d'expressió dels diferents neuropèptids, per mecanismes encara desconeguts (indicat amb "?"), que finalment regularan la ingesta. Aquests processos es donen principalment en astròcits. Extret de (Diéguez, Fruhbeck et al. 2009).

S'han publicat diverses evidències experimentals que demostren l'efecte dels FA en el cervell sobre l'homeòstasi energètica. Per exemple, l'administració i.c.v. d'oleat produeix una disminució en la ingesta així com en la producció hepàtica de glucosa (Obici, Feng et al. 2002), efectes observats també en inhibir (genètica o farmacològicament) l'activitat CPT1 hipotàlmica, induint així una disminució de la β-oxidació (Obici, Feng et al. 2003). Igualment, la infusió directa en el nucli VMH disminuí la producció endògena de glucosa (Ross, Rossetti et al. 2010). De tota manera, els efectes de l'oleat no es poden reproduir amb altres àcids grassos, com el palmitat (Schwinkendorf, Tsatsos et al. 2011), suggerint que els LCFA són una senyal específica d'abundància nutricional (Lam, Schwartz et al. 2005; Luquet and Magnan 2009).

Tot i això, encara no es coneixen exactament les regions o subpoblacions neuronals de l'hipotàlem implicades en aquests efectes [revisat per (Lam, Schwartz et al. 2005)]. Per exemple, la inhibició de l'activitat CPT1 produeix una acumulació intracel·lular de LCFA-CoA en l'Arc, però no en altres regions hipotàlmiques (Obici, Feng et al. 2003). En la mateixa línia, la inhibició de la

INTRODUCCIÓ

β -oxidació de FA en el nucli lateral hipotalàmic no modifica el comportament alimentari (Beverly and Martin 1991).

Com ja s'ha explicat, en condicions fisiològiques els nivells de β -oxidació es troben principalment controlats pels nivells hipotalàmics de malonil-CoA, un augment dels quals mimetitza els efectes metabòlics i anorèctics observats en inhibir l'activitat CPT1 (Figura I.21).

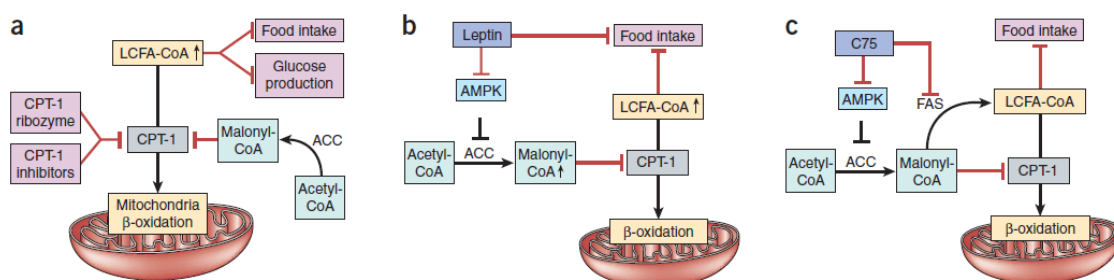


Figura I.21. Mecanismes de control de la ingesta a través de la regulació dels nivells hipotalàmics de LCFA-CoA i de malonil-CoA. a) Una disminució de l'activitat CPT1 en hipotàlem produeix un augment dels LCFA-CoA intracel·lulars que resulta en una disminució de la ingesta i de la producció hepàtica de glucosa. b) Els efectes anorèctics de la leptina són mediat a través de la inhibició de l'activitat de l'AMPK, que produeix un augment dels nivells de malonil-CoA hipotalàmic i dels LCFA-CoA. c) El compost C75 produeix una disminució de la ingesta mitjançant la combinació de dos mecanismes: inhibició de la FAS i de l'AMPK, ambdós efectes resultant en un augment dels nivells de malonil-CoA. Extret de (Lam, Schwartz et al. 2005).

2.2. Malonil-CoA hipotalàmic

En els últims anys s'ha otorgat cada cop més importància al paper del malonil-CoA hipotalàmic com a molècula senyalitzadora de l'estat energètic del metabolisme, i reguladora del comportament alimentari. La concentració de malonil-CoA intracel·lular en l'hipotàlem disminueix i augmenta en resposta al dejú i a la re-alimentació, respectivament (Hu, Cha et al. 2003; Wolfgang, Cha et al. 2007). Aquests canvis, a més, es correlacionen ràpidament amb canvis en els nivells d'expressió dels neuropèptids en el SNC, fet que dona pes a aquesta hipòtesi (Shimokawa, Kumar et al. 2002).

Ratolins injectats i.c.v. amb inhibidors de la FAS (cerulenina i C75) presenten una disminució important de la ingesta i del pes corporal respecte els animals control, que es correlaciona amb un augment dels nivells de malonil-CoA hipotalàmic (Loftus, Jaworsky et al. 2000; Proulx and Seeley 2005), i es postula és resultat de la regulació dels nivells de

INTRODUCCIÓ

neuropèptids, sovint a través de la inhibició de l'expressió de pèptids orexigènics com l'NPY (Proulx, Cota et al. 2008). De la mateixa manera, ratolins KO de FAS presenten menor ingesta i pes corporal, paral·lelament a una disminució en l'expressió dels pèptids orexigènics (NPY, AgRP) i un increment dels pèptids anorexigènics (POMC, CART) (Chakravarthy, Zhu et al. 2007).

La sobreexpressió de la MCD en el nucli VMH, que disminueix els nivells de malonil-CoA, reverteix la pèrdua de pes induïda pels inhibidors de la FAS (Hu, Dai et al. 2005), produint finalment un fenotip obès als animals (He, Lam et al. 2006).

Estudis *in vitro* i *in vivo* mostren que almenys una part dels efectes de C75 són mediatos per la regulació de l'AMPK (Ronnett, Kim et al. 2005). De fet, l'administració i.c.v. d'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside), potent activador de l'AMPK, ràpidament disminueix la concentració de malonil-CoA hipotalàmica i augmenta la ingesta (Tu, Thupari et al. 2005). En aquest sentit, la leptina exerceix un efecte anorèctic mitjançant la inhibició de la via de l'AMPK, que produeix un augment en l'activitat de l'ACC i per tant dels nivells de malonil-CoA hipotalàmic (Minokoshi, Alquier et al. 2004).

S'ha demostrat també que l'administració d'un éster de β -hidroxibutirat amb la dieta a rates Wistar incrementa els nivells de malonil-CoA en cervell amb un efecte anorèctic (Kashiwaya, Pawlosky et al. 2010).

De totes maneres, una de les grans dificultats que presenta la recerca en aquest camp és la manca d'eines experimentals que permetin la mesura de metabòlits intermediaris i lípids en general (Sheppard 2010). L'aplicació a la metabolòmica de tècniques ultrasensibles d'espectroscopia de masses permet aprofundir en les investigacions, tot i que la curta semivida d'aquestes molècules encara queda lluny de la garantia que ofereixen avui en dia l'anàlisi dels nivells de proteïna i àcids nucleics, sense oblidar que encara no és possible mesurar la majoria de metabòlits o lípids a nivell unicel·lular. De fet, aquesta és probablement la major dificultat a solventar, considerant la gran heterogeneïtat de poblacions cel·lulars que co-existeixen en el cervell.

El paper del malonil-CoA, els LCFA-CoA i altres metabòlits intermediaris és una àrea que està guanyant molt interès en la recerca d'eines pel tractament de l'obesitat i la diabetis. El descobriment de la CPT1C l'any 2002, sense aparent activitat enzimàtica, amb una expressió únicament neuronal, i sense una funció clara encara, ha obligat a plantejar-se de nou l'efecte

INTRODUCCIÓ

dels inhibidors de la CPT1 a nivell central, així com l'efecte sobre la proteïna de les variacions dels nivells de malonil-CoA hipotalàmic [revisat per (Wolfgang and Lane 2011)].

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

En aquest capítol es detallen les característiques del material biològic, així com els mètodes emprats en la realització d'aquest treball. Oligonucleòtids i construccions generades es descriuen a l'apèndix.

Totes les solucions utilitzades es van preparar amb aigua MiliQ autoclavada (30 min, 121°C, 1.2 atm). 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.

I. MATERIALS

1. Soques bacterianes

Es van utilitzar les següents soques d'*Escherichia coli* per a la propagació i selecció de plasmidis i l'expressió de proteïnes.

XL1-Blue (<i>Stratagene</i>):	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 (<i>GibcoBRL</i>):	sup E44, ΔlacU169 (θ80 lac ZΔM15), hsd R17, rec A1, gyr A96, thi-1, rel A1.
BL21 (<i>Invitrogen</i>):	F ⁻ , ompT, gal, dcm, lon, hsdS _B (r _B m _B ⁻), λ(DE3 [lacI, lacUV5-T7gene, ind1, sam7, nin5])

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 (*Sigma*, Ref.: G7757).

LB (Luria-Bertrani Broth) pH 7.4

Triptona.....	10 g/L
Extracte de llevat.....	5 g/L
NaCl.....	10 g/L

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

2. Soques de llevat

***Pichia pastoris* GS115 -genotip His4-**: Es tracta d'una soca àmpliament utilitzada per a l'expressió de proteïnes heteròlogues (Cregg, Vedvick 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 CPT1, l'ús del metanol com a inductor no és el més apropiat, ja que produeix un augment de peroxisomes, que es co-purifiquen amb els mitocondris durant la centrifugació diferencial. Per evitar-ho, en aquest treball es va utilitzar el promotor de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (P_{GAP}) per dirigir l'expressió de CPT1. Aquest promotor va ser aïllat de *Pichia pastoris* (Waterham, Digan et al. 1997).

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.

MATERIALS I MÈTODES

YPD (Yeast-Peptone-Dextrose)

Extracte de llevat.....	1%
Peptona	2%
Dextrosa.....	1%

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

Pichia Pastoris X-33 -genotip wild-type-: És la soca d'elecció per a l'expressió de plàsmids amb resistència a zeocina com a únic marcador de selecció. Requereix les mateixes condicions de cultiu i manteniment que la soca GS115.

3. Línies cel·lulars establertes

HeLa (ATCC n°: CCL-2): Càncer de cèrvix humà

HepG2 (Eucellbank n°: 0023-HLCL): Hepatoma humà

Neuro2A (ATCC n°: CCL-131): Neuroblastoma de ratolí. Cedides pel laboratori del Dr. Eduardo Soriano, del Departament de Biologia Cel·lular, de la Facultat de Biologia de la UB .

PC12 (Eucellbank n°: 0063-RACL): Feocromocitoma de rata.

SK-N-JD: Neuroblastoma humà. Cedides pel laboratori del Dr. Albert Tauler, del Departament de Bioquímica i Biologia Cel·lular de la Facultat de Farmàcia de la UB.

3.1. Les cèl·lules Neuro2A són un bon model d'estudi *in vitro* de l'expressió de *Cpt1c*

Amb l'objectiu d'establir un bon model cel·lular d'estudi d'estudi de *Cpt1c*, es determinaren els nivells d'mRNA en les línies cel·lulars establertes PC12, SK-N-JD i Neuro2A, totes elles d'origen neuronal, cultivades en estat de desdiferenciació. Per fer-ho, s'obtingué l'RNA total de les cèl·lules en cultiu i es quantificaren els nivells endògens dels gens *Cpt1c* (i *Cpt1a* a nivell comparatiu) mitjançant qRT-PCR.

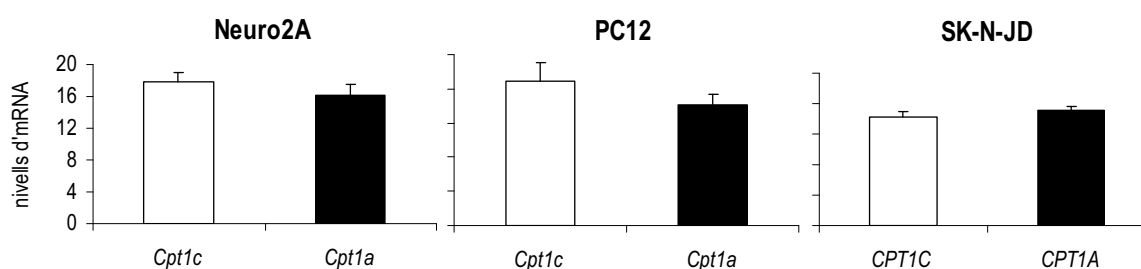


Figura M.1. Anàlisi dels nivells endògens de *Cpt1c* i *Cpt1a* en diferents línies neuronals.

S'obtingué l'RNA total de les cèl·lules en cultiu i es va retrotranscriure 1µg a cDNA, el qual (100-200ng, depenent de la línia cel·lular) es va analitzar per qRT-PCR. Es mostren els nivells d'mRNA missatger de *Cpt1c* (□), i *Cpt1a* (■), de les línies Neuro2A, PC12 i SK-N-JD, normalitzats amb els nivells del gen d'expressió constitutiva 18S (mitjana de quatre experiments ± desviació estàndard).

A la figura M.1 s'observa que es detectaren nivells similars d'expressió basal dels gens *Cpt1a* i *Cpt1c* en les tres línies estudiades, com ja s'havia demostrat en altres laboratoris (Gao, Chen et al. 2009). Per la seva facilitat de maneig i cultiu respecte les altres línies, vam escollir la línia Neuro2A com a model d'estudi del gen *Cpt1c*.

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 subclonatge

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 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 (100mg/L), IPTG (8mg/L) i X-Gal (40mg/L), les colònies transformants 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'expressió procariota

pGEX-4T (*Amersham Biosciences*): Vector utilitzat per a 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 tres possibles marcs de lectura, permetent el clonatge dels cDNAs de manera que es generi correctament la proteïna de fusió.

pET43 (+) (*Novagen*): Vector utilitzat per a la producció de proteïnes de fusió amb NusA, transportador que confereix una gran solubilitat a proteïnes expressades en *Escherichia coli*. Conté una zona de dianes de clonatge úniques, confereix resistència a ampicil·lina i el seu promotor (T7) és induïble per IPTG. Conté el *tag* (His)₆ que permet la seva purificació mitjançant una columna de níquel. Existeixen tres vectors pET43 (+): pET43a (+) (Ref.:70819), pET43b (+) (Ref.:70820) i pET43c (+) (Ref.:70821) que presenten la zona de les dianes de restricció segons els tres possibles marcs de lectura, permetent el clonatge dels cDNAs de manera que es generi correctament la proteïna de fusió (Davis, Elisee et al. 1999).

4.3. Vectors d'expressió en llevats

pHOW10 (Waterham, Digan et al. 1997): Vector utilitzat per expressar les proteïnes CPT1 en *Pichia pastoris* sota el control del promotor de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (P_{GAP}). En aquest treball es va utilitzar la soca GS115 per a la producció de proteïnes amb aquest vector. Aquest plasmidi conté l'origen de replicació i el gen de resistència a ampicil·lina del vector d'*E.coli* pBR322, que permeten l'expressió i selecció de transformants en bacteri; d'altra banda, el gen *His4*, la seqüència de terminació

MATERIALS I MÈTODES

de la transcripció del gen *Aox1* i el P_{GAP} de *P.pastoris* permeten l'expressió en llevat. Presenta una diana única de clonatge EcoRI entre la seqüència de terminació de la transcripció del gen *Aox1* i el promotor P_{GAP} i una sèrie de dianes de linealització que permetran la posterior integració del cDNA clonat en els *loci* 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.

pGAPZ (*Invitrogen*): Vector utilitzat per expressar les proteïnes CPT en *Pichia pastoris* sota el control del promotor de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (P_{GAP}). En aquest treball es va utilitzar la soca X-33 per a la producció de proteïnes amb aquest vector. Permet la producció de proteïnes de fusió amb l'epítip myc a l'extrem C-terminal del cDNA clonat, així com la seva purificació mitjançant resines d'afinitat iòniques, gràcies al tag (His)₆. Existeixen tres vectors pGAPZ: pGAPZA (Ref.:200-20-01), pGAPZB (Ref.:200-20-02) i pGAPZC (Ref.:200-20-03) 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. Aquest plasmidi conté l'origen de replicació del vector d'*E. coli* pUC, i el gen de resistència a zeocina de *Streptoalloteichus hindustanus*, funcional tant en *E. coli* com en *P. pastoris*. El vector conté a més el gen *His4*, la seqüència de terminació de la transcripció del gen *Aox1* i el P_{GAP} de *P. pastoris*, *loci* del genoma on es donarà la recombinació heteròloga del plàsmid.

4.4. Vectors d'expressió en cèl·lules de mamífer

pSG5 (Green, Issemann 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. L'expressió de proteïnes *in vivo* es dona gràcies al promotor viral del SV40. Aquest vector confereix resistència a ampicil·lina.

pCDNA3 (Umesono, Murakami et al. 1991): Vector d'expressió eucariota *in vitro* i *in vivo*. Presenta una regió de clonatge de dianes úniques on introduir-hi el DNA d'interès. 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.

4.5. 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 a 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*).

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. Els apèndixs i l'article inclòs en aquest treball mostren la seqüència de tots ells.

6. Anticossos

6.1. Anticossos primaris

Actina (*Sigma*, Ref.: A2066): Anticòs policlonal produït en conill i generat contra la regió C-terminal de la proteïna actina, component del citoesquelet cel·lular. Reconeix la proteïna en extractes humans i animals, i s'ha emprat com a control positiu.

CPT1 (#139): Anticòs policlonal produït contra l'isotip hepàtic de la CPT1 de porc. Va ser obtingut per immunització d'un conill amb la construcció pGEX-4T1/PCPT1A, que genera una proteïna de fusió GST-PCPT1A de 41kDa (residus 303-441 de la CPT1 de porc). Reconeix els isotips muscular, hepàtic i de cervell de diferents espècies (porc, humana i rata) en extractes mitocondrials de llevats transformats, però no detecta la proteïna en mitocondris aïllats de teixit hepàtic de porc (Nicot, Hegardt et al. 2001).

CPT1A (VZ): Anticòs policlonal produït en ovella contra la regió de residus Arg⁴²⁸-Lys⁴⁴¹ de la CPT1A de rata (Kolodziej, Crilly et al. 1992). Emprat durant l'estada al laboratori del Dr. Victor Zammit.

CPT1C (*GenScript*): Anticòs policlonal encarregat a la companyia *GenScript* contra els últims 15 residus de la seqüència de CPT1C humana com a immunogen (Mètodes, apartat 8.1).

CPT1C (*Sigma*, Ref.: HPA014529): Anticòs policlonal sintetitzat en conill utilitzant una proteïna de fusió corresponent als últims 92 aminoàcids de CPT1C humana com a immunogen.

CPT1C (VZ): Anticòs policlonal produït en ovella contra els últims 135 residus de la CPT1C de ratolí (Price, van der Leij et al. 2002). Emprat durant l'estada al laboratori del Dr. Victor Zammit.

Flag M2 (*Sigma*, Ref.: F3165): Anticòs monoclonal de ratolí obtingut contra el pèptid Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (pèptid FLAG[®]), utilitzat com a etiqueta en l'expressió de proteïnes de fusió en sistemes eucariotes.

GAP43 (H-100) (*Santa Cruz Biotechnology*, Ref.: sc-10786): Anticòs policlonal obtingut en conills immunitzats amb els primers 100 residus de la proteïna GAP-43 humana. Detecta la proteïna en extractes de rata, ratolí i humans.

GST (*Santa Cruz Biotechnology*, Ref.: sc-138): Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra la proteïna Glutatió-S-transferasa.

HA (Laboratori Dr. Gabriel Gil, IMIM; Barcelona): Anticòs monoclonal produït en l'hibridoma 12CA5, generat contra l'epítot HA, utilitzat en aquest treball com a etiqueta en l'expressió de proteïnes de fusió en sistemes eucariotes.

His-probe (H-15) (*Santa Cruz Biotechnology*, Ref.: sc-803): Anticòs policlonal generat en ratolí contra l'epítot de polihistidines (His)₆, utilitzat en aquest treball com a etiqueta en l'expressió de proteïnes de fusió en llevat.

MATERIALS I MÈTODES

Myc (Laboratori Dr. José Ayté, UPF; Barcelona): Anticòs monoclonal produït en l'hibridoma 9E10, generat contra l'epítot myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu), utilitzat com a etiqueta en l'expressió de proteïnes de fusió en sistemes eucariotes.

P-AKT1/2/3 (Ser 473) (*Santa Cruz Biotechnology*, Ref.: sc-7985): Anticòs policlonal generat en conill contra una curta seqüència que contenia la Ser⁴⁷³ fosforilada de l'AKT1 humana, capaç d'identificar les proteïnes AKT1, AKT2 i AKT3 fosforilades.

Tubulina (*Calbiochem*, Ref.: CP06): Anticòs monoclonal produït en ratolins que reconeix la proteïna α -tubulina de totes les espècies eucariotes, emprat com a control positiu.

6.2. Anticossos secundaris

Mouse Ig Horseradish Peroxidase linked (*Amersham Biosciences*, Ref.:NA931V): Anticòs conjugat a l'enzim peroxidasa que reconeix la fracció constant de la cadena pesada d'anticossos primaris produïts en ratolí, permetent la localització dels punts de la membrana on aquest s'ha unit. Generat en ovella.

Rabbit Ig Horseradish Peroxidase linked (*Amersham Biosciences*, Ref.:NA934V): Anticòs conjugat a l'enzim peroxidasa que reconeix la fracció constant de la cadena pesada d'anticossos primaris produïts en conill, permetent la localització dels punts de la membrana on aquest s'ha unit. Generat en ase.

Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) *2mg/mL (*Invitrogen*, Ref.: A11001): Anticòs conjugat a la proteïna verd-fluorescent Alexa Fluor 488, que reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari (ratolí), permetent la localització dels punts de la membrana on aquest s'ha unit. Alexa Fluor 488 presenta una fluorescència d'excitació i emissió màximes de 495 nm i 519 nm, respectivament.

7. Material radioactiu

L-[methyl-³H] Carnitine Hydrochloride (82Ci/mmol): Utilitzat en assaigs d'activitat CPT. Es preparà un estoc a 5mM, corresponent a una mescla de carnitina no marcada radioactivament, o freda (*Sigma*, Ref.: C0283) i L-[metil-³H] Carnitina (*Perkin Elmer*, Ref.: NET1181250UC).

Per 10mL de solució: 0.500mL de KOH 1N

0.227mL de carnitina radioactiva

0.500mL de carnitina freda 0.1M

v.s.p. 10mL amb aigua miliQ

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

8. Pèptids

Es va encarregar la síntesi de dos pèptids a *Peptide 2.0*, per a analitzar-los mitjançant espectroscopia de dicroisme circular (Mètodes, apartat 9). La seqüència dels pèptids es detalla a continuació:

MATERIALS I MÈTODES

<u>Nomenclatura</u>	<u>Seqüència</u>	<u>Puresa</u>	<u>Pes molecular teòric (g/mol)</u>
TM2A	KKNIVSGVLFGTGLWVAVIMTMRK	92.96%	2690.34
TM2C	KLLAAAVFASCLWGTLIFTLHVALK	95.68%	2728.36

TM2A es correspon al segon fragment transmembrana de la CPT1A de rata (Jenei, Borthwick et al. 2009), i TM2C a la regió homòloga de la CPT1C de rata.

Per a la síntesi dels pèptids, la companyia encarregada introduí un residu no natiu (lisina) a ambdós extrems N- i C-terminals de la seqüència per tal d'augmentar-ne la solubilitat. Els pèptids van ser purificats mitjançant HPLC i foren subministrats i conservats en forma liofilitzada, com a salts de trifluoroacetat, a -20°C fins al moment de la seva utilització.

9. Animals

Per a la realització d'experiments *in vivo* s'empraren ratolins mascle C57BL6/J adults, mantinguts en unes condicions d'estabulació estàndard (temperatura constant de 22-24°C, humitat del 75% i un cicle de llum-fosc de 12 hores). Si no s'indica el contrari, van ser alimentats amb una dieta estàndard de laboratori amb menjar i aigua *ad libitum*.

Tots els protocols emprats van ser aprovats pel comitè d'ètica en l'experimentació animal de la Universitat de Barcelona.

10. Reactius

10.1. Cultiu de cèl·lules de mamífer

A continuació es descriuen els reactius més freqüentment utilitzats per a la propagació de cultius cel·lulars:

Sèrum boví fetal (FBS)	Gibco BRL Ref.:10270-106
Sèrum de cavall (HS)	Gibco BRL Ref.:16050-122
Modified Eagle Medium (MEM)	Gibco BRL Ref.:61100-087
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL Ref.:52100-039
RPMI 1640	Gibco BRL Ref.: 51800-035
Penicil·lina- Estreptomicina 10.000 U.I./mL	Gibco BRL Ref.:15140-122
L-glutamina 200 mM	Gibco BRL Ref.:25030-024
Tripsina EDTA	Gibco BRL Ref.:15400-054

Tot el material estèril de plàstic per treballar amb cultius cel·lulars (plaques, flascons, pipetes, criotubs, etc) es va adquirir a la casa comercial *Corning*.

10.2. Cultiu de bacteris i llevats

Aquests foren els reactius sòlids més freqüentment utilitzats per al cultius de bacteris i llevats:

Agar bacteriològic	Pronadisa Ref.: 1802.00
Clorur sòdic	Panreac Ref.: 121659.1211
Dextrosa	Sigma Ref.: G7528
Extracte de llevat	Pronadisa Ref.: 1702.00

MATERIALS I MÈTODES

Extracte de llevat sense aminoàcids ni sulfat amònic	<i>Pronadisa</i> Ref.: 1553.1
Peptona	<i>Pronadisa</i> Ref.: 1616.00
Sulfat amònic	<i>Panreac</i> Ref.: 141140.1211
Triptona	<i>Pronadisa</i> Ref.: 1612.00

10.3. Marcadors de pes molecular

S'empraren principalment aquests marcadors per a l'anàlisi de molècules de DNA i proteïna mitjançant electroforesi:

Marcador DNA 100pb	<i>Biotoools</i> Ref.: 31006
Marcador DNA 1Kb	<i>Biotoools</i> Ref.: 31005
<i>Prestained SDS-PAGE Standards</i>	<i>BioRad</i> Ref.: 161-0318
<i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i>	<i>Fermentas</i> Ref.: SM0441
Marcador d'alt pes molecular (<i>HMW Native Marker</i>)	<i>GE Healthcare</i> Ref.:17044501

10.4. Altres

Forskolina (*Sigma*, Ref.: F6886): Potent activador de l'adenilat ciclase que resulta en un augment dels nivells intracel·lulars de l'AMPc. Es dissol en DMSO a 5mM (es manté aliquidat a -20°C per a la seva conservació), i s'utilitza a una concentració final de 10-100µM (Stübner and Johnson 1989; Insel and Ostrom 2003; Delghandi, Johannessen et al. 2005).

Altres reactius i kits emprats es detallen en l'apartat de mètodes.

11. Eines informàtiques

11.1. Anàlisi de seqüències de DNA

- **Basic Local Alignment tools (BLAST)**, utilitzat per a l'alineament de seqüències, tan nucleotídiques com també proteïques. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (National Center for Biotechnology Laboratory-NCBI-USA).

- **Bioedit Sequence Alignment Editor**, per a l'anàlisi i edició de cromatogrames i alineaments de DNA. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> (Ibis Biosciences, CA, USA).

- **CLC Sequence Viewer (CLC Bio)**, per a l'anàlisi i edició de seqüències i alineaments de DNA. Clustal-W software <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> (European Molecular Biology Laboratory-EMBL-Hinxton,UK).

- **TFsearch**, per a la recerca de putatius llocs d'unió a factors de transcripció. www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html (Computational Biology Research Center , AIST, Japan).

- **Webcutter**, per a la recerca de dianes de restricció. www.firstmarket.com/cutter (Carolina Biological Supply Co.).

11.2. Anàlisi de seqüències proteïques

- **PROMObindingsite**, per a la recerca de dominis estructurals. http://alqgen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3

MATERIALS I MÈTODES

- **RCSB PDB**, per a l'obtenció d'estructures tridimensionals de macromolècules biològiques.
<http://www.rcsb.org/pdb/> (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)
- **TMHMM Server**, per a la predicció de regions transmembrana.
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> (Center for Biological Sequence Analysis, University of Denmark).
- **Uniprot**, per a la predicció de dominis en comparació amb altres proteïnes de la família.
<http://www.uniprot.org>

11.3. Altres

- **Entrez-Pubmed**, per a la recerca bibliogràfica així com accés a bases de dades de seqüències anotades de DNA, RNA i proteïna. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (National Center for Biotechnology Laboratory-NCBI-USA).
- **NIH ImageJ Biophotonics**, per a la quantificació de bandes de *Western blot* i el tractament de les fotografies del microscopi confocal. <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>
- **Kodak MI**. Molecular Imaging software (Eastman Kodak Company).
- **Spectra Manager**, per a l'anàlisi dels espectres obtinguts per diroisme circular.
- **SPSS v11.5**, per a l'anàlisi estadístic (SPSS Inc., Chicago, USA).

II. 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 suplementat amb l'antibiòtic al qual confereix resistència el vector utilitzat, que en aquest treball han estat:

<u>Antibiòtic</u>	<u>Concentració de treball</u>	<u>Referència</u>
Ampicil·lina	100mg/L	Roche, Ref.: 10 835 242 001
Carbenicil·lina	50mg/L	Sigma, Ref.: C1389
Zeocina	25mg/L	Invitrogen, Ref.: R250-01

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 del DNA plasmídic

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

MATERIALS I MÈTODES

1.3.2. Extracció amb fenol-cloroform

L'extracció amb fenol-cloroform s'utilitza per eliminar proteïnes de solucions de DNA. El fenol (*Merck*, Ref.: 1002060250) és un solvent orgànic que desnaturalitza les proteïnes i la seva eficiència d'extracció és major si s'utilitza amb cloroform (*Scharlau*, Ref.: CL0203).

Per a la preparació del fenol es van resuspendre 250g de producte amb 62.5mL d'aigua estèril i 30mL de TrisBase 1M. Es calentà la suspensió a 80°C fins a la resuspensió total, moment en què s'afegiren 0.3g de 8-hidroxiquinoleïna (*Merck*, Ref.: 8.20261). Es mesclà bé i es deixà reposar per afavorir la separació de fases. Es prepararen alíquotes per a la seva conservació a llarg termini, i es mantingué congelat a -20°C. Per a la conservació a curt termini, es mantingué a 4°C i protegit de la llum.

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 considerant que 1 unitat de densitat òptica a 260nm (OD_{260}) correspon a 50µg/mL de DNA de cadena doble (DNAdS). 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 (*Scharlab*, Ref.: 425-001940) i es va utilitzar un espectrofotòmetre *Ultrospec 3000* (*Pharmacia Biotech*).

Per a 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

S'utilitza l'electroforesi en gel d'agarosa (*Sigma*, Ref.: A5093) per a 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 (0.5-2%), 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, considerant 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 (*Biotoools*, Ref.:31006) amb un rang de 1000-100bp i el marcador DNA 1Kb (*Biotoools*, Ref.:31005) amb rang de 10000-250bp.

Els gels d'agarosa també es van utilitzar per a 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, el bromur d'etidi (*Sigma*, Ref.: E4134), que s'intercala entre les dues cadenes de l'àcid nucleic i revela la presència de DNA o RNA en 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 (0.5µg/mL) a la solució temperada.

MATERIALS I MÈTODES

Tampó d'electroforesi (TAE1X)

Tris-acetat pH 8.3.....	40mM
EDTA.....	1mM
Bromur d'etidi.....	0.5µg/mL

Tampó de càrrega de les mostres 5x

Ficoll 400 (<i>Sigma</i> , Ref.: F2637).....	30%
EDTA.....	40mM
SDS (<i>Panreac</i> , Ref.: 142363.1209).....	0.1%
Blau de bromofenol (<i>Panreac</i> , Ref.: 171165).....	0.2%

1.4.2. Purificació de fragments de DNA de gels d'agarosa

Existeixen *kits* comercials que permeten l'extracció i purificació de fragments de DNA resultats 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 and 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 del 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 protocolar, 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

Per a la desfosforilació del DNA s'utilitzà la 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. Presenta una elevada activitat específica i s'inactiva 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 nombre de colònies no recombinants en clonats no dirigits. La reacció de desfosforilació es va realitzar en les següents condicions, utilitzant el tampó indicat per la casa comercial.

MATERIALS I MÈTODES

Reacció de desfosforilació

DNA lineal.....	100-200ng/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. Generació d'extrems roms

La tècnica d'ompliment (*fill-in*) permet completar els extrems 5' protuberants de seqüències de DNA. El fragment klenow de la DNA polimerasa (*Promega*, Ref.: M220A) 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) (*Attend Bio*, Ref.: GC-013-001).

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)

DNAs.....	0.1-4μg
dNTPs.....	25μM cadascun
Klenow.....	1U.I.
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.

2.4. Lligació de DNA

La DNA lligasa del bacteriòfag T4 (*Promega*, Ref.: M1801) catalitza la formació d'enllaços fosfodièster entre un fragment de DNAs, amb un fosfat 5' terminal i un fragment de DNAs, 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 depenent d'ATP i es va utilitzar en la construcció de molècules de DNA híbrides.

Reacció de lligació (Vf=20μL)

Vector.....	50ng
Insert.....	x 3-5 molèc./molèc. vector
T4 DNA lligasa.....	1μL (1-3U.I./μL)
Tampó 1x (Tris-HCl pH7.5 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 nombre de molècules. La reacció de lligació es va incubar durant un mínim d'1 hora a temperatura ambient.

3. Construcció de molècules de DNA recombinant

3.1. Subclonatge de fragments 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 tal d'evitar la seva recircularització durant la reacció de lligació. Vector i insert van ser purificats del gel d'agarosa (Mètodes, apartat 1.4), abans de ser lligats mitjançant la T4DNA lligasa (Mètodes, apartat 2.4).

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

En cada cas es va buscar la metodologia òptima per a 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*: mètode del CaCl₂

El mètode del clorur càlcic es basa en la permeabilització de les membranes cel·lulars bacterianes amb ions calci (Mandel and Higa 1970). Es tracta d'una tècnica que ofereix altes eficiències de transformació (10⁶-10⁷ transformants/μg de DNA).

A partir d'un cultiu de cèl·lules *E.coli* en fase exponencial de creixement (OD₆₀₀=1.4), se separen les cèl·lules del medi per centrifugació i es renten dues vegades en una solució de CaCl₂ 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 -80°C durant llargs períodes de temps.

Solució de CaCl₂*

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

*Solució estèril: Ajustar el pH i filtrar

L'entrada dels productes de lligació o bé els plasmidis ja circulars a les cèl·lules competents 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.

MATERIALS I MÈTODES

En alguns casos es van utilitzar cèl·lules competents DH5 α comercials (*Invitrogen* Ref.:18265-017).

3.3. Selecció de plasmidis recombinants

La selecció genètica dels bacteris recombinants es va realitzar mitjançant el creixement de les cèl·lules sotmeses a la transformació en medi sòlid de selecció, generalment LB/ampicil·lina. Quan el vector permetia la selecció per color, s'utilitzaven plaques suplementades amb IPTG 8mg/L (isopropil- α -D-tiogalactosidasa; *AppliChem*, Ref.: A1008) i X-Gal 40mg/L (*AppliChem*, Ref.: A1007), i l'antibiòtic corresponent.

Posteriorment, s'identificaven els transformants per PCRpreps (Mètodes, apartat 4.2) i després de preparacions a petita escala de DNA, es va comprovar el patró de digestió. Finalment, s'analitzà el DNA per seqüenciació.

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 $2n$, essent n el número de cicles.

Saiki i col·laboradors van descriure la utilització en aquesta tècnica d'una DNA polimerasa termostable purificada del bacteri termofílic *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA Polimerasa) (Saiki, Gelfand et al. 1988). 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 4.1). 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.

MATERIALS I MÈTODES

- En cas que es generin 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 *BiothermTM 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 en què apareixen.

Reacció de PCR

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

Condicions d'amplificació

Desnaturalització inicial (<i>hot start</i>).....	94°C.....	5min
Desnaturalització.....	94°C.....	45seg
Hibridació.....	55°C-68°C.....	45seg
Extensió.....	72°C.....	1min/Kbp
Amplificació.....	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 *Taq* DNA polimerasa d'alta fidelitat (Roche Ref.: 11732641001), que genera productes amb una adenina 3'-protuberant en gran probabilitat. Aquests productes, fosforilats, poden ser lligats directament en el vector pGEM®-T, o bé poden ser digerits, si els encebadors inclouen dianes de restricció, i lligats a vectors dirigits amb els mateixos enzims de restricció. Les condicions d'amplificació i reacció d'aquests PCR es van fer segons indicacions de la casa comercial.

4.2. PCRpreps

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 (Mc Pherson, Quirke et al. 1991).

La mescla de reacció es va preparar segons el protocol descrit a l'apartat anterior en un volum final de 20µL. En aquest cas, el DNA motlle s'aporta en picar una colònia aïllada crescuda a la placa de

MATERIALS I MÈTODES

LB/antibiòtic resultat de la transformació. Durant el cicle de desnaturalització inicial (94°C, 10min) es trenquen les parets bacterianes, deixant accessible el material genètic que, alhora, és desnaturalitzat.

4.3. Mutagènesi dirigida de DNA mitjançant la tècnica de la PCR

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

El mètode utilitzat per *QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Ref.: 200518) 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 col·laboradors, 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 (Fisher and Pei 1997).

La síntesi de DNA és duta a terme per una DNA polimerasa d'alta fidelitat, *PfuTurbo® polymerase*, que estén els oligonucleòtids cap a ambdues cadenes del DNA motlle fins a copiar tot el plasmidi. El mètode de selecció entre el DNA mutat respecte el parental es basa en el fet que, a diferència del DNA sintetitzat *in vitro*, el DNA sintetitzat per *E.coli* es troba metilat. La digestió amb l'enzim DpnI, que únicament reconeix el DNA metilat, elimina el DNA motlle de la reacció, mentre que 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 del DNA

Per a l'anàlisi de la seqüència del DNA, es van enviar 10µL del DNA a seqüenciar (100ng/µL) i 10µL d'encebador (10µM) a *Macrogen*.

6. Obtenció i anàlisi de l'RNA

Donat que l'RNA és una molècula molt sensible a l'acció de les RNAses, és imprescindible treballar sempre amb guants i material estèril per tal d'evitar-ne la degradació, així com amb aigua lliure d'RNAses en les solucions d'ús (*Sigma*, Ref.: W4502). El material sòlid per treballar amb RNA fou prèviament autoclavat per garantir la seva esterilització.

6.1. Obtenció de l'RNA total

Per a l'obtenció d'RNA es va emprar el reactiu comercial Trizol® (*Life Technologies*, Ref.:15596-026), basat en el mètode descrit per Chomczynski i col·laboradors (Chomczynski and Sacchi 1987). Es

MATERIALS I MÈTODES

tracta d'una solució monofàsica de fenol i isocianat de guanidina que manté la integritat de l'RNA alhora que lisa les cèl·lules i dissol tots els seus components.

Per a l'obtenció d'RNA a partir de cultiu cel·lular, es va utilitzar 1mL de reactiu de Trizol® per placa de 100mm, o bé, 0.5mL per placa de 60mm, produint-se així el seu lisat. En el cas d'obtenció d'RNA a partir de teixit, es va escindir un fragment d'aquest (inferior al 10% del volum de Trizol®) en un morter amb N₂ líquid i es va sotmetre a descongelaçió en 1mL de Trizol®. El teixit va ser homogeneïtzat amb *polytron RPT-MR 2100 (Kinematica AG)*, generalment aplicant 2x20 *strokes*. En ambdós casos, després de l'homogeneïtzació es va afegir cloroform, provocant així la separació en dues fases de la mostra i permetent la separació de l'RNA (fase aquosa) de les proteïnes i DNA. Seguidament, l'RNA va ser precipitat i resuspès en un volum adequat d'aigua comercial lliure d'RNAses (*Sigma*, Ref.: W4502).

6.2. Quantificació de l'RNA total

La concentració d'RNA es determina per espectrofotometria, mesurant l'absorbància de la mostra a 260nm i 280nm i considerant que 1 unitat de densitat òptica a 260nm (OD₂₆₀) equival a 40µg/mL d'RNA. La relació entre les dues absorbàncies indica la puresa de la mostra i es consideren acceptables valors superiors a 1.8.

La lectura espectrofotomètrica es va realitzar afegint 2-4µL de mostra en un *NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Inc)*.

6.3. RT-PCR

Aquesta tècnica permet la síntesi de la primera cadena de cDNA a partir d'un RNA motlle, seguida d'una amplificació específica del transcrit que es vol analitzar per PCR.

La primera cadena de cDNA va ser sintetitzada mitjançant una DNA polimerasa depenent d'RNA (transcriptasa inversa M-MLV, *Invitrogen*, Ref: 28025-013) que requereix un oligonucleòtid encebador. Per tal d'obtenir un cDNA representatiu de tot l'RNA present a les cèl·lules, s'empraren oligonucleòtids degenerats, o *Random primers*, p(dN)₆ (*Roche Diagnostics*, Ref: 11 034 731 001).

Reacció de retro-transcripció (Vf= 20µL)

RNA total.....	1-2µg
<i>Random primers</i>	0.25µg
dNTPs 10mM cadascun.....	1µL
Aigua q.s.p.....	13µL

Desnaturalització.....65°C, 5min

<i>First strand buffer 5x*</i>	4µL
DTT 0.1M.....	2µL
M-MLV.....	1µL (200U.I.)

* Tampó subministrat per la casa comercial, cinc vegades concentrat

Incubació.....37°C, 50min

.....70°C, 15min

Els cDNAs obtinguts s'utilitzen com a motlle per a la síntesi de les successives còpies de cDNA mitjançant una reacció estàndard de PCR, o bé, per PCR en temps real (Mètodes, apartat 6.4).

MATERIALS I MÈTODES

6.4. PCR quantitativa en temps real (qRT-PCR)

Aquesta tècnica permet la quantificació de l'expressió d'un gen en termes d'mRNA de manera més ràpida i sensible que el *Northern Blot*. L'RNA total retrotranscrit és amplificat per PCR. Durant l'amplificació es fa un seguiment de la reacció a temps real, ja que en la mescla de reacció s'incorporen reactius que emeten fluorescència o bé a l'unir-se a la seqüència amplificada (*TaqMan probes*®), o bé quan s'intercalen en el DNA de doble cadena (*Sybr Green*®).

En el present treball s'ha utilitzat el mètode de *TaqMan*® *Gen Expression Assays* (*Applied Biosystems*). Aquesta tècnica es basa en la utilització de tres oligonucleòtids en la reacció de PCR, dos dels quals (*forward* i *reverse*) permeten l'amplificació del producte al qual s'hibridarà el tercer oligonucleòtid, la sonda fluorogènica *TaqMan*®. Aquesta sonda conté un marcador fluorescent a l'extrem 5' i un *quencher* al 3'. Mentre la sonda està intacta la proximitat del *quencher* redueix la fluorescència del reporter. Quan s'amplifica el gen diana, mitjançant l'activitat exonucleasa 5'-3' de la *Taq* Polimerasa, es degrada l'extrem 3' de la sonda fluorescent (que conté el *quencher*), permetent així l'emissió de fluorescència a temps real. D'aquesta manera, la quantitat de fluorescència produïda és directament proporcional a la concentració de la seqüència diana.

Les reaccions es dugueren a terme en un *ABI PRISM*® *7700 Sequence detection system* (*Applied Biosystems*) en plaques de 96 pouets.

Reacció de PCR

<i>PCR supermix-UDG with Rox</i> *	12.5µL
<i>TaqMan</i> ® <i>Gene expression assay</i>	1.25µL
Sonda 18S eucariota	1.25µL
cDNA	100-500ng
Aigua (<i>RNAse free</i>) q.s.p.	25µL

**Platinum*® *Quantitative* (*Invitrogen*, Ref:11743-100)

Condicions d'amplificació

Hibridació	50°C	2min
Desnaturalització inicial	95°C	10min
Desnaturalització	95°C	15seg
Extensió	60°C	1min
Amplificació		40 cicles

A continuació es relacionen les sondes *TaqMan*® utilitzades en aquest treball:

<u>Espècie</u>	<u>Gen</u>	<u>Sonda (Referència)</u>
<i>Homo sapiens</i>	<i>CPT1A</i>	Hs00157079_m1
	<i>CPT1C</i>	Hs00380581_m1
<i>Mus musculus</i>	<i>Cpt1a</i>	Mm00550438_m1
	<i>Cpt1c</i>	Mm01202528_m1
	<i>Pepck1</i>	Mm01247058_m1
	<i>Hmgcs2</i>	Mm00550050_m1
<i>Rattus Norvegicus</i>	<i>Cpt1a</i>	Rn00580702_m1
	<i>Cpt1c</i>	Rn01475557_m1
Eucariotes	18S	Ref: 4319413E

7. Obtenció i anàlisi de proteïnes

7.1. Obtenció d'extracte cru de proteïnes a partir de cèl·lules en cultiu

Per a l'obtenció d'extracte cru de proteïnes, les cèl·lules es van recollir en PBS1X i es centrifugà 10min a 3000rpm. Seguidament es va resuspendre el *pellet* cel·lular en PBS1X suplementat amb 0.1mM PMSF (*Sigma*, Ref.: P7626) i altres inhibidors de proteases (*Sigma*, Ref.: P8340) i es va sotmetre a 3 cicles de congelació descongelació (N₂ líquid → 37°C) per tal de trencar les membranes cel·lulars. Un cop lisades les cèl·lules, es centrifugà 5min a 12.000g a 4°C, separant-se així l'extracte proteic (sobrenedant).

Alternativament, es dugué a terme la lisi cel·lular en presència del tampó NP40 (1mL per placa de 100mm, 1-2x10⁷ cèl·lules) suplementat igualment amb inhibidors de proteases, mitjançant la seva incubació en plataforma oscil·lant a 4°C durant 15-20min. Els lisats cel·lulars es centrifugaren 15min a 1.500rpm a 4°C i es recuperà el sobrenedant.

Els extractes proteics es congelaren a -80°C fins al seu posterior anàlisi.

Tampó NP40

Tris-HCl pH 8.....	50mM
NP40*	1%
NaCl.....	150mM

*(*Calbiochem*, Ref.: 492016)

Aquest tampó es suplementa extemporàniament amb 0.1mM PMSF (*Sigma*, Ref: P7626) i altres inhibidors de proteases (*Sigma*, Ref. P8340).

7.2. Obtenció d'extracte cru de proteïnes a partir de teixit

En aquesta tesi doctoral s'han obtingut extractes proteics de fetge i cervell total de ratolins C75BL6/J, així com de mostres humanes d'hipotàlem i hipocamp, cedides per l'Institut de Neuropatologia, del Centre de Neurociències de l'Hospital de Bellvitge (Contacte: Prof. Isidre Ferrer).

En cas de processar les mostres fresques, es rentaren amb PBS1X fred i, amb ajuda d'unes estisores, es disgregaren en fragments petits tot mantenint-les en la solució freda. Quan no van ser processats immediatament, es procedí a la congelació en nitrogen líquid dels teixits obtinguts, mantenint-los a -80°C fins a la seva utilització. Per a la disgregació de les mostres congelades, es van mantenir els teixits en neu carbònica i es van escindir trossos del teixit amb l'ajuda d'un morter que s'anava omplint de nitrogen líquid per mantenir-lo fred i evitar la descongelació de les mostres per fricció.

Es van transferir els fragments a tubs de vidre (*Pyrex*) i s'afegiren 4-5 volums de tampó A. Es van homogeneïtzar amb *polytron RPT-MR 2100 (Kinematica AG)*, generalment aplicant 2x20 *strokes*. Els lisats cel·lulars es centrifugaren 10min a 16.000g a 4°C i es recuperà el sobrenedant. Els extractes proteics es congelaren a -80°C fins al seu posterior anàlisi.

Tampó A:

NaCl.....	300mM
NaH ₂ PO ₄	50mM
β-Mercaptoethanol.....	5mM

Aquest tampó es suplementa extemporàniament amb 0.1mM PMSF (*Sigma*, Ref: P7626) i altres inhibidors de proteases (*Sigma*, Ref. P8340).

MATERIALS I MÈTODES

7.3. Transcripció i traducció *In vitro*

Els protocols de transcripció i traducció *in vitro* permeten obtenir proteïna directament de plasmidis que contenen els cDNAs de les proteïnes a sintetitzar. En aquest treball 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 visualitzades per fluorografia, sense la necessitat d'utilitzar anticossos (Mètodes, apartat 7.9).

Reacció de TnT (Reacció completa Vf=50µL)

DNA plasmídic.....	1µg
Extracte de reticulòcits.....	40µL
Metionina.....	1µL
Aigua <i>RNAse free</i> q.s.p.....	50µL

7.4. Quantificació de proteïnes: Mètode de Bradford

El mètode de quantificació de proteïnes introduït per Bradford es basa en el canvi que es produeix en l'espectre d'absorció del colorant *Comassie*, com a conseqüència de la seva adsorció sobre molècules proteïques (Bradford 1976). La unió a proteïnes estableix la forma blava del colorant *Comassie*, de manera que la quantitat del complex format és una mesura de la concentració de proteïna quan es llegeix l'absorbància a una longitud d'ona de 595nm. Aquest mètode mostra una gran sensibilitat i amplis marges de linealitat.

En aquest treball 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 (*Sigma*, Ref.: A7906).

7.5. Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliàcrilamida (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gels de poliàcrilamida-SDS és una tècnica de separació de proteïnes segons el seu pes molecular (Laemmli 1970). Aquesta separació es realitza en una matriu de poliàcrilamida, en condicions que assegurin la dissociació de les proteïnes en subunitats polipeptídiques individuals. La desnaturalització de les proteïnes es duu a terme en presència de β-mercaptoetanol (*Merck*, Ref.: 8.05740), agent reductor de ponts disulfur, i d' SDS (*Panreac*, Ref.: 142363.1209), 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

MATERIALS I MÈTODES

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 10min.

Gel apilador

Acrilamida (<i>Bio-Rad</i> , Ref.: 161-0156).....	5%
Tris-HCl pH 6.8.....	0.12M
SDS.....	0.1%
Persulfat amònic 10% (<i>Sigma</i> , Ref.: A3678).....	0.1%

Gel separador

Acrilamida.....	5-15%
Tris-HCl pH8.8.....	0.37M
SDS.....	0.1%
Persulfat amònic 10%.....	0.1%

L'agent polimeritzant TEMED (*Sigma*, Ref.: T9281) es va incloure en quantitats que variaven en funció de la concentració d'acrilamida des del 0.08 al 0.04%.

Tampó de càrrega per proteïnes 2X (Laemmli Buffer)

Tris-HCl pH6.8.....	50mM
SDS.....	2%
Glicerol.....	10%
Blau de bromofenol.....	0.012%
β -mercaptoetanol.....	5%

Tampó d'electroforesi

Tris-HCl pH8.8.....	25mM
Glicina (<i>Panreac</i> , Ref.: 141340.1211).....	0.19M
SDS.....	0.1%

Com a patró de pes molecular de proteïnes es va utilitzar el marcador *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (*Fermentas* Ref.: SM0441).

7.6. Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliacrilamida (BN-PAGE)

L'electroforesi en gels no denaturants de poliacrilamida permet aïllar complexos proteics de membranes biològiques i extractes totals cel·lulars i tissulars. També és freqüentment utilitzat per a la determinació del pes molecular de proteïnes en estat natiu, l'estat d'agregació de complexos proteics de membrana, així com per a la identificació d'interaccions proteïna-proteïna. La tècnica BN-PAGE utilitza *Comassie Blue* (G-250) en lloc del detergent SDS en el tampó catòdic, que otorga càrrega negativa a la mostra sense desnaturalitzar les proteïnes. Depenent del grau d'estabilitat de les interaccions intramoleculares de la mostra, les proteïnes migraran en forma d'oligòmers o bé es dissociaran a monòmers, tot permetent l'anàlisi dels diferents graus d'associació del complex proteic (Wittig, Braun et al. 2006; Wittig and Schägger 2008).

En aquest treball s'ha utilitzat aquesta tècnica per a l'anàlisi de complexos oligomèrics de CPT1A i CPT1C en extractes proteics totals de fetge i cervell de ratolí, així com d'extractes mitocondrials de

MATERIALS I MÈTODES

cèl·lules transformants del llevat *P. pastoris*. Per a la preparació de la matriu d'acrilamida (*ProtoGel 30%*, *Natural Diagnostics*, Ref.: EC-890) es segueixen les especificacions del fabricant, o bé s'empraren gels pre-fabricats (*NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System 4-16%*, *Invitrogen*, Ref.: BN1002BOX).

La principal precaució duta a terme per a la preparació de les mostres fou la rapidesa i la temperatura, sempre entre 0-4°C, per tal de garantir l'estabilitat dels complexos proteics. Es posaren a punt les condicions de solubilització (detergent, temps d'incubació, etc) per cada mostra. Breument, es centrifugaren 100µg d'extractes mitocondrials (12min, 12.000g a 4°C) i es resuspendueren en Tampó de Solubilització i el detergent adequat fins a un volum final de 100µL. En els casos en què l'electroforesi es realitzà en gels pre-fabricats, s'emprà el *Native Sample Buffer (Invitrogen, Ref.: BN2003)*. Després de 15min d'incubació en gel, es centrifugaren els extractes (30min, 50.000g a 4°C), restant en el sobrenedant la proteïna solubilitzada. S'afegí 1µL de tampó de càrrega (*Native Loading Buffer, Invitrogen, Ref.: BN20041*) per cada 10µL d'extracte solubilitzat, de manera que la concentració de detergent sigui com a màxim 4 vegades la del colorant *Comassie*. Es carregaren les mostres en el gel d'acrilamida, a la càmera de 4°C, tot seguint les instruccions del fabricant per a la durada, intensitat i tampons emprats en l'electroforesi (Schägger 2001). S'emprà un marcador de proteïnes d'alt pes molecular (*GE Healthcare, Ref.: 17044501*).

Tampó de Solubilització

Àcid aminocaproic.....	0.75M
Bis-Tris HCl pH7.....	50mM
Glicerol.....	10%

7.7. Anàlisi de proteïnes per tinció de *Comassie Brilliant Blue*

Després de l'electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS, les proteïnes poden ser visualitzades per tinció amb blau de *Comassie (Comassie® Brilliant Blue R-250, Bio-Rad, Ref.: 161-0400)*. El procés inclou la tinció del gel durant mínim 3 hores a temperatura ambient en solució de tinció i la posterior submersió en solució de destinció.

Solució de tinció

Blau de <i>Comassie</i>	0.25%
Metanol.....	45%
Àcid acètic glacial.....	10%

Solució de destinció

Metanol.....	45%
Àcid acètic glacial.....	10%

7.8. 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, 0.45µm, 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

MATERIALS I MÈTODES

encarada a l'ànode. La transferència es va realitzar en un *Mini Trans blot* (Bio-Rad) durant un temps mínim de 2h, a 4°C i 120mA.

Tampó de transferència

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

Per a la immunodetecció de les proteïnes s'emprà el *kit, EZ-ECL™ Western blotting detection reagent* (Reactiva, Ref.: 20-500-120). Excepte en aquells casos on s'empraren anticossos comercials i amb protocols específics, es seguí el protocol recomanat per la casa comercial. En general, un cop realitzada la transferència es va saturar la membrana amb PBS-T1 (PBS-1% Tween20 Scharlau, Ref.: TW00201000) amb un 5% de llet en pols desnatada. Seguidament, aquesta membrana va ser incubada amb l'anticòs primari i amb el secundari mantenint aquestes incubacions un temps mínim d'1 hora a temperatura ambient cada una, o bé tota la nit a 4°C. Entre les dues incubacions i abans de la detecció es feren varis rentats amb PBS-T1.

A continuació es mostra una relació dels anticossos utilitzats en el present treball, així com la seva dilució de treball i el *blotto* utilitzat (PBS-T1: 1% de Tween, PBS-T0.1: 0.1% de Tween). A l'apartat 6 del capítol Materials d'aquesta tesi doctoral es pot trobar informació detallada de cada anticòs (origen, referència, etc).

<u>Ac primari</u>	<u>Dilució</u>	<u>Blotto</u>	<u>Ac secundari</u>	<u>Dilució</u>	<u>Blotto</u>
Actina	1:2.000	PBS-T1 5% llet	conill	1:10.000	PBS-T1 5% llet
CPT1 (#139)	1:1.000	PBS-T1 5% llet	conill	1:10.000	PBS-T1 5% llet
CPT1A (VZ)	1:5.000	TBS-T1	ovella	1:20.000	TBS-T1
CPT1C (Sigma)	1:1.000	PBS-T1 5% llet	conill	1:10.000	PBS-T1 5% llet
CPT1C (GenScript)	1:250	PBS-T1 5% llet	conill	1:5.000	PBS-T1 5% llet
CPT1C (VZ)	1:5.000	TBS-T1	ovella	1:20.000	TBS-T1
Flag M2	1:5.000	PBS-T1 5% llet	ratolí	1:2.000	PBS-T0.1 5% llet
GAP43	1:500	PBS-T1 5% llet	conill	1:10.000	PBS-T1 5% llet
GST	1:2.000	PBS-T1 5% llet	ratolí	1:2.000	PBS-T1 5% llet
HA	1:250	PBS-T0.1 5% llet	ratolí	1:2.000	PBS-T0.1 5% llet
Myc	1:200	PBS-T1 5% llet	ratolí	1:2.000	PBS-T1 5% llet
P-AKT1/2/3	1:500	PBS-T1 5% llet	conill	1:10.000	PBS-T1 5% llet
Tubulina	1:5.000	PBS-T1 5% llet	ratolí	1:2.000	PBS-T1 5% llet

Durant el procés d'immunodetecció, l'anticòs primari reconeix els punts antigènics presents a la membrana mentre que el secundari reconeix la cadena pesada del primari. Aquest segon anticòs va conjugat a una peroxidasa de rave que oxida el luminol, passant-lo d'un estat relaxat a un estat excitat, i emetent així un tipus de llum que pot ser detectada per autoradiografia.

7.9. Anàlisi de proteïnes per fluorografia

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

Després de l'electroforesi en poliacrilamida (Mètodes, apartat 7.5) 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 (Scharlab, Ref.: PP0001) 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

MATERIALS I MÈTODES

en sotmetre'l al procés d'assecatment (80°C, 120min en un assecador per buit de BioRad). Un cop sec, el gel es va exposar a una pel·lícula autoradiogràfica.

7.10. Anàlisi de proteïnes per immunofluorescència indirecta en cultius cel·lulars

Les tècniques d'immunofluorescència indirecta permeten la detecció de proteïnes mitjançant l'ús d'anticossos primaris, que reconeixen les proteïnes d'interès, i anticossos secundaris conjugats a una molècula fluorescent o fluorocrom, que reconeixen l'anticòs primari. Aquesta tècnica permet determinar la localització subcel·lular de l'antigen, així com també l'estudi de la col·localització entre dues proteïnes i/o un marcador cel·lular. Amb aquesta tècnica s'aconsegueix una amplificació de la senyal molt major que amb les tècniques d'immunofluorescència directa, en les quals l'anticòs primari està conjugat a un fluorocrom.

En la present tesi doctoral s'utilitzaren cèl·lules HeLa pels experiments d'immunofluorescència. Es van plaquejar 2×10^5 cèl·lules sobre cobreobjectes de vidre de 12mm de diàmetre en plaques de 60mm i, passades 24h, es transfectaren amb els plàsmids *Human CPT1C(myc)-pCDNA3* i *pCDNA3* com a control. Passades 48h de la transfecció, es va procedir a la immunodetecció de CPT1C sobreexpressada mitjançant anticossos específics. La densitat de les cèl·lules a l'inici del protocol no podia superar el 70% de confluència, per permetre una adequada visualització al microscopi.

7.10.1. Tinció de membrana mitocondrial

En la present tesi doctoral s'emprà el marcador de membrana mitocondrial Mitotracker® RedCMX Ros (*Invitrogen*, Ref.: M7512), que travessa la membrana plasmàtica per difusió passiva i s'acumula en els mitocondris actius. Per això és important realitzar la incubació amb aquest marcador quan les cèl·lules encara són vives, prèviament a la fixació cel·lular. Cal posar a punt la tinció de membrana per cada tipus cel·lular, ja que diferents temperatures i temps d'incubació poden donar resultats de tinció molt diferents.

Aquest marcador, a més a més, permet la posterior fixació aldèhica i permeabilització de les cèl·lules sense perdre senyal, processos que altres marcadors de membrana no resisteixen. Donat que es tracta d'una molècula fluorescent, cal protegir les mostres tota l'estona de la llum. Es va preparar una solució d'stock de Mitotracker dissolt en DMSO a 1mM per a la seva conservació a llarg termini, protegit de la llum i a -20°C.

Les cèl·lules crescudes sobre cubreobjectes de vidre (170µm de gruix, 12mm de diàmetre i 1.525 d'índex de refracció, *Marienfeld*, Ref.: 01 115 20) van ser rentades dos cops amb PBS1X i incubades durant 5min amb una solució de Mitotracker 25nM (dissolt en PBS1X). S'aspirà la solució i es feren dos rentats de les mostres amb PBS1X de 5min cadascun.

7.10.2. Fixació aldèhica de les cèl·lules

Aquest pas és un pas molt important ja que permet mantenir l'estructura cel·lular i la integritat dels antígens. Existeixen diferents tipus de fixadors i també diferents protocols respecte el seu ús, sobretot pels casos en què es vulgui mantenir bé la citoarquitectura per estudis en 3-D.

La fixació aldèhica més utilitzada per immunofluorescència és la del paraformaldehid. Per a la preparació del formaldehid al 16% (*Sigma*, Ref.: 158127) es pesaren 16g de reactiu i es mesclaren en gairebé 100mL d'aigua miliQ autoclavada, deixant la mescla en agitació unes dues hores sota una campana d'extracció de gasos, fins a la resuspensió total. S'equilibrà el pH a 7.4 amb NaOH 6N i es guardaren alíquotes a -20°C per a usos posteriors.

MATERIALS I MÈTODES

Es fixaren les cèl·lules utilitzant una solució de paraformaldehid al 3%, tot cobrint-les amb solució de fixació durant 15min a temperatura ambient. A continuació s'aspirà la solució i es realitzà un rentat ràpid amb PBS1X i dos rentats posteriors amb PBS-Glicina de 5min cadascun. La glicina serveix per bloquejar tots els grups aldèhics que hagin quedat lliures després de la fixació. És aconsellable mantenir la glicina en tots els tampons utilitzats (rentat, bloqueig, etc).

Solució de fixació

Paraformaldehid 16%.....	760µL
Sacarosa 1M.....	240µL
PBS1X.....	2mL
Aigua miliQ autoclavada.....	1mL

Solució de PBS-Glicina (solució de rentat)

PBS.....	100mM
Glicina.....	20mM

En cas de no procedir a la immunodetecció seguidament, es poden guardar les mostres fixades a 4°C i en una solució de PBS amb un conservant (Azida sòdica 10mM, *Merck*, Ref.: 106688) per un manteniment a curt plaç. Si cal guardar-les per un llarg període de temps, poden conservar-se congelades a -20°C.

7.10.3. Permeabilització

La permeabilització és necessària per a la detecció d'antígens intracel·lulars. Per fer-ho s'utilitzen detergents que actuen sobre la membrana cel·lular permetent l'entrada dels anticossos. El detergent emprat, la concentració i el temps d'incubació depenen del tipus cel·lular i de l'antigen a detectar. En el present treball, un cop fixades, les cèl·lules es van incubar durant 45min a 37°C amb solució de permeabilització. Seguidament, es feren dos rentats amb PBS-Glicina de 5min cadascun.

Solució de permeabilització

PBS.....	100mM
Glicina.....	20mM
Tritó X-100.....	0.05%

7.10.4. Bloqueig

Per tal d'evitar unions inespecífiques dels anticossos, es va realitzar el bloqueig de les preparacions utilitzant BSA a l'1%. Es van cobrir els cubreobjectes amb solució de bloqueig (100µL per cubre) durant 45min a 37°C. Seguidament, es feren dos rentats amb PBS-Glicina de 5min cadascun.

Solució de bloqueig

PBS.....	100mM
Glicina.....	20mM
Albúmina lliure d'àcids grassos ^a	1%

^a Albúmina de sèrum boví. Fracció V, lliure d'àcids grassos (*Roche*, Ref.: 775827)

MATERIALS I MÈTODES

7.10.5. Incubació amb els anticossos

El procés d'incubació amb els anticossos es va realitzar durant 45min a 37°C, realitzats dos rentats amb solució de PBS-Glicina entremig. Per l'experiment mostrat en aquest treball s'emprà l'anticòs primari anti-myc a una dilució 1:25 i l'anticòs secundari *Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)* a una dilució 1:500, ambdós diluïts en la solució de bloqueig.

Per a la tinció dels nuclis cel·lulars, s'emprà el marcador DAPI (*Sigma*, Ref.: D9542) a una concentració final de 5µg/mL, que s'afegí a qualsevol de les dues incubacions amb anticossos.

Igual que l'anticòs secundari i el marcador de membrana mitocondrial, DAPI és una molècula que perd fluorescència en contacte amb la llum i amb el pas del temps. Per aquest motiu, les mostres es protegiren en tot moment de la llum i es guardaren un màxim de dues setmanes a 4°C abans de la seva visualització al microscopi.

En finalitzar la incubació amb l'anticòs secundari, es feren dos rentats amb PBS1x i es procedí al muntatge dels cubreobjectes sobre els portaobjectes.

7.10.6. Muntatge de les mostres sobre portaobjectes i anàlisi en el microscopi confocal

Per al muntatge dels cubreobjectes sobre els portaobjectes es van deixar assecar les mostres uns quants minuts a temperatura ambient. Seguidament es va posar una gota (7-10µL) de medi de muntatge *Mowiol (Calbiochem, Ref.: 475904)* sobre el portaobjectes, i s'hi dipositaren els cubreobjectes, de manera molt suau, amb la cara on estan les cèl·lules en contacte amb el medi, evitant la formació de bombolles d'aire entre el vidre i la mostra.

Les preparacions es van deixar assecar tota la nit a 4°C abans del seu anàlisi al microscopi confocal de fluorescència LEICA SP2.

7.11. 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.

Es va utilitzar la soca BL21(DE3) d'*E. coli*, que conté el lisogen DE3, transportador del gen de la T7 RNA polimerasa sota el control del promotor *lacUV5*, requerint així IPTG (isopropil- α -D-tiogalactosidasa; *AppliChem* Ref.: A1008) per a l'expressió de la T7 RNA polimerasa. Es reduí la degradació de proteïnes heteròlogues expressades utilitzant una soca B/r, mancada de la proteasa *lon* ni la proteasa de membrana externa *OmpT*.

Durant aquest treball es van expressar i purificar les proteïnes GST-CPT1C, GST-AK299866 i GST, cDNAs prèviament clonats en el vector pGEX-4T1, així com NusA-AK299866 i NusA, cDNAs clonats en el vector pET43a (+).

MATERIALS I MÈTODES

7.11.1. Inducció dels cultius

Per a la inducció de les proteïnes, es va fer créixer una colònia aïllada en un pre-inòcul de 50mL de LB/ampicil·lina (GST, GST-CPT1C i GST-AK299866) o carbenicil·lina (NusA i NusA-AK299866) durant tota la nit a 37°C. Al dia següent es diluï 1:50 en 200mL de medi LB amb l'antibiòtic fresc i es deixà créixer a 37°C fins a una O.D₆₀₀ de 0.6 (GST, GST-CPT1C i GST-AK299866, NusA i NusA-AK299866).

En aquest punt es va iniciar la inducció de la proteïna de fusió afegint al medi IPTG 0.1mM (GST i GST-CPT1C), 0.5mM (GST-AK299866) o 1mM (NusA i NusA-AK299866) i mantenint el cultiu a 22°C durant 5 hores. En alguns casos, i per tal d'augmentar la quantitat de proteïna induïda, es realitzà una segona inducció durant tota la nit, afegint antibiòtic de nou. Les cèl·lules van ser recollides quan la OD era de 2 aproximadament per centrifugació (15min a 7000g a 4°C) i, en cas necessari, congelades a -80°C fins a la seva utilització.

7.11.2. Obtenció i purificació de proteïnes de fusió a la GST

Es va resuspendre el *pellet* cel·lular en 4mL per gram de *pellet* sec (~6mL) de tampó NETN, més endavant descrit, i es lisaren les cèl·lules per sonicació (30seg per cada mL de suspensió cel·lular, cycle 0.5, augmentant l'amplitud de 60 a 100%). El sonicat va ser centrifugat (15min a 16000g a 4°C) per tal d'eliminar les restes cel·lulars, agregats de la proteïna i cossos d'inclusió. Es va iniciar la purificació de la proteïna de fusió present en el sobrenedant, aprofitant la capacitat de la glutatió-S-Transferasa (GST) d'unir-se al glutatió.

Es va incubar l'extracte proteic durant 45 minuts a 22°C en rotació 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 la resina 3 vegades amb PBS1X fred, la proteïna purificada fou eluïda de la glutatió-sefarosa mitjançant el tampó d'elució, que conté glutatió reduït (*Sigma*, Ref.: G6013) durant 10 minuts a 22°C en rotació.

Es va comprovar la integritat de la proteïna obtinguda per electroforesi en un gel d' SDS-PAGE i tinció amb *Comassie Blue* i es va quantificar pel mètode de Bradford (Mètodes, apartat 7.4). 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*.

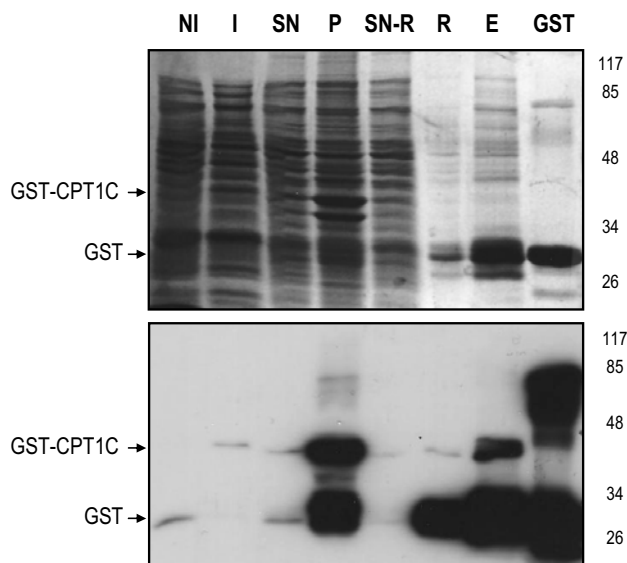


Figura M.2. Obtenció de la proteïna de fusió GST-CPT1C (41kDa) en *E.coli*. Es recolliren alíquotes de cada punt del procés d'inducció i purificació de la proteïna, per tal de fer-ne un seguiment. Es carregaren 10µg de cada mostra en un gel d' SDS-acrilamida al 10% i es visualitzaren les proteïnes per tinció amb *Comassie Blue* (superior) o *Western blot* anti-GST (inferior). NI, No induït; I, induït; SN, sobrenedant del sonicat; P, *pellet* del sonicat; SN-R, sobrenedant de la resina al finalitzar la incubació d'unió; R, resina; E, eluït; GST, eluït de l'obtenció de la proteïna control GST (26kDa).

MATERIALS I MÈTODES

Tampó NETN

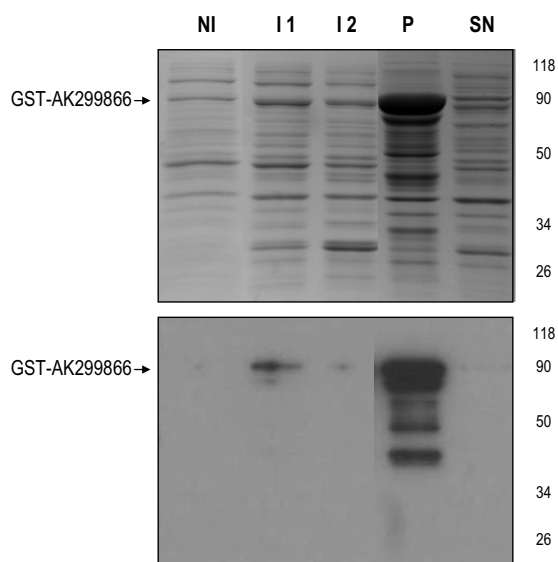
Tris-HCl pH8.0.....	20mM
NaCl.....	100mM
EDTA.....	1mM
Nonidet P-40.....	0.5%

Tampó d'elució

Tris-HCl pH9.0.....	50mM
Glutatió reduït.....	20mM

Tal com s'observa a la figura M.2, el rendiment del procés d'inducció i purificació de la proteïna GST-CPT1C va ser molt baix, i gran part de la proteïna expressada es trobava a la fracció insoluble de la *pool* de proteïnes cel·lulars. La proteïna purificada, doncs, no es va poder utilitzar per a l'obtenció d'anticossos en conill contra la CPT1C humana. Per aquest motiu, s'encarregà la síntesi i purificació d'un anticòs contra la regió C-terminal de la proteïna (Mètodes, apartat 8.1).

Figura M.3. Obtenció de la proteïna de fusió GST-AK299866 (81kDa) en *E.coli*. Es recolliren alíquotes de cada punt del procés d'inducció i purificació de la proteïna, per tal de fer-ne un seguiment. Es carregaren 10µg de cada mostra en un gel d' SDS-acrilamida al 12% i es visualitzaren les proteïnes per tinció amb *Comassie Blue* (superior) o *Western blot* anti-GST (inferior). NI, No induït; I1, primer induït (5h); I2, segon induït (o/n); P, *pellet* del sonicat; SN, sobrenedant del sonicat.



A la figura M.3 s'observa que la proteïna de fusió GST-AK299866 expressada en *E.coli* es trobava a la fracció insoluble de la *pool* de proteïnes cel·lulars. No es va poder utilitzar, doncs, aquesta proteïna purificada per a l'obtenció d'anticossos en conill contra la isoforma AK299866 de la *CPT1C* humana.

Per aquest motiu es dissenyà una nova aproximació experimental, utilitzant el transportador NusA per tal de solubilitzar la proteïna (Davis, Elisee et al. 1999).

7.11.3. Obtenció i purificació de proteïnes de fusió a la NusA

Es va resuspendre el *pellet* cel·lular en 4mL per gram de *pellet* sec (~6mL) de tampó A, més endavant descrit, i es lisaren les cèl·lules per sonicació (30seg per cada mL de suspensió cel·lular, 0.5cicles i augmentant l'amplitud de 60 a 100%). El sonicat va ser centrifugat (25min a 16000g a 4°C) per tal d'eliminar les restes cel·lulars, agregats de la proteïna i cossos d'inclusió. Es va iniciar la purificació de la proteïna de fusió present en el sobrenedant, aprofitant l'afinitat d'unió del *tag* (His)₆ a metalls com el níquel o el cobalt.

MATERIALS I MÈTODES

El resultat mostrat a la figura M.4 indica que aproximadament un 40% de la proteïna de fusió NusA-AK299866 total expressada en *E.coli* era soluble, tot i restar una part en el sediment cel·lular.

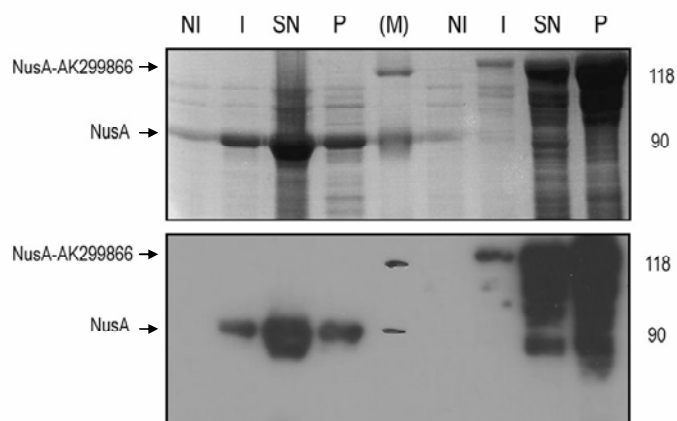


Figura M.4. Obtenció de la proteïna de fusió NusA-AK299866 (110kDa) en *E.coli*. Es recolliren alíquotes de cada punt del procés d'inducció i purificació de la proteïna, per tal de fer-ne un seguiment. Es carregaren 10µL en comassie i 5µL en WB de cada mostra en un gel d'SDS-acrilamida al 8% i es visualitzaren les proteïnes per tinció amb *Comassie Blue* (superior) o *Western blot* anti-His (inferior). NI, No induït; I, induït; SN, sobrenedant del sonicat; P, *pellet* del sonicat; (M), marcador de pes molecular.

Abans de procedir a la purificació de la proteïna de fusió present en el sobrenedant del sonicat, es mesurà la concentració de totes les mostres, per tal de carregar-ne la mateixa quantitat a la columna de purificació, i evitar així grans diferències en el rendiment del procés.

Es va incubar l'extracte proteic durant 2 hores amb una suspensió al 50% de resina Ni²⁺/nitrilotriacetat (Ni/NTA; *Qiagen*, Ref.: 30210), prèviament rentada i equilibrada amb el tampó A, seguint les instruccions de la casa comercial. Aquest tampó conté imidazol (*Merck*, Ref.: 4716) que competeix amb el tag d'histidines per unir-se a la resina i que, usat a baixes concentracions (10-20mM), evita la unió de proteïnes inespecífiques. S'empaquetà la resina a la columna de plàstic i es rentà amb 5 volums de tampó A. En aquest punt, s'utilitzà la proteïna per a un estudi d'interaccions proteïna-proteïna amb un extracte hipotalàmic humà (Mètodes, apartat 7.12).

En el casos en què es necessitava la proteïna soluble per a posteriors estudis d'activitat enzimàtica i competició amb malonil-CoA, es procedí a l'elució de la proteïna purificada afegint 2.5 volums del tampó B.

Per tal de concentrar i dialitzar les proteïnes, es va transferir la mateixa quantitat d'eluit de totes les mostres, prèviament quantificades, als tubs Amicon® de 4mL de capacitat (*Merck Millipore* Ref.: UFC801008), enrasant el tub amb el volum necessari de tampó C (equivalent al Tampó de boles de vidre. Mètodes, apartat 13.4). Es realitzaren tres centrifugacions successives (20min a 4000g a 4°C), enrasant cada cop el tub amb tampó C, obtenint-se, finalment, un volum d'entre 0.2-1mL de mostra concentrada i dialitzada.

Tampó A

NaCl.....	300mM
NaH ₂ PO ₄	50mM
Imidazol.....	10mM
β-Mercaptoetanol.....	5mM
PMSF*.....	1mM
Inhibidors de proteases 1000x*.....	1x

MATERIALS I MÈTODES

Tampó B

NaCl.....	300mM
NaH ₂ PO ₄	50mM
Imidazol.....	200mM
β-Mercaptoetanol.....	5mM
PMSF*.....	1mM
Inhibidors de proteases 1000x*.....	1x

Tampó C

Hepes pH 7.8.....	10mM
EDTA pH 8.....	1mM
Glicerol.....	10%
PMSF*.....	1mM
Inhibidors de proteases 1000x*.....	1x

*El còctel d'inhibidors de proteases (*Sigma*, Ref.: P8340) i el PMSF (*Sigma*, Ref.: P7626) es van afegir en el moment d'utilitzar el tampó.

7.12. Anàlisi d'interaccions proteïna-proteïna

Considerant les observacions realitzades en aquesta tesi doctoral, ens plantejarem la hipòtesi que, en cas que la proteïna CPT1C humana establis alguna interacció en hipotàlem per dur a terme la seva funció, la isoforma AK299866 seria una bona eina de treball per estudiar-la. Així, es posà a punt un protocol per a l'anàlisi d'aquestes possibles interaccions entre la proteïna NusA-AK299866 (empaquetada a la columna de níquel, veure Mètodes, apartat 7.11.3) i un extracte proteic hipotalàmic humà, del qual se n'obtingué la proteïna total segons el protocol descrit (Mètodes, apartat 7.2). S'utilitzà la proteïna NusA com a control negatiu de l'experiment.

Per tal d'evitar la contaminació de la mostra amb queratines i altres proteïnes procedents de l'usuari, s'empraren guants en tot moment, s'utilitzaren tubs sense autoclavar, rentats amb metanol evaporat a la llum ultravioleta i puntes amb filtre.

Es rentà la columna amb 5mL de Tampó A i s'afegí l'extracte hipotalàmic, promovent les possibles interaccions proteïna-proteïna i tot recollint l'eluit per a una posterior comparació amb l'eluit final. Es rentà de nou la columna amb 2.5mL de tampó, amb l'objectiu d'eliminar les proteïnes de l'extracte que no formaven interaccions amb la proteïna NusA-AK299866. Per fer-ho s'emprà el mateix tampó en què estava dissolt l'extracte hipotalàmic (Tampó A, sense imidazol). Finalment, s'eluiren les proteïnes unides amb una solució amb alt contingut de salts (Tampó D), que afavorís la ruptura d'aquests enllaços. Com en el protocol anterior, es recolliren els eluïts en els dispositius Amicon® per tal de concentrar i desalar les mostres, emprant en aquest cas tampó fosfat (NaH₂PO₄ 50mM pH 8) per enrasar els tubs després de cada centrifugació.

Es congelaren les mostres a -80°C (volum final de 0.2mL-1mL) un mínim de 5h abans de ser liofilitzades durant tota la nit a -60°C i 0.03mBar en un Liofilitzador *Telstar Cryodos* (Matejtschuk 2007). Es van resuspendre els liofilitzats en el mínim volum possible de tampó fosfat (30-50µL), es quantificaren i es sembraren en un gel d'acrilamida al 12%, per tal de visualitzar el patró electroforètic de les proteïnes presents a la mostra (Figura M.5).

MATERIALS I MÈTODES

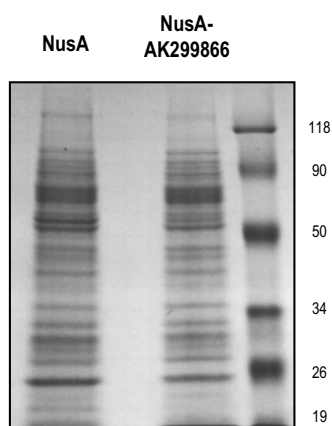


Figura M.5. Visualització del patró de bandes de les mostres enviades a seqüenciar. S'empaquetaren 4-5mg d'extracte bacterià expressant les proteïnes NusA i NusA-AK299866 en una columna de níquel. S'incubaren amb 5mg d'extracte hipotalàmic humà i s'elüïren amb una solució NaCl 1M. Tinció amb *Comassie Blue* de 20µg de les mostres eluïdes, dialitzades i liofilitzades, sembrats en un gel d'acrilamida al 12%.

Les mostres van ser analitzades al Servei de Proteòmica de la Universitat Autònoma de Barcelona mitjançant LCMS (cromatografia líquida i espectroscopia de masses) amb l'equip *Orbitrap*, per tal d'identificar proteïnes diferencialment eluïdes entre les dues columnes.

Els resultats no mostraren diferències significatives de proteïnes presents entre les dues mostres, tot i que es recolliren en un llistat aquells pèptids diferencialment detectats entre ambdues mostres (Taula M.1).

Accession	Description	Σ# Peptides	Folds
A6NGU3	Putative uncharacterized protein IGHM (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=4 SV=1 - [A6NGU3_HUMAN]	6	5,00
A8MTE3	Putative uncharacterized protein ANXA5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=3 SV=1 - [A8MTE3_HUMAN]	14	3,67
Q01484	Ankyrin-2 OS=Homo sapiens GN=ANK2 PE=1 SV=3 - [ANK2_HUMAN]	4	3,00
Q07955-3	Isoform ASF-3 of Splicing factor, arginine/serine-rich 1 OS=Homo sapiens GN=SFERS1 - [SFERS1_HUMAN]	4	3,00
B7Z7A9	Phosphoglycerate kinase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z7A9_HUMAN]	4	3,00
Q59H57	Fusion (Involved in t(12;16) in malignant liposarcoma) isoform a variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q59H57_HUMAN]	4	3,00
P17600-2	Isoform IB of Synapsin-1 OS=Homo sapiens GN=SYN1 - [SYN1_HUMAN]	4	3,00
P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=HINT1 PE=1 SV=2 - [HINT1_HUMAN]	4	3,00
B7Z4U6	cDNA FLJ55803, highly similar to Gelsolin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z4U6_HUMAN]	15	2,75

Taula M.1. Taula comparativa de proteïnes diferencialment detectades en la mostra NusA-AK299866 respecte el control. Llistat semi-quantitatiu de les proteïnes que diferencialment s'identificaren en major proporció a la mostra NusA-AK299866 respecte la mostra NusA. *Accession*, codi identificador de la proteïna; *Description*, dades de la proteïna; *Σ# Peptides*, nombre de pèptids identificats corresponents a aquesta proteïna; *Folds*, relació entre *Σ# Peptides* identificats per la mostra NusA-AK299866 respecte la NusA.

8. Anticossos per a la immunodetecció de CPT1C

8.1. Generació d'anticossos anti-CPT1C

8.1.1. Síntesi de l'immunogen, inoculació i sagnat dels conills.

S'obtingueren anticossos específics contra la proteïna CPT1C humana per encàrrec a la casa comercial *GenScript*. S'ordenà la síntesi del pèptid QTGASKASMTSTDF conjugat a hemocianina de lapa

MATERIALS I MÈTODES

(corresponent als últims 15 aminoàcids de la proteïna) amb què s'immunitzaren dos conills diferents. El protocol d'immunització dut a terme fou el següent:

- Dia 0: Obtenció de sèrum preimmune, injecció de l'antigen.
- Dia 14: Primera injecció de l'antigen.
- Dia 28: Segona injecció de l'antigen.
- Dia 35: Sagnat del conill i obtenció del sèrum 1.
- Dia 42: Tercera injecció de l'antigen.
- Dia 49: Sagnat del conill i obtenció del sèrum 2.
- Dia 56: Quarta injecció de l'antigen.
- Dia 63: Sagnat final i obtenció del sèrum 3.

8.1.2. Purificació de les Immunoglobulines.

Les immunoglobulines presents en el sèrum precipiten quan aquest és mesclat amb un 45% de sulfat amònic.

S'afegí al sèrum un volum de solució de sulfat amònic saturat i es deixà en agitació a 4°C durant tota la nit. Es centrifugà a 3000g durant 30 minuts i el *pellet* obtingut es va resuspendre en 0.5 vegades el volum inicial de PBS1X. Posteriorment es dialitzà contra PBS1X durant tota la nit i es tornà a centrifugar a 3000g durant 30 minuts, recollint, aquest cop, el sobrenedant.

8.1.3. Anàlisi dels anticossos mitjançant la tècnica de *Western blot*.

El sèrum obtingut s'analitzà mitjançant *Western blot* emprant el *pellet* cel·lular d'*E.coli* expressant la proteïna GST-CPT1C (Mètodes, apartat 7.11.2). El sèrum del conill produeix anticossos específics contra la CPT1C recombinant, també detectable amb l'anticòs contra la glutatió-S-transferasa (GST), tal com es mostra a la figura M.6.

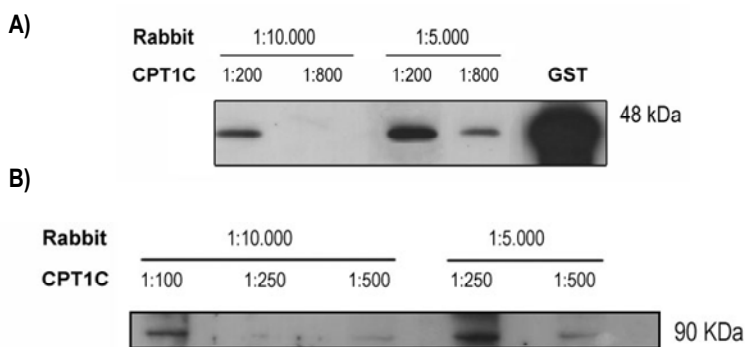


Figura M.6. Titulació de l'anticòs produït contra la CPT1C humana.

A) Anàlisi per *Western blot* amb l'anticòs anti-CPT1C (Genscript) d'extractes de *pellet* cel·lular d'*E.coli* transformat amb el plàsmid *Human CPT1C-pGEX4T1*. 10µg d'extracte es sembraren en un gel d'acrilamida al 12%. GST, immunodetecció amb l'anticòs anti-GST. B) Anàlisi per *Western blot* de 10µg d'extractes mitocondrials de llevat electroporat amb el plàsmid *Human CPT1C-pGAPZB*.

L'anticòs produït, però, no va ser capaç de reconèixer la proteïna endògena en la línia neuronal humana SK-N-JD per *Western blot* (Figura M.7A), tot i detectar-ne bons nivells endògens d'mRNA per qRT-PCR (Materials, apartat 3.1). Tampoc es detectà amb aquest anticòs CPT1C en extractes proteics de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector d'expressió en eucariotes *Human CPT1C(myc)-pCDNA3*. Es validà la transfecció mitjançant la detecció d'una proteïna del pes molecular esperat per CPT1C amb l'anticòs anti-myc, absent en el control (Figura M.7B).

MATERIALS I MÈTODES

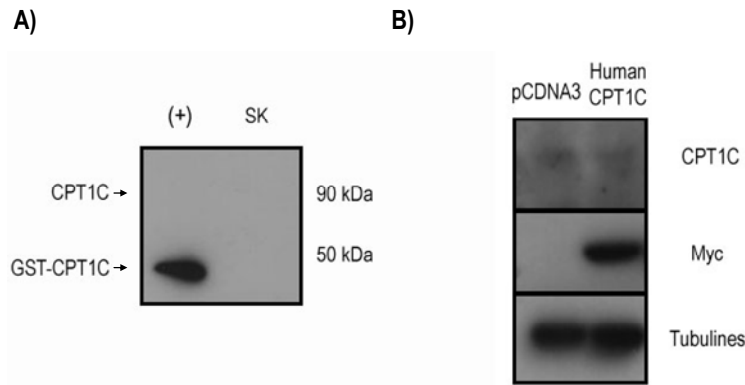


Figura M.7. L'anticòs anti-CPT1C sintetitzat en conills no detecta la proteïna endògena en cèl·lules SK-N-JD ni sobreexpressada en cèl·lules HeLa. Anàlisi per *Western blot* de diferents mostres sembrades en un gel d'acrilamida al 8%. S'emprà una dilució 1:250 d'anti-CPT1C i 1:5.000 d'anti-*rabbit* per a la detecció específica de CPT1C. A) Immunodetecció amb l'anticòs anti-CPT1C de 5µg d'extracte de *pellet* cel·lular d'*E.coli* transformat amb el plàsmid *Human CPT1C-pGEX4T1* (+), i 15µg d'extracte proteic total de cèl·lules SK-N-JD (SK). B) 15µg d'extracte proteic total de cèl·lules HeLa transfectades amb la construcció *Human CPT1C(myc)-pCDNA3* i el vector buit es van analitzar amb els diferents anticòssos indicats.

8.2. Immunodetecció amb l'anticòs anti-CPT1A

Per tal de validar l'anticòs anti-CPT1 (#139) disponible al laboratori (Nicot, Hegardt et al. 2001) com a eina d'anàlisi de la proteïna CPT1C, es van analitzar mostres d'extracte proteic de cervell total de ratolí amb aquest anticòs. Com a control, i per tal de comparar el patró d'expressió, s'analitzà alhora un extracte proteic de fetge de la mateixa espècie.

Tal com s'observa a la figura M.8A, l'anticòs generat al nostre laboratori contra la regió carboxiterminal de CPT1A de porc (Materials, apartat 6.1) era capaç de detectar una proteïna d'un pes molecular similar a l'esperat per CPT1C. D'altra banda, no era una detecció específica, ja que s'observa una segona banda amb la mateixa mobilitat electroforètica que presenta CPT1A en fetge. L'anticòs també fou capaç de detectar, i de forma específica, la proteïna CPT1C humana sobreexpressada en el llevat *P. pastoris*, amb el pes molecular esperat (Figura M.8B).

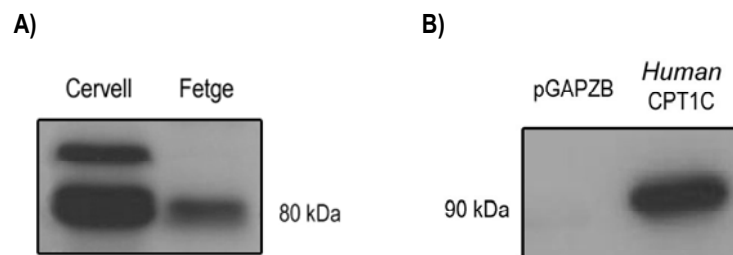


Figura M.8. L'anticòs anti-CPT1 (#139) és capaç de detectar la CPT1C endògena en extractes de ratolí i sobreexpressada en *P. pastoris*. Anàlisi per *Western blot* de diferents mostres sembrades en un gel d'acrilamida al 8%. S'emprà una dilució 1:1.000 d'anti-CPT1 (#139) i 1:10.000 d'anti-*rabbit*. Es van carregar 15µg d'extractes proteics totals de cervell i de fetge de ratolí (A) i 10µg d'extractes mitocondrials de *P. pastoris* sobreexpressant els plàsmids pGAPZB (control negatiu) i *Human CPT1C-pGAPZB*.

8.3. Immunodetecció amb altres anticossos

Durant la realització d'aquesta tesi doctoral es comercialitzà un anticòs específic contra CPT1C de la casa *Sigma* (Ref.: HPA014529), que vàrem adquirir. Aquest anticòs fou útil per a la detecció de la proteïna sobreexpressada, i no l'endògena, en els nostres sistemes d'expressió, com s'observa a la Figura M.9.

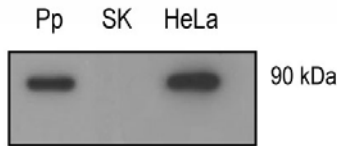


Figura M.9. L'anticòs anti-CPT1C de *Sigma* no detecta la proteïna endògena en extractes de la línia neuronal SK-N-JD. S'analitzaren 5µg d'extracte mitocondrial de *P. pastoris* (Pp) i 15µg d'extracte total de HeLa (HeLa) sobreexpressant la CPT1C humana, així com 15µg d'extracte proteic total de cèl·lules SK-N-JD (SK) en un gel d'acrilamida al 8%. S'emprà una dilució 1:250 de l'anticòs anti-CPT1C i 1:10.000 d'anti-rabbit com a anticòs secundari.

Durant l'estada al laboratori del Dr. Victor Zammit, s'utilitzaren els anticossos dissenyats per aquest grup per a la detecció de CPT1A i CPT1C en gels denaturants (Mètodes, apartat 7.5) i no denaturants (Mètodes, apartat 7.6) d'acrilamida (Figura M.10).

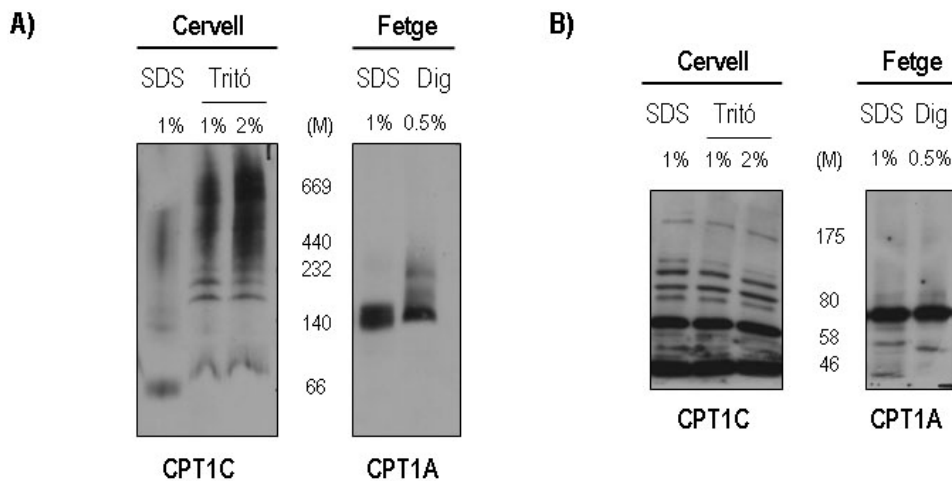


Figura M.10. L'anticòs anti-CPT1C de ratolí no presentà suficient especificitat per treure una conclusió clara sobre l'estat d'agregació de CPT1C en gels BN-PAGE. Anàlisi per BN-PAGE 4-16% (A) i SDS-PAGE 6% (B) de 10µg d'extractes mitocondrials de cervell (esquerra) i fetge (dreta) de ratolí, en diferents condicions de solubilització. Per a la immunodetecció s'empraren els anticossos anti-CPT1C (VZ), panel esquerra, i anti-CPT1A (VZ), panel dreta, dissenyats pel grup del Dr. Victor Zammit. S'utilitzaren els detergents SDS (com a control del monòmer), Tritó i Digitonina (Dig) a les concentracions indicades.

Com s'observa a la figura M.10, l'anticòs emprat per a la immunodetecció de CPT1C no presentà l'especificitat suficient que permetés concloure que la proteïna s'associava en oligòmers. En el cas de CPT1A, s'observa una banda superior en solubilitzar la proteïna amb tritó, corresponent a un trimer (≈240kDa), probablement, com s'havia demostrat anteriorment en el grup (Jenei, Borthwick et al. 2009).

9. Espectroscopia de dicroisme circular

L'espectroscopia de dicroisme circular (CD) és un tipus d'espectroscopia d'absorció que proporciona informació sobre l'estructura de molts tipus de macromolècules biològiques. Es basa en la mesura de la llum polaritzada circularment a la dreta i a l'esquerra. Aquesta absorció diferencial suposa

MATERIALS I MÈTODES

una variació de l'amplitud de les ones transmeses i per això la suma vectorial de les dues components descriu gràficament una el·lipse (Greenfield and Fasman 1969). El fenomen del dicroisme circular és molt sensible a l'estructura secundària de polipèptids, proteïnes i àcids nucleics.

Els espectres de dicroisme circular s'obtenen generalment en les regions de l'ultraviolat (250-350nm) i llunyà (180-250nm) de la radiació electromagnètica, ja que són les regions de les transicions electròniques de l'esquelet dels pèptids, cadenes laterals de les proteïnes i les bases nitrogenades del DNA. Els espectres en aquesta regió són un reflex de la conformació global de la biomolècula i a més, extremadament sensibles als canvis de conformació.

La primera precaució a tenir en compte en el tractament de mostres per fer lectures per dicroisme circular és utilitzar sempre material de vidre, ja que els pèptids tenen gran afinitat pel material amb què es treballa i caldrà fer rentats exhaustius amb òxid nítric entre mostra i mostra, que el material plàstic no resistiria. A més a més, la majoria de solvents orgànics amb què es treballa (metanol, cloroform, acetonitril, etc) poden dissoldre el plàstic i provocar soroll de fons en l'espectre. S'empraren, doncs, pipetes Hamilton pel pipeteig de petits volums i vials de vidre per a la preparació de les mostres. Per a les lectures s'emprà una cubeta de quars, que no absorbeix a longituds d'ona de l'espectre UV llunyà, amb un pas de llum d'1mm.

En aquest treball s'ha utilitzat aquesta tècnica per analitzar la possible disposició en hèlix alfa dels pèptids TM2A i TM2C, sintetitzats per *Peptide 2.0* (Materials, apartat 8). Es pesà una quantitat determinada de pèptid que va ser inicialment resuspesa en metanol, a una concentració final d'1mg/mL, solució de la qual es partí per a posteriors dilucions.

En aquells casos en què la mostra no mostrava un aspecte homogeni, s'afavorí la solubilització mitjançant sonicació a 37°C en un bany d'ultrasons. En cas de voler eliminar el solvent de la mostra, aquest s'evaporà amb N₂ gas i posteriorment es sotmeteren les mostres a centrifugació amb buit en un aparell *Univap*, quedant la mostra de nou en estat sòlid i en l'estat micel·lar conferit per l'anterior solvent. Contràriament, en casos en què es requeria l'exposició del pèptid a un lípid determinat, aquest s'afegí directament a la solució mare del pèptid en metanol.

Cal considerar, però, que molts lípids emprats per a aquest tipus d'experiments (LPC, POPC) es troben preparats en solucions amb cloroform:metanol, que absorbeixen a l'UV llunyà i per tant caldrà eliminar-los abans de la lectura de l'espectre. En aquests casos, un cop s'ha visualitzat una solució homogènia del pèptid en el lípid objecte d'estudi, de nou es procedí al tractament amb N₂ gas i *Univap*, resuspenent el sòlid final en tampó fosfat pH7, NaCl 100mM i SDS 10mM. S'utilitzà l'aparell *Jasco* model 715 per a la lectura de les mostres.

10. Cultius cel·lulars

10.1. Condicions de cultiu

PC12:

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 10x	1x
Glucosa ¹	4.5g/L
Glutamina ¹	6mM
Bicarbonat sòdic	3g/L
Penicil·lina ³	100U.I./mL
Estreptomicina ³	0.1mg/mL
FBS/HS inactivats per calor	10%/5%

MATERIALS I MÈTODES

Neuro2A/HeLa:

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

HepG2:

MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 10x	1x
Glucosa ¹	1g/L
Glutamina ¹	4mM
Bicarbonat sòdic	1.5g/L
Penicil·lina ²	100U.I./mL
Estreptomicina ²	0.1mg/mL
FBS inactivat per calor	10%

SK-N-JD:

RPMI	1x
Glucosa ¹	4.5g/L
Glutamina ¹	6mM
Bicarbonat sòdic	3g/L
Penicil·lina ²	100U.I./mL
Estreptomicina ²	0.1mg/mL
FBS inactivat per calor	10%

¹El DMEM i el MEM ja inclou aquestes quantitats de glutamina i glucosa i per tant no cal afegir-les en preparar el medi de cultiu.

²La solució Penicil·lina-Estreptomicina 10.000UI/mL 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 cèl·lules 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.

10.2. Condicions de diferenciació cel·lular

La línia cel·lular Neuro2A és una línia de neuroblastoma de ratolí amb fenotip neuronal desdiferenciat, susceptible de diferenciar-se a neurones en absència de sèrum en el medi de cultiu (Schubert, Humphreys et al. 1969; Seeds, Gilman et al. 1970). Evangelopoulos i col·laboradors han descrit que aquest efecte és degut a l'activació d'AKT i EGFR (Evangelopoulos, Weis et al. 2005).

Per això, es sembraren 5x10⁵ cèl·lules en plaques de 100mm i un cop adherides, es disminuí la concentració de sèrum en el medi de cultiu, de 10% a 1% de FBS. La població cel·lular es va diferenciar a neurones 24hores després del canvi de medi. Durant aquest període de temps les cèl·lules no poden ser tripsinitzades. La densitat de sembra ha de garantir que les cèl·lules no arribaran a més d'un 70% de confluència al final del procés, per permetre l'extensió de les dendrites.

10.3. Congelació de cèl·lules

Les cèl·lules es conservaren 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 les indicacions de la casa comercial. El procés de congelació es va realitzar en un criotub ($2\text{-}3 \times 10^6$ cèls/tub), disminuint la temperatura de les cèl·lules gradualment durant 2-3 dies, mantenint-les a -80°C en un tanc d'isopropanol.

10.4. Descongelació de cèl·lules

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 10mL de medi de creixement fresc i es va transferir a una placa de 100mm. El medi es canvià quan les cèl·lules s'adheriren (5-6h) per tal d'eliminar el DMSO.

Alternativament, es va descongelar el vial cel·lular i es va resuspendre en 10mL de medi de creixement. Es centrifugaren les cèl·lules (1500rpm 5min) i es va resuspendre el *pellet* cel·lular amb 10mL més de medi fresc. D'aquesta manera s'eliminà el DMSO, tòxic per a la majoria de línies cel·lulars.

11. Transfeccions cel·lulars

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*). Aquesta aproximació experimental permet calcular l'activitat promotora d'una construcció i l'efecte de diferents factors de transcripció, tot mesurant la quimioluminescència produïda per l'activitat enzimàtica luciferasa en els extractes cel·lulars.

Existeixen diferents mètodes de transfecció que s'escolleixen, en funció de la durada de l'expressió requerida (transfecció estable o transitòria) i del tipus de cèl·lula a transfectar.

11.1. Transfecció transitòria amb reactius lipídics comercials

La transfecció transitòria permet la introducció de DNA a l'interior de cèl·lules eucariotes durant un període de temps curt (2-3 dies).

Els reactius lipídics emprats es basen en la formació de complexos entre lípids catiónics i DNA, que tenen afinitat per la membrana cel·lular, permetent així l'entrada en l'interior cel·lular. Els mètodes de transfecció amb reactius lipídics són més cars que els mètodes convencionals (fosfat càlcic, per exemple), però ofereixen percentatges de transfecció més elevats, i per això són els més usats en l'actualitat. Totes les transfeccions d'aquest treball es van dur a terme transfeccions transitòries amb el reactiu *Lipofectamine™ LTX Reagent (Invitrogen, Ref.: 15338-100)*, segons les indicacions de la casa comercial. En aquest treball, s'emprà aquest reactiu per a la transfecció transitòria de DNA a les línies cel·lulars HepG2, HeLa i Neuro2A.

El dia abans de l'experiment, es plaquejaren les cèl·lules a una densitat de 1×10^6 cèl·lules/placa de 100mm (*Cultek, Ref. 430167*). Tots els punts de cada experiment es van realitzar per duplicat. Es diluïren 10µg de plasmidi a sobreexpressar en 2.5mL de DMEM lliure d'antibiòtic i s'afegiren 19.5µL de *Lipofectamine™ LTX Reagent* en condicions d'esterilitat. La mescla de transfecció s'incubà durant 30 minuts a temperatura ambient i s'afegí sobre el medi de cultiu de les cèl·lules a transfectar. 24-48 hores

MATERIALS I MÈTODES

després de la transfecció (depenent del tipus d'experiment i el tipus cel·lular) es recolliren les cèl·lules i es procedí a l'anàlisi de la sobreexpressió de les proteïnes transfectades.

11.2. Obtenció d'extractes cel·lulars i assaig d'activitat luciferasa

Les cèl·lules transfectades per qualsevol dels mètodes de transfecció descrits van ser lisades, passats els temps d'incubació apropiats (24-48h), per tal de determinar l'activitat luciferasa present en els extractes cel·lulars.

La lisi cel·lular es va realitzar amb 200µL/per placa de 12 pouets d'un tampó de lisi 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 per normalitzar els valors de la primera). Les mesures de luminescència es van realitzar en un luminòmetre *Sirius* de *Berthold Detection System*.

12. Infecció de cèl·lules amb adenovirus

Els adenovirus recombinants són una eina de transferència gènica molt útil i versàtil degut a les seves característiques de creixement i infectives. Els adenovirus poden ser produïts en grans quantitats i són capaços d'introduir DNA en una gran varietat de tipus cel·lulars de mamífer, incloent cèl·lules amb baixa taxa de creixement. A més a més, poden incorporar fragments de DNA relativament grans (fins a 5-7kb). Els adenovirus s'integren en el genoma de l'hoste amb molt baixa eficiència, evitant així problemes de mutagènesi insercional, i existeixen predominantment en forma d'episomes, fent que l'expressió del transgen sigui transitòria. (Becker, Noel et al. 1994)

12.1. Adenovirus usats i protocol d'infecció

En el present treball s'ha utilitzat l'adenovirus recombinant d'AKT de ratolí, constitutivament actiu, anomenat AKT-CA (*Vector Biolabs*, Ref.: 1020). Conté el tag HA fusionat a l'extrem aminoterminal de la seqüència de la proteïna AKT1 *wild-type*. La fusió de la seqüència de miristoïlació c-Src (unió covalent i irreversible de l'àcid gras miristat, que sembla ser que serveix per a l'autoensamblatge d'estructures supramoleculares) a l'extrem aminoterminal de la proteïna HA-AKT1 fa que la proteïna sigui constitutivament activa, ja que es trobarà permanentment ancorada a la membrana plasmàtica, susceptible així de ser fosforilada i activada (Wang, Ozawa et al. 2011).

Com a control, s'utilitzà un adenovirus que codifica per la proteïna GFP (CBATEG-593a), i que permeté valorar l'eficiència de la infecció visualment en el microscopi.

El protocol d'infecció amb adenovirus depèn de la línia cel·lular. Factors que augmenten l'eficiència d'infecció són el baix volum de medi o el baix contingut en sèrum fetal boví (FBS). En el present treball es plaquejaren 0.75×10^6 cèl·lules Neuro2A en plaques de 6 pouets i, un cop adherides, es disminuï la concentració de sèrum en el medi a 1% FBS, per tal d'induir-ne la diferenciació. Passades 24h, quan un ~90% de la població presentava un fenotip neuronal, es van infectar amb 8MOI (o pfu/cèl) d'adenovirus durant 48h.

MATERIALS I MÈTODES

El càlcul del volum d'adenovirus a afegir es realitzà seguint la següent fórmula:

$$V = (n. \text{ cèls } \times \text{ MOI}) / T$$

essent *n. cèls* el nombre de cèl·lules plaquejat en iniciar l'experiment, i *T* el títol de l'adenovirus emprat (en pfu/mL).

13. Cultiu de llevats: *Pichia pastoris*

En aquest treball s'utilitzà el sistema d'expressió en llevats amb l'objectiu de produir 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.

Les cèl·lules del llevat *Pichia pastoris* (soques X-33, GS115) es van créixer en medi YPD (Materials, apartat 2). Les colònies transformades amb el vector pGAPZ es van seleccionar en medi YPD/zeocina. En el cas del vector pHWO10, aquestes 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 YND sòlid contenen un 1.5% d'agar)	

13.1. Transformació

El procés de transformació és, conceptualment, idèntic al de les cèl·lules bacterianes. Cal obtenir cèl·lules competents i forçar l'entrada de DNA, en aquest cas per electroporació, seleccionar les colònies transformades en un medi selectiu i caracteritzar-les com colònies recombinants positives.

13.1.1. Preparació de cèl·lules electrocompetents

Es van créixer 500mL de cèl·lules en medi YPD tota la nit a 30°C fins a una OD₆₀₀ de 1.3-1.5, considerant que el temps de duplicació aproximat és de 2h. En general, es partia d'un pre-inòcul de 10-50mL crescut durant el dia anterior.

En arribar a la densitat òptica desitjada, les cèl·lules van ser centrifugades (5000rpm 5min) i rentades amb 500 i 250mL d'aigua MiliQ 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 a usos posteriors. Tot el procés es va realitzar en gel, sota flama i amb els reactius a 4°C.

13.1.2. Preparació del DNA

El DNA plasmídic a electroporar 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 pH5.2 i resuspesos en aigua (10µL).

MATERIALS I MÈTODES

13.1.3. 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 minuts. L'electroporació es va realitzar amb un *Electro Cell Manipulator*[®] 600, (BTX), seguint les instruccions del fabricant (2,45kV i 129ohm per tal de generar un pols de 7,5kV/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.

13.2. Selecció de transformants

La selecció de recombinants transformats amb el vector pHWO10 es va fer per creixement de colònies en un medi selectiu deficient en aminoàcids. La integració en el genoma de *P. pastoris* del gen *his4* 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. En el cas de transformants del vector pGAPZB, que inclou el gen de resistència a zeocina, la selecció es va realitzar afegint zeocina al medi de cultiu (YPD).

Les colònies del medi selectiu van ser confirmades com a positives obtenint la fracció proteica total, i comprovant l'expressió de la proteïna CPT1 per *Western blot*.

13.3. Obtenció de la fracció total

S'emprà aquest mètode en l'*screening* inicial de colònies per comprovar l'expressió de la proteïna i validar-les així com a colònies positives, ja que és més ràpid que l'obtenció de la fracció mitocondrial i igualment vàlid.

Es van fer créixer les colònies en 5mL de medi de cultiu durant una nit (aproximadament 16h) fins a una OD₆₀₀ de 1-2. Es van transferir 1,9mL del cultiu a tubs de 2mL de capacitat i es van centrifugar a 14.000g durant 1min a 4°C en una microcentrífuga, descartant el sobrenedant i repetint l'operació fins haver baixat totes les cèl·lules. Es van rentar les cèl·lules tres vegades amb aigua freda destil·lada, deixant el *pellet* ben sec després de la última centrifugació. Es van transferir l'equivalent a un volum de 500µL de boles de vidre a un nou tub estèril de plàstic d'1,5mL i es deixà refredar uns minuts. Es va resuspendre el sediment cel·lular en 500µL de Tampó de boles de vidre fred (Mètodes, apartat 13.4) i s'afegí a les boles de vidre, tot vortejant per aconseguir-ne la completa incorporació.

Es procedí a la lisi cel·lular mitjançant 8-10 cicles de mescla amb vortex i incubació en gel (30segons cada pas). Es van centrifugar les mostres a 5.000g durant 5min a 4°C i es sembraren 20-50µL del sobrenedant en un gel d'acrilamida per analitzar l'expressió de la proteïna transformada per *Western blot*.

13.4. Obtenció de la fracció mitocondrial

L'obtenció de mitocondris de cèl·lules de *P. pastoris* transformades es va realitzar per tal de comprovar l'expressió de CPT1 i assajar-ne 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 (o bé YPD amb zeocina) 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

MATERIALS I MÈTODES

16h i el segon de 8h). Els temps de creixement dels inòculs es van calcular tenint en compte que el temps de duplicació de *P. pastoris* és de 2h aproximadament.

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, Arvidson 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 (*Washed glass beads* 425-600µm, *Sigma* Ref.: G8772), 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/1min gel i centrifugades (2800rpm 20min) a 4°C. El sobrenedant obtingut va ser centrifugat a 15000rpm durant 40min a 4°C per obtenir el sediment de mitocondris. Aquest sediment va ser resuspès en el tampó descrit més avall, quantificat pel mètode de Bradford i conservat a -80°C (Zhu, Shi et al. 1997). El sobrenedant d'aquesta última centrifugació es guardà en cas de necessitar la fracció microsomal (Mètodes, apartat 13.5). Tot el protocol es va realitzar a 4°C.

Tampó de boles de vidre

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

*El còctel d'inhibidors de proteases (*Sigma*, Ref.: P8340) i el PMSF (*Sigma*, Ref.: P7626) es van afegir en el moment d'utilitzar el tampó.

13.5. Obtenció de la fracció microsomal

L'obtenció de microsomes de cèl·lules de *P. 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. Es va dur a terme només en aquells casos on la bibliografia o la hipòtesi en qüestió apuntaven una distribució microsomal o de reticle endoplasmàtic de la proteïna objecte d'estudi.

La fracció microsomal va ser purificada un cop obtinguda la fracció mitocondrial. Es recuperà el sobrenedant de la última centrifugació tot transferint-lo a un tub fresc, i es centrifugà de nou durant 30min a 14000rpm i 4°C. El sediment obtingut va ser resuspès amb el Tampó de boles de vidre, quantificat pel mètode de Bradford i conservat a -80°C.

14. Assaig d'activitat Carnitina palmitoïltransferasa

14.1. Assaig d'activitat en extractes mitocondrials de llevat

L'activitat CPT1 va ser assajada pel mètode de l'intercanvi directe utilitzant L-[³H]carnitina (Bremer, Woldegiorgis et al. 1985). Les reaccions es van realitzar en un volum final de 500µL, tenint en compte el volum de l'extracte mitocondrial, 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 pH7.0.....	20mM
Albúmina lliure d'àcids grassos ^a	1%
Palmitoïl-CoA 2.5mM ^b	80µM

MATERIALS I MÈTODES

L-[³H]carnitina 5mM.....0.2-1mM (~5000dpm/nmol)

KCl q.s.p.....500µL (40-75mM)

^a Albúmina de sèrum boví. Fracció V, lliure d'àcids grassos (Roche, Ref.: 775827)

^b Palmitoïl-CoA, sal de liti (Sigma, Ref.: P9716)

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'afegia l'extracte mitocondrial (100µg) sobre 0.5mL de mescla de reacció, i es van aturar amb 4mL d'àcid perclòric al 6%. Després de centrifugar les mostres (2300rpm 5min), els sediments obtinguts van ser resuspesos en 1.6mL d'aigua freda (4°C). A continuació, es va afegir a cada tub 1mL de 1-butanol, per extreure el producte de la reacció ([³H]palmitoïlcarnitina), i 0.4mL d'àcid perclòric (*Panreac*, Ref.: 131054.1611) al 6%. Es van centrifugar les mostres (2500 rpm 3min) i 0.5mL de la fase no aquosa van ser transferits a un vial de comptatge radioactiu contenint 5mL de líquid de centelleig *Ecolite(+)* (ICN *Biolink 2000*, Ref.: 882475).

14.2. Assaig d'activitat en cèl·lules de mamífer

En general, en aquest tesi doctoral s'ha mesurat l'activitat CPT1 en cèl·lules transfectades transitòriament amb plàsmids que expressaven la proteïna CPT1. La diferència més important respecte l'anterior protocol descrit, és la mesura de palmitoïlcarnitina formada en cèl·lules semiintactes. Així, s'afegí digitonina (*Sigma*, Ref.: D-1407) i cianur potàssic (KCN, *Sigma*, Ref.: 31252) al tampó de reacció, que provocaren la semipermeabilització de les membranes cel·lulars, per tal de permetre l'entrada dels reactius de la reacció al mitocondri.

Com a fet destacable, cal remarcar que per a la preparació de la digitonina es considerà que només un 50% del reactiu és soluble en aigua, que es calentà fins a uns 60°C per afavorir-ne la resuspensió, i es deixà refredar fins a assolir la temperatura ambient abans d'afegir-lo a la mescla de la reacció. Així, es guardà un stock a temperatura ambient al 0.2% que es calentava abans del seu ús.

Donat que per a aturar la reacció i la posterior extracció orgànica es desnaturalitzaren les cèl·lules, la palmitoïlcarnitina formada fou una mesura de l'activitat CPT total de les cèl·lules, que és la suma de l'activitat dels enzims CPT1 i CPT2. Així, s'afegí un punt per condició amb malonil-CoA, que ens permeté discernir l'activitat CPT1, aprofitant el fet que CPT2 és un enzim insensible al malonil-CoA. Finalment, es normalitzaren els valors d'activitat obtinguts per la quantitat de proteïna total de cada condició, ja que era un valor desconegut en aquest cas.

Es plaquejaren les cèl·lules en plaques de 6 pouets a una densitat que garantís la confluència en el moment de l'assaig, i es transfectaren el dia següent al plaqueig, tal com s'ha descrit (Mètodes, apartat 11.1). Passades 48h de la transfecció, es comprovà per fluorescència o per *Western blot* l'expressió de les proteïnes transfectades, i s'inicià l'assaig. Es rentaren les cèl·lules amb PBS1X dues vegades i s'inicià la reacció en afegir 400µL de tampó de reacció sobre les cèl·lules, que s'incubaren a 37°C durant 6min. S'aturà la reacció en afegir 1mL d'àcid perclòric al 6%, i s'emprà un rascador de cèl·lules per recollir-les i transferir-les a tubs de vidre. S'afegí 1mL més d'àcid perclòric al 6%, i es va seguir amb l'extracció orgànica descrita en l'anterior protocol (Mètodes, apartat 14.1).

MATERIALS I MÈTODES

Mescla de reacció

HEPES pH7.0.....	20mM
Albúmina lliure d'àcids grassos ^a	1%
Palmitoil-CoA 2.5mM ^b	70µM
L-[³ H]carnitina 5mM.....	0.2-1mM (~5000dpm/nmol)
KCN 0.2M.....	1mM
Digitonina.....	60µg/mL
KCl q.s.p.....	400µL (40-75mM)

^a Albúmina de sèrum boví. Fracció V, lliure d'àcids grassos (Roche, Ref.: 775827)

^b Palmitoil-CoA, sal de liti (Sigma, Ref.: P9716)

14.3. IC₅₀ per Malonil-CoA

La constant d'inhibició (IC₅₀) del malonil-CoA es va obtenir assajant extractes mitocondrials en presència de concentracions creixents de malonil-CoA (Sigma, Ref.: M4263). En aquests experiments es van mantenir constants les concentracions de palmitoil-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 mitjançant el programa de *SigmaPlot* (12.0).

14.4. K_m i V_{max} per Palmitoil-CoA

La constant d'afinitat pel palmitoil-CoA (K_m) es va obtenir assajant mitocondris en presència de concentracions creixents de palmitoil-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 palmitoil-CoA per tal de mantenir la relació molar de 6.1:1 (palmitoil-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 (palmitoil-CoA). Les dades es van representar en una corba hiperbòlica per obtenir els valors de K_m i V_{max}.

14.5. 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 palmitoil-CoA va resultar superior a l'obtinguda en els assaigs de carnitina, tot i que teòricament la V_{max} d'una CPT1 assajada hauria de ser la mateixa encara que variïn les concentracions dels substrats. Aquesta variació és deguda al canvi en la relació molar palmitoil-CoA:albúmina que es dona en els assaigs de K_m per palmitoil-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 palmitoil-CoA lliure en aquestes reaccions fos superior i per tant la V_{max} també.

15. Experimentació animal

En aquest treball s'han utilitzat ratolins C75BL6/J per a l'obtenció de proteïna total o bé d'RNA de cervell total, com també d'hipotàlem i hipocamp. Els animals van ser generalment sacrificats per desnucació en el *zeitgeber* time 3 (ZT3), és a dir, tres hores després de l'inici de la fase lluminica, que es correspon amb les 8h del matí.

Per a la realització dels experiments amb animals dejunats, s'utilitzaren ratolins de 10 setmanes, dividits en 2 grups experimentals amb 5 animals per grup: alimentats *ad libitum* i dejunats, als quals se'ls retirà l'aliment al ZT12. En cas d'un dejuni de 24h, es sacrificà els animals al ZT12, és a dir, a l'inici de la fase fosca, que es correspon amb les 8h del vespre; si el dejuni era de només 15h, aquests van ser sacrificats al ZT3.

16. Anàlisi estadístic

Les dades es mostren com a mitjanes experimentals \pm desviació estàndard. En els assajos de reporter es realitzaren almenys tres experiments independents per duplicat; en els assajos d'activitat CPT1 van ser almenys tres assajos diferents d'almenys dues obtencions mitocondrials diferents, a menys que s'indiqui el contrari.

Per a l'anàlisi dels valors s'utilitzà el *software* d'estadística SPSS, aplicant la prova *t* d'Student, i considerant que un nivell de probabilitat de $p < 0.05$ era estadísticament significatiu.

RESULTATS

RESULTATS

Els resultats d'aquesta tesi doctoral s'agrupen en tres blocs diferenciats, coincidint amb els tres isotips del gen *Carnitina palmitoiltransferasa (CPT1)* descrits fins al moment: CPT1A, CPT1B i CPT1C.

Des del seu clonatge i expressió en llevat ara fa ja dues dècades aproximadament (Esser, Britton et al. 1993; Zhu, Shi et al. 1997), s'han dut a terme nombrosos estudis amb l'objectiu de descriure l'existència de determinants moleculars que modulen la sensibilitat dels enzims CPT1A (Shi, Zhu et al. 1998; Dai, Zhu et al. 2000; Jackson, Cameron et al. 2000; Jackson, Zammit et al. 2000; Nicot, Relat et al. 2002; Morillas, Gómez-Puertas et al. 2003; Napal, Dai et al. 2003) i CPT1B (Shi, Zhu et al. 2000; Zhu, Shi et al. 2003; Relat, Nicot et al. 2004) pel malonil-CoA, l'inhibidor fisiològic de CPT1. Els resultats mostrats en aquest treball van en aquesta mateixa direcció. L'expressió heteròloga de les proteïnes CPT1 en el llevat *Pichia pastoris*, mancat de sistema CPT endogen, va permetre caracteritzar-ne els paràmetres cinètics.

CPT1C és l'isotip més recentment descrit de CPT1 (Price, van der Leij et al. 2002). A l'inici del nostre estudi hi havia molt poca informació relacionada amb la seva regulació transcripcional, com tampoc determinada la seva funció. Es coneix que s'expressa gairebé exclusivament en cervell i que uneix malonil-CoA, però s'han descrit estudis contradictoris sobre la seva distribució subcel·lular (Dai, Wolfgang et al. 2007; Sierra, Gratacós et al. 2008) i funció fisiològica (Zaugg, Yao et al. 2011). D'aquí el gran interès pel seu estudi. En aquest treball, es van dur a terme diferents aproximacions experimentals amb l'objectiu d'estudiar-ne la regulació transcripcional, així com la seva activitat enzimàtica, estructura i isoformes existents.

I. CARACTERITZACIÓ ENZIMÀTICA DE LA CPT1A DE RATA

En la seqüència aminoacídica de l'enzim CPT1 s'ha descrit l'existència de determinants moleculars que juguen un paper clau en el manteniment de l'activitat catalítica de l'enzim així com en la seva sensibilitat a l'inhibidor fisiològic malonil-CoA. En aquest treball s'entén per determinant molecular aquella característica fisicoquímica d'una proteïna que, en modificar-la, produeix canvis en la seva funció.

Com ja s'ha explicat a la Introducció, s'han descrit els primers 18 residus de la CPT1A de rata com un determinant positiu de sensibilitat al malonil-CoA, mentre que la regió des de l'aminoàcid 19 fins al 30 funciona com un determinant negatiu, responsable de la menor

RESULTATS

sensibilitat al malonil-CoA que presenten els isotips hepàtics respecte els musculars. A més a més, s'ha identificat que les posicions Glu⁵⁹⁰ i Met⁵⁹³ de l'extrem carboxil de la CPT1A de rata tenen un paper important per la sensibilitat a l'inhibidor, a més d'interaccionar amb el centre catalític de la proteïna. En aquest sentit, diferents autors havien plantejat la hipòtesi que la sensibilitat al malonil-CoA d'aquest enzim era resultat de la interacció entre els extrems amino- i carboxiterminal de la proteïna (Shi, Zhu et al. 1998; Shi, Zhu et al. 1999; Jackson, Zammit et al. 2000; Nicot, Relat et al. 2002).

Amb aquests antecedents, ens vam proposar identificar possibles interaccions entre els primers 18 residus de la regió aminoterminal i els residus Glu⁵⁹⁰ i Met⁵⁹³ de l'extrem carboxil de la CPT1A de rata que poguessin ser responsables del grau de sensibilitat al malonil-CoA de l'enzim. En col·laboració amb el laboratori del Dr. Gebre Woldegiorgis, es van generar una bateria de construccions, que combinaven la deleció dels primers 18 residus ($\Delta 18$) amb mutacions puntuals simples i dobles de l'extrem C-terminal (E590A, M593A).

1. Els primers 18 residus de l'extrem aminoterminal de l'enzim CPT1A de rata exerceixen un efecte dominant en determinar la sensibilitat al malonil-CoA respecte les posicions Glu⁵⁹⁰ i Met⁵⁹³.

Es van expressar les construccions *wild-type*, E590A, M593A, $\Delta 18$, $\Delta 18$ +E590A, $\Delta 18$ +M593A, E590A+M593A i $\Delta 18$ +E590A+M593A *Rat* CPT1A en *P. pastoris* (Mètodes, apartat 13), i es seleccionaren aquells clons amb nivells d'expressió similars als obtinguts per l'enzim *wild-type*. Com a control negatiu, es transformà la mateixa soca amb el vector buit pHWO10, vector on es trobaven clonats la resta de cDNAs. (Figura R.1).

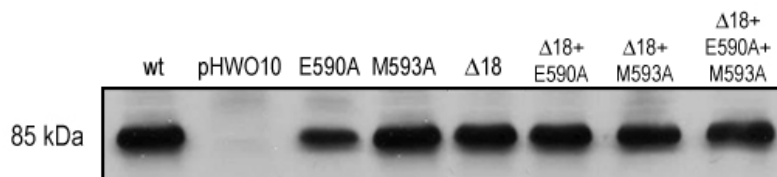


Figura R.1. Anàlisi per *Western blot* dels nivells d'expressió dels mutants de *Rat* CPT1A estudiats, en comparació amb l'enzim *wild-type*. 10 μ g de proteïna mitocondrial del llevat *P. pastoris* soca GS115 transformat amb diferents construccions de l'enzim *Rat* CPT1A van ser carregats en un gel d' SDS-acrilamida al 8% i immunodetectats amb l'anticòs anti-CPT1 (#139). wt, *Rat* CPT1A *wild-type*.

Tal com mostra la taula R.1, tots els constructes generats foren proteïnes actives. S'observaren variacions en l'activitat específica dels diferents enzims respecte el *wild-type*, però es considerà que aquestes no afectaven l'estudi de la sensibilitat al malonil-CoA, i que podrien

RESULTATS

ser degudes a diferències en els nivells basals d'expressió de cada mutant (Discussió, apartat l.1).

Construcció Rat CPT1A	Activitat (nmol/mg/min)
<i>Wild-type</i>	10.88±2.67
E590A	6.2±1.7
M593A	8.3
Δ18	5.3±0.84
E590A+M593A	14.2
Δ18+E590A	7.78±2.28
Δ18+M593A	6.09±2.70
Δ18+E590A+M593A	8.7

Taula R1. Valors d'activitat CPT1 dels mutants de Rat CPT1A generats. 100µg d'extracte mitocondrial van ser assajats (Mètodes, apartat 14). S'obtingueren els valors d'almenys dos assajos diferents, i d'almenys dues obtencions mitocondrials diferents, excepte en els casos on no es mostra la desviació estàndard.

Amb l'objectiu d'estudiar l'efecte d'aquests canvis en la proteïna sobre la sensibilitat a l'inhibidor, es va determinar la IC₅₀ pel malonil-CoA dels diferents constructes (Mètodes, apartat 14.3). A la figura R.2 es mostren els valors obtinguts.

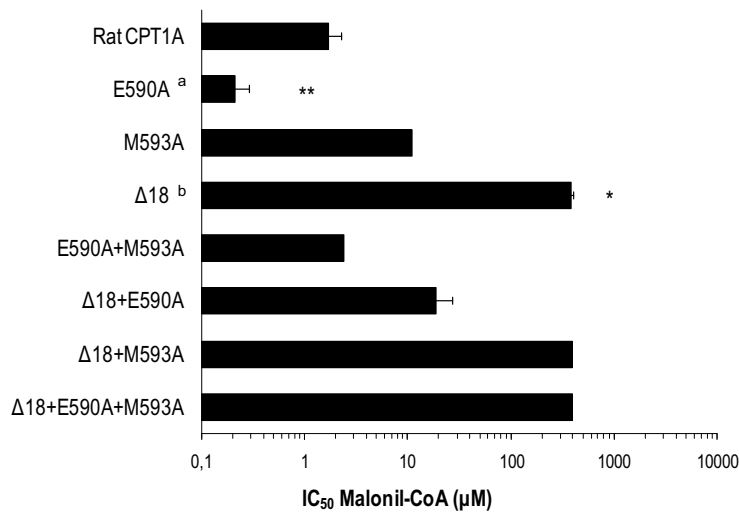


Figura R.2. Sensibilitat al malonil-CoA de les diferents construccions de Rat CPT1A estudiades. 100µg de proteïna mitocondrial van ser assajats amb concentracions creixents de malonil-CoA. S'obtingueren els valors d'almenys dos assajos diferents, i d'almenys dues obtencions mitocondrials diferents, excepte en els casos on no es mostra la desviació estàndard. **p<0.01, *p<0.05, respecte el *wild-type*. ^a(Napal, Dai et al. 2003); ^b(Shi, Zhu et al. 1998).

A la figura R.2 s'observa que la sensibilitat dels enzims E590A Rat CPT1A i M593A Rat CPT1A al malonil-CoA van ser major (IC₅₀=0.21µM) i menor (IC₅₀=11µM) que l'enzim *wild-type*, respectivament. La combinació en un mateix constructe d'ambdues mutacions puntuals resultà

RESULTATS

en un enzim amb una IC_{50} intermitja entre els valors dels dos mutants simples (E590A+M593A *Rat* CPT1A, $IC_{50}=2.4\mu M$). Aquest resultat indicava que les dues mutacions puntuals, amb efectes contraris sobre la sensibilitat al malonil-CoA, es compensaven en el doble mutant, i per tant actuaven de manera independent i no estaven interaccionant entre elles.

A més a més, s'observà que la deleció dels primers 18 residus de la proteïna produïa en tots els casos un enzim menys sensible a la inhibició per malonil-CoA, exercint un paper dominant sobre la mutació de les posicions Glu⁵⁹⁰ i Met⁵⁹³ (Figura R.2). Malgrat això, la mutació E590A era capaç de revertir en part aquest efecte dominant ($\Delta 18$ +E590A *Rat* CPT1A, $IC_{50}=18.84\mu M$), i presentà una sensibilitat intermitja entre els dos mutants simples $\Delta 18$ *Rat* CPT1A ($IC_{50}=380\mu M$) i E590A *Rat* CPT1A, suggerint de nou que ambdós canvis de la seqüència exercien el seu efecte sobre la sensibilitat al malonil-CoA de manera independent.

Així, ambdós enzims $\Delta 18$ +M593A *Rat* CPT1A i el triple mutant $\Delta 18$ +E590A+M593A *Rat* CPT1A resultaren ser gairebé insensibles a la inhibició per malonil-CoA ($IC_{50}>400\mu M$), corroborant l'observació d'un efecte dominant de la deleció dels primers 18 residus de la proteïna sobre la sensibilitat a l'inhibidor.

Amb els resultats obtinguts en aquest capítol podem dir que tant els primers 18 residus de l'extrem aminoterminal, com les posicions Met⁵⁹³ i Glu⁵⁹⁰ de la CPT1A de rata, tenen un paper fonamental en determinar la sensibilitat de l'enzim a l'inhibidor fisiològic malonil-CoA. Aquest efecte, però, no és fruit de la interacció física ni es dona de forma coordinada, sinó que cada determinant molecular l'exerceix de manera independent (Discussió, apartat I.1).

Amb posterioritat a aquests estudis es publicaren dos models tridimensionals *in silico* (Introducció, apartat III.3.1.4) per a la proteïna CPT1A humana (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007; Rao, Warren et al. 2011) que confirmaren i validaren els resultats d'aquest capítol (Discussió, apartat I.1).

II. ESTUDI DE DETERMINANTS MOLECULARS DE CPT1B

L'isotip muscular de la CPT1 humana (CPT1B) es diferencia de l'hepàtic (CPT1A) per ser altament sensible al malonil-CoA, amb una $IC_{50}=0.069\mu M$ (Zhu, Shi et al. 1997). D'aquest isotip, s'ha descrit la regió aminoterminal (residus 18-28) com a un determinant positiu responsable de l'alta sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA, donat que la deleció d'aquesta regió produeix una proteïna menys sensible a l'inhibidor. D'altra banda, els primers 18 residus de l'isotip muscular no tenen el mateix efecte que la mateixa regió de les CPT1A de rata i porc com a determinant positiu de la sensibilitat al malonil-CoA, suggerint que aquesta regió presenta un rol diferent per ambdós isotips (Shi, Zhu et al. 2000).

L'enzim CPT1B de porc, però, tot i ser un isotip muscular, té unes característiques cinètiques semblants a les de l'isotip hepàtic, presentant així una baixa sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA ($IC_{50}=0.906\mu M$) (Relat, Nicot et al. 2004). A continuació es mostren els experiments realitzats amb l'objectiu d'investigar l'existència d'un determinant negatiu a l'extrem aminoterminal de la CPT1B de porc, que expliqui la baixa sensibilitat que aquest enzim presenta al malonil-CoA.

1. Anàlisi de determinants moleculars de la inhibició per malonil-CoA

1.1. Els primers 18 aminoàcids de la CPT1B de porc es comporten com un determinant positiu per a la sensibilitat al malonil-CoA

Es van generar les construccions $\Delta 18$ i $\Delta 28$ *Pig* CPT1B, on s'havien delectat els primers 18 i 28 aminoàcids de la seqüència, i s'expressaren de forma heteròloga en el llevat *P. pastoris* (figura R.3).

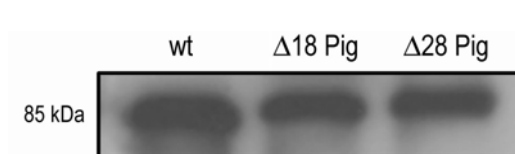


Figura R.3. Anàlisi per *Western blot* dels nivells d'expressió dels mutants $\Delta 18$ i $\Delta 28$ *Pig* CPT1B i l'enzim *wild-type* expressats en *P. pastoris*. 10 μ g de proteïna mitocondrial es separaren un gel d'SDS-acrilamida al 8% i foren immunodetectats amb l'anticòs anti-CPT1 (#139). wt, *Pig* CPT1B *wild-type*.

A la figura R.3 i a la taula R.2 es mostra que els constructes *Pig* CPT1B, $\Delta 18$ *Pig* CPT1B i $\Delta 28$ *Pig* CPT1B presenten un bon nivell d'expressió i d'activitat en el sistema heteròleg del llevat *P. pastoris*, de manera que es van obtenir mitocondris d'aquests transformants per calcular les diferents IC_{50} (Figura R.4).

RESULTATS

Construcció	Activitat (nmol/mg/min)
<i>Pig</i> CPT1B	2.79±1.9
<i>Human</i> CPT1B	4.43±2.98
Δ 18 <i>Pig</i> CPT1B	15.28±7.84
Δ 28 <i>Pig</i> CPT1B	9.42±6.31
H50P	9.43±2.71
H128P	10.59±5.36
P50H	4.49±1.70
P128H	4.16±2.86
<i>Human</i> D17E	3.53±0.95
<i>Pig</i> E17D	4.57±0.52

Taula R.2. Valors d'activitat CPT1 dels mutants i quimeres de *Human* i *Pig* CPT1B generats. 100µg d'extracte mitocondrial van ser assajats. S'obtingueren els valors d'almenys tres assajos diferents, i d'almenys tres obtencions mitocondrials diferents \pm desviació estàndard.

Com es mostra a la figura R.4, el mutant Δ 18 presentà una sensibilitat molt més baixa al malonil-CoA que l'enzim *wild-type* (IC_{50} =35.56µM vs. 0.804µM del *wt*), suggerint que aquesta regió es comporta com un determinant positiu per la inhibició, com en el cas de la CPT1A de rata. D'altra banda, la deleció dels primers 28 residus de l'enzim resultà en un enzim tan poc sensible a l'inhibidor com l'anterior constructe (IC_{50} =39.19µM), fet que indica que la baixa sensibilitat característica de la CPT1B de porc no és deguda a la presència d'un determinant negatiu entre els residus 19 i 28 de la regió N-terminal de la proteïna.

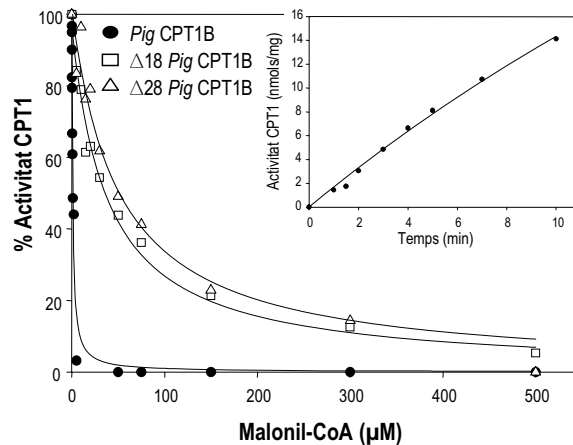
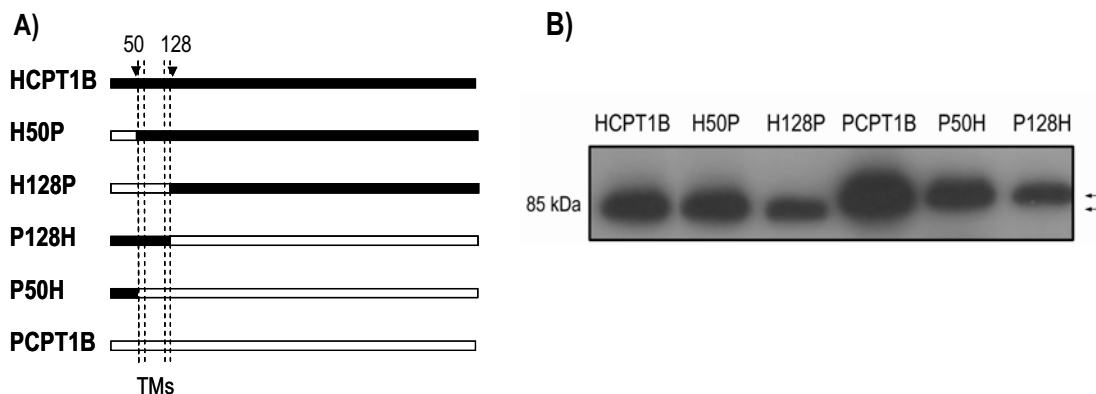


Figura R.4. Sensibilitat al malonil-CoA dels mutants Δ 18 i Δ 28 *Pig* CPT1B, respecte l'enzim *wild-type*. (●), *Pig* CPT1B *wild-type*; (△), Δ 18 *Pig* CPT1B; (□), Δ 28 *Pig* CPT1B. 100µg de proteïna mitocondrial van ser assajats amb concentracions creixents de malonil-CoA. A l'interior, cinètica de l'enzim *Pig* CPT1B en funció del temps. Es mostra una corba representativa de cada construcció.

RESULTATS

1.2. L'intercanvi de la regió N-terminal entre els enzims CPT1B humà i de porc afecta la sensibilitat al malonil-CoA

Per tal d'estudiar l'efecte global de la regió aminoterminal de CPT1B sobre la sensibilitat al malonil-CoA, es varen construir quatre quimeres intercanviant els primers 50 (abans del primer fragment transmembrana de la proteïna) i 128 residus (just després del segon transmembrana) entre les proteïnes humana i de porc. Així, s'obtingueren les construccions H50P i H128P, combinació dels primers 50 o 128 aminoàcids, respectivament, de l'enzim de porc amb la proteïna humana, i viceversa, per les construccions P50H i P128H (Figura R.5A i Taula R.2).



L'anàlisi per *Western blot* anti-CPT1 de les quimeres generades i expressades en llevat mostrà, com ja s'havia descrit anteriorment pels isotips hepàtics, que la migració electroforètica de l'enzim *Pig* CPT1B és diferent que la de *Human* CPT1B (Nicot, Hegardt et al. 2001). S'observà també que les quimeres H50P i H128P presentaven la mateixa mobilitat que l'enzim *Human* CPT1B wild-type, i les quimeres P50H i P128H presentaven la mobilitat corresponent a *Pig* CPT1B (Figura R.5B).

Tal com s'observa a la figura R.6, l'estudi del paràmetre IC_{50} indicà que la sensibilitat a l'inhibidor d'aquests enzims ve marcada per la regió N-terminal de la proteïna, donat que els primers 50 aminoàcids de la seqüència humana produïen un enzim CPT1B de porc més sensible a l'inhibidor que el wild-type (quimera P50H). De la mateixa manera, els primers 128 residus de la proteïna de porc produïen un enzim CPT1B humà menys sensible a la inhibició per malonil-CoA (quimera H128P).

RESULTATS

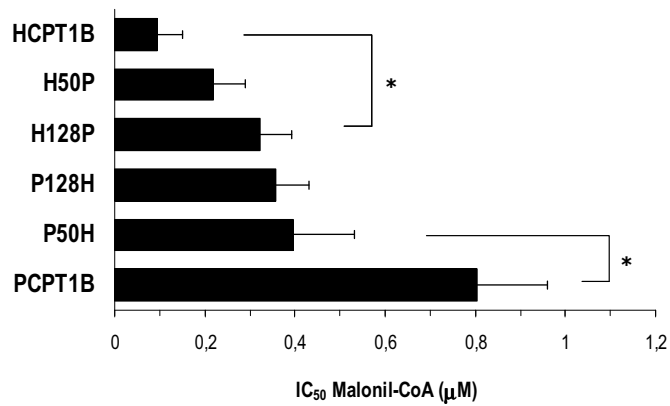


Figura R.6. Sensibilitat al malonil-CoA de les quimeres de *Human* i *Pig* CPT1B estudiades. 100µg d'extracte mitocondrial s'assajaren amb concentracions creixents de malonil-CoA per tal de determinar-ne la IC₅₀. Es mostra la mitjana de tres experiments amb almenys dues obtencions mitocondrials diferents ± desviació estàndard. *p<0.05, respecte l'enzim *wild-type* corresponent.

1.3. La posició Glu¹⁷ és responsable en part de la major sensibilitat al malonil-CoA de la CPT1B de porc.

L'alineament dels primers 50 aminoàcids dels enzims CPT1B de diferents espècies mostra dues úniques substitucions entre la seqüència humana i de porc: aspartat per glutamat a la posició 17, i valina per isoleucina a la posició 31, tot i que el residu 17 és l'únic que manté la diferència quan, a més, es compara amb la seqüència de rata (Figura R.7).

	10	20	30	40	50
	MAEAHQAVAF	QFTVTP	G-D-RLS-EAL	YLSG--SWKK--	IR-KNGI
PigB	-----	E -V-F--R--	KHI----	IN----	RL--I----
HumanB	-----	D -V-F--R--	KHV----	IN----	RL--I----
RatB	-----	D-V-F--R--	RHI----	IN----	RL--I----
MouseB	-----	D-V-F--R--	RHI----	IN----	RL--I----
PigA	-----	D-I-L--H--	RQI----	LH----	KF--F----
HumanA	-----	D-I-L--H--	RQI----	LH----	KF--F----
RatA	-----	D-I-L--H--	KQI----	LH----	KF--F----
MouseA	-----	D-I-L--H--	KQI----	LH----	KF--F----

Figura R.7. Els primers 50 residus de CPT1 es troben altament conservats entre els isotips A i B de porc, humà, rata i ratolí. Alineament dels primers 50 aminoàcids de les seqüències proteiques dels isotips hepàtic i muscular dels enzims CPT1 de porc, humà, rata i ratolí. A la part superior, seqüència consens, on els guions indiquen les posicions no conservades. En negreta, les posicions mutades en aquest treball.

Així, per tal de comprovar si la posició Glu¹⁷ és la responsable de la diferència en la sensibilitat de la CPT1B de porc al malonil-CoA, es van crear els mutants *Pig* E17D CPT1B i *Human* D17E CPT1B. S'expressaren en *P. pastoris*, obtenint dos enzims amb nivells d'expressió i activitat específica similars als corresponents enzims *wild-type* (Figura R.8 i Taula R.2).

RESULTATS



Figura R.8. Anàlisi per *Western blot* anti-CPT1 dels mutants de *Human* i *Pig* CPT1B i els corresponents enzims *wild-type* expressats en *P. pastoris*. 10µg d'extracte mitocondrial es van separar en un gel d'SDS-acrilamida al 8% i van ser immunodetectats amb l'anticòs anti-CPT1 (#139).

Tal com mostra la figura R.9, la mutació E17D produí un enzim CPT1B de porc més sensible a la inhibició pel malonil-CoA ($IC_{50}=0.297$ respecte $0.804\mu\text{M}$) i menor afinitat pel substrat carnitina que l'enzim *wild-type* ($K_m=605.9$ respecte $197.5\mu\text{M}$), aproximant-lo a l'enzim CPT1B humà i per tant a una CPT1B típica. D'altra banda, la mutació D17E resultà en una disminució en la sensibilitat (encara que no significativa) de la CPT1B humana per l'inhibidor ($IC_{50}=0.279$ respecte $0.096\mu\text{M}$), tot i que no n'alterà l'afinitat per la carnitina.

Els resultats indicaven, doncs, que la posició Glu¹⁷ de l'enzim CPT1B de porc és en part la responsable de les peculiars característiques cinètiques que presenta si es comparen amb l'enzim humà, i que, mentre aquest residu actua com un determinant negatiu de la inhibició per malonil-CoA, la posició Asp¹⁷ es comporta com un determinant positiu de l'enzim CPT1B humà.

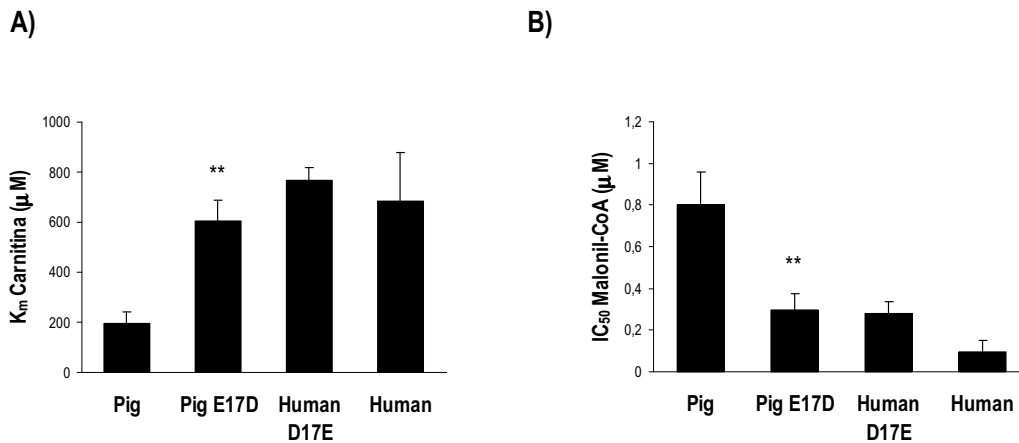


Figura R.9. Afinitat per la carnitina i sensibilitat al malonil-CoA dels mutants *Human* D17E CPT1B i *Pig* E17D CPT1B. A) Valors de K_m per carnitina dels enzims *wild-type* i mutants expressats en *P. pastoris*. B) Valors d' IC_{50} per malonil-CoA obtinguts per les mateixes construccions, assajats a les concentracions de carnitina corresponents a la K_m de cada enzim. Es mostra la mitjana de tres experiments amb almenys dues obtencions mitocondrials diferents \pm desviació estàndard. ** $p<0.01$, respecte el *wild-type*.

RESULTATS

2. Estructura tridimensional de l'enzim CPT1B humà *in silico*

Per tal d'entendre millor el mecanisme pel qual el residu 17 de l'enzim CPT1B exercia aquest efecte sobre la sensibilitat a l'inhibidor, ens vam proposar situar-lo en el model 3-D de CPT1 publicat més recentment, corresponent a la CPT1A humana (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007). El fet que aquest residu no es trobés mirant a la regió carboxiterminal de l'enzim com esperàvem, sinó a la cara contrària, ens va fer plantejar dues hipòtesis: 1) la diferència de seqüència entre ambdós isotips -principalment en les regions TM i carboxiterminal- feia que el plegament de la proteïna fos diferent entre isotips, o bé 2) el residu 17 podria estar interaccionant amb una unitat adjacent de CPT1 en cas que es formés un complex oligomèric, com s'havia predit en els últims estudis d'estructura de l'enzim (Faye, Esnous et al. 2007; Jenei, Borthwick et al. 2009).

Per tal de determinar quina de les dues hipòtesis responia als nostres resultats, ens vam proposar crear una predicció estructural *in silico* de l'enzim CPT1B humà en base a l'últim model publicat. Per dur-la a terme, vam establir una col·laboració amb el grup de Biologia Computacional i Disseny de Fàrmacs de la Facultat de Farmàcia, liderat pel Dr. Francisco Javier Luque.

2.1. Model estructural preliminar

El fet que la CPT1 sigui una proteïna altament associada a la membrana mitocondrial n'ha dificultat la cristal·lització. Per això, les estructures 3-D de la proteïna descrites fins al moment s'han obtingut per homologia amb cristalls de proteïnes solubles de la família de les carnitina aciltransferases. En primer lloc, s'intentà reproduir el modelatge realitzat en aquest treball [(López-Viñas, Bentebibel et al. 2007), estructura no disponible a la base de dades *Protein Data Bank*], considerant a més les nostres observacions sobre el residu 17.

El plegament de la regió carboxiterminal (corresponent als residus 167 al 772 de la seqüència de la CPT1B humana) s'obtingué per homologia amb les estructures dels enzims COT de ratolí (entrada 1XL8, del *Protein Data Bank*) (Jogl, Hsiao et al. 2005) i CPT2 de rata (entrada 2H4T, del *Protein Data Bank*) (Hsiao, Jogl et al. 2006), on la identitat de seqüència incloent canvis positius és del 50%. Igualment, donada l'elevada identitat de seqüència entre els primers 50 residus dels enzims CPT1A i CPT1B humans (90%, incloent canvis positius), s'emprà la mateixa estructura utilitzada en aquest treball per al modelatge de la regió aminoterminal,

RESULTATS

corresponent al factor de transcripció IIIa de *Xenopus laevis* (entrada 1TF3, del *Protein Data Bank*), organitzada en quatre fulles beta i una hèlix alfa.

Per a la predicció de possibles interaccions intramoleculares entre la regió amino- i carboxiterminal que poguessin determinar la sensibilitat al malonil-CoA, es van emprar successives minimitzacions d'energia, traslladant i rotant lliurement en l'espai la regió N-terminal respecte la C-terminal, mitjançant el programa AMBER. De totes les posicions possibles, s'escollí la més estable que, com en el model més recent de CPT1A, localitzés la regió aminoterminal propera al lloc d'unió "A" de la regió carboxiterminal, on acil-CoA i malonil-CoA competeixen per entrar al túnel catalític (Introducció, apartat III.3.1.4). Alhora, s'escollí aquella en què els residus Asp¹⁷, Glu²⁶, Lys⁵⁶¹, Arg²⁴³ i Ala⁴⁷⁸ poguessin intervenir en la unió de l'inhibidor a l'enzim, ja que havien estat descrits com a residus clau en la inhibició de l'enzim pel malonil-CoA (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007; Relat, Pujol-Vidal et al. 2009).

Segons el model construït pels extrems amino- i carboxiterminal, els parells de residus Asp¹⁷ i Lys⁵⁶¹, Arg²² i Glu⁴³³, Arg²⁵ i Glu⁵⁰⁰ estarien interaccionant. Per tal de validar aquest model, i amb l'objectiu final de realitzar experiments de *swapping* intercanviant les càrregues dels residus entre ells, es van generar i expressar mutants simples d'aquestes posicions en *P. pastoris*: D17K, R25E, E433R, E500R i K561D *Human CPT1B* (Figura R.10), obtenint-se bons nivells d'expressió i enzims actius en tots els casos.

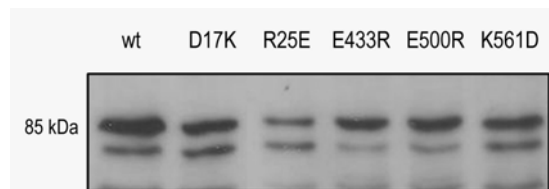


Figura R.10. Anàlisi per Western blot anti-CPT1 dels mutants D17K, R25E, E433R, E500R i K561D *Human CPT1B* i l'enzim *wild-type* expressats en *P. pastoris*. 10µg d'extracte mitocondrial es van separar en un gel d' SDS-acrilamida al 8% i van ser immunodetectats amb l'anticòs anti-CPT1 (#139); wt, *Human CPT1B wild-type*.

La determinació dels paràmetres IC₅₀ i K_m per la carnitina qüestionaven el model proposat, donat que no s'observaren diferències en la sensibilitat a l'inhibidor malonil-CoA o en l'afinitat pel substrat carnitina en cap dels mutants analitzats respecte l'enzim *Human CPT1B wild-type* (Taula R.3).

RESULTATS

Construcció <i>Human CPT1B</i>	Activitat CPT1 (nmol/mg/min)	IC ₅₀ Malonil-CoA (μM)	K _m Carnitina (μM)
<i>Wild-type</i>	6.41±0.24	0.096±0.057 ^a	666
D17K	4.07±0.29	0.057±0.030	600.43±1.46
R22E	ND	ND	ND
R25E	2.72±0.10	0.036±0.019	610.81
E433R	6.04±1.10	0.081±0.037	ND
E500R	5.84±0.17	0.082±0.025	528.71
K561D	7.02±0.70	0.084±0.037	688.82

Taula R.3. Taula comparativa dels valors d'activitat, sensibilitat al malonil-CoA i afinitat per la carnitina dels mutants de *Human CPT1B* i l'enzim *wild-type*. 100μg d'extracte mitocondrial van ser assajats amb concentracions creixents de malonil-CoA per determinar-ne la IC₅₀, o amb concentracions creixents de carnitina per determinar-ne la K_m. S'obtingueren els valors d'almenys dos assajos diferents, i d'almenys dues obtencions mitocondrials diferents, excepte en els casos on no es mostra la desviació estàndard. ND, no determinat. ^a(Relat, Pujol-Vidal et al. 2009).

Com a fet rellevant, cal destacar que la solució més estable del *docking* situava la regió aminoterminal propera al lloc "O", d'unió exclusiva pel malonil-CoA, contrastant amb el model de CPT1A, de López-Viñas i col·laboradors. Aquesta solució de *docking* invalidaria les interaccions aquí proposades i explicaria per tant que les mutacions introduïdes no afectin la sensibilitat al malonil-CoA de CPT1B.

2.2. Model revisat de la interacció entre les regions amino- i carboxiterminal

A continuació ens vam proposar construir un model 3-D de l'enzim CPT1B humà que expliqués millor el plegament de la regió aminoterminal de l'isotip muscular. A diferència de l'anterior aproximació, a més a més, es forçà el modelatge amb el programa *Haddock*, que permet introduir restriccions en la cerca configuracional lligades a evidències experimentals.

Per al modelatge de la regió carboxiterminal (residus 169 al 766), es partí de l'estructura de *Rat CPT2* (entrada 2H4T, del *Protein Data Bank*) (Hsiao, Jogl et al. 2006), seguint el model anterior. Per a la regió aminoterminal (residus 1 al 50), s'utilitzà el servidor *FFAS* que cerca entre estructures anteriorment anotades que comparteixin una alta identitat de seqüència amb la seqüència problema, en aquest cas, els primers 54 residus de la CPT1B humana, que corresponen a la regió aminoterminal citosòlica de l'enzim. S'escolliren les estructures corresponents a les entrades 1TF3, 1TWY i 3CNW de la base de dades *Protein Data Bank*, que compartien un 15-27% d'identitat de seqüència amb l'enzim.

RESULTATS

A continuació, i mitjançant el programa *Swissmodel*, es realitzà una predicció estructural del plegament de la regió aminoterminal de CPT1B, comparant-lo amb el plegament de les estructures escollides. D'altra banda, l'anàlisi amb el software *Phyre* indicà que l'estructura secundària més probable era una hèlix alfa dels residus 25 al 50 i dues fulles beta compreses en la regió de residus 1-25, diferint per tant del model estructural emprat en el model anterior. En base a les dades anteriors, s'escollí com a opció de plegament la corresponent a l'estructura 3CNW, la única que presentava una hèlix alfa més llarga.

Tot seguit s'utilitzaren els servidors *Pydock* i *ClusPro* per fer el *docking* entre la regió helicoïdal de l'extrem amino- amb la regió carboxitèrminal de CPT1B. Ambdós servidors coincidiren en la possibilitat de localitzar la regió aminoterminal al lloc d'unió competitiva entre l'inhibidor i l'acil-CoA. Cal remarcar que aquest model complia dues evidències experimentals descrites: 1) la interacció entre els residus Glu²⁶ i Lys⁵⁶¹, que afecta la sensibilitat a l'inhibidor de la CPT1A de rata (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007), i 2) una lisina de la regió N-terminal (40-47) interacciona amb una cisteïna de la regió C-terminal, trobant-se a una distància d'uns 16Å (Faye, Borthwick et al. 2005). Segons el nostre model, aquesta última interacció es podria donar amb la Cys⁵⁰⁴. Per tal de validar aquesta predicció, s'emprà el software *Haddock*, restringint el *docking* proteïna-proteïna en considerar les evidències experimentals esmentades com a condicions a satisfer en el model predit. Novament, la predicció obtinguda localitzava la regió N-terminal en una disposició molt semblant a la predita sense restriccions (Figura R.11).

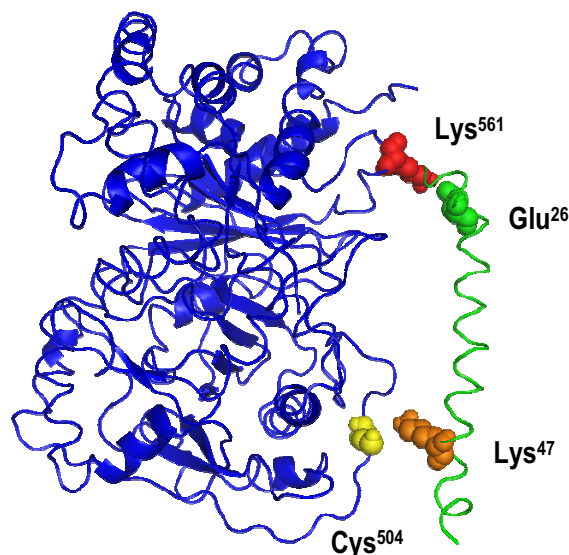


Figura R.11. Nova proposta de model 3-D de la CPT1B humana. Representació en forma de cintes dels residus (167-773) que formen l'esquelet de la regió C-terminal de la CPT1B humana (blau) formant un complex amb un nou model de l'extrem aminoterminal (verd), basat en l'estructura 3CNW. S'indiquen en esferes les interaccions que presenta el model.

RESULTATS

D'altra banda, les solucions obtingudes amb *Pydock* indicaren de nou una segona solució de *docking*, en què l'extrem N-terminal estaria interaccionant al lloc d'unió al·lostèrica i d'alta afinitat al malonil-CoA, anomenat lloc "O" en l'últim model de CPT1A. Aquest resultat concordaria amb el posterior model de Rao i col·laboradors, on també es contemplà la localització de l'extrem N-terminal a ambdós llocs d'unió al malonil-CoA (Introducció, apartat III.3.1.4). Tot i que aquest model podria explicar un efecte directe entre mutacions a l'extrem N-terminal i la unió del malonil-CoA, no hi ha dades experimentals que suportin la interacció en aquest segon lloc. A més a més, mentre que CPT1A oligomeritza, fet que podria explicar-se per la capacitat de l'extrem N-terminal d'unir-se a tots dos llocs d'unió, CPT1B no oligomeritza (Dr. Victor Zammit, comunicació personal) i això qüestiona la capacitat de mantenir una interacció efectiva de l'extrem N-terminal en aquest segon lloc d'unió. En conseqüència, sembla més adient excloure aquesta possible interacció en absència de dades experimentals més concloents.

L'anàlisi del model construït de la CPT1B humana amb l'extrem N-terminal proper al lloc d'unió "A", competitiu amb l'acil-CoA, indicà que les posicions Lys⁴⁰, Lys⁴¹, Arg⁴⁵ i Lys⁴⁷, totes incloses en l'hèlix alfa abans mencionada, podrien ser crítiques per a l'entrada del malonil-CoA al túnel catalític de l'enzim. Així, s'expressaren en *P. pastoris* els mutants puntuals d'aquestes quatre posicions a aminoàcids amb càrrega neutra (alanina) i contrària (glutàmic) als residus originals, generant els enzims K40A, K40E, K41A, K41E, R45A, R45E, K47A i K47E *Human* CPT1B (Figura R.12).

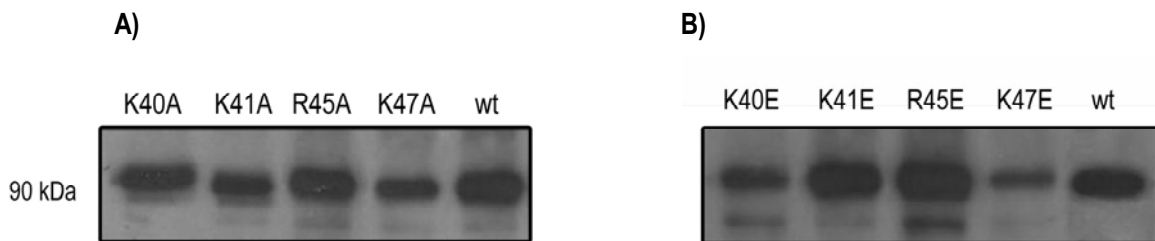


Figura R.12. Anàlisi per *Western blot* dels mutants de *Human* CPT1B i l'enzim *wild-type* expressats en *P. pastoris*. 10µg d'extracte mitocondrial es van resoldre en un gel d'SDS-acrilamida al 8% i van ser immunodetectats amb l'anticòs anti-CPT1 (#139). wt, *Human* CPT1B *wild-type*. A) Mutats a alanina. B) Mutats a glutàmic.

Tal com es mostra a la taula R.4, tots els enzims generats presentaven una activitat específica i sensibilitat al malonil-CoA similars a l'enzim *wild-type*, fet que impedia validar amb solidesa el model proposat per a la interacció de l'extrem N-terminal. De nou, en cas que la regió N-terminal es trobi propera al lloc "O" d'unió al malonil-CoA, es podria explicar l'absència d'efectes observats en els mutants generats sobre la sensibilitat a l'inhibidor.

RESULTATS

Construcció <i>Human CPT1B</i>	Activitat CPT1 (nmol/mg/min)	IC ₅₀ Malonil-CoA (µM)
<i>Wild-type</i>	3.23 ± 1.92	0.096 ± 0.057 ^a
K40A	1.54 ± 0.49	0.062 ± 0.003
K40E	1.40 ± 0.33	0.125 ± 0.031
K41A	1.21 ± 0.42	0.128 ± 0.005
K41E	2.58 ± 1.01	0.087 ± 0.019
R45A	2.51 ± 0.45	0.027 ± 0.014
R45E	1.41 ± 0.27	0.054 ± 0.018
K47A	2.45 ± 0.98	0.218 ± 0.017
K47E	4.11 ± 1.14	0.144 ± 0.012

Taula R.4. Taula comparativa dels valors d'activitat i sensibilitat al malonil-CoA dels mutants de *Human CPT1B* i l'enzim *wild-type*. 100µg d'extracte mitocondrial van ser assajats amb concentracions creixents de malonil-CoA per determinar-ne l'activitat específica i la IC₅₀ d'inhibició pel malonil-CoA. Es mostra la mitjana de dos experiments diferents de mínim dues obtencions mitocondrials diferents ± desviació estàndard. ^a(Relat, Pujol-Vidal et al. 2009)

Així doncs, la mutació dels residus predits pel model 3-D com a crucials per a l'entrada de l'inhibidor, no provocà en cap cas canvis en la sensibilitat de l'enzim al malonil-CoA. Tot i això, no es pot descartar que aquestes siguin posicions importants en el *docking* de l'extrem aminoterminal amb la regió carboxiterminal de l'enzim CPT1B humà.

III. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE *Cpt1c* I ESTUDI DE LA PROTEÏNA

CPT1C és l'isotip més recentment descrit de CPT1, s'expressa gairebé de forma exclusiva en el SNC (Price, van der Leij et al. 2002), i encara avui se'n desconeix la seva funció, existeix controvèrsia respecte a la seva distribució subcel·lular i no se n'han descrit els mecanismes que en regulen l'expressió.

En el moment d'iniciar aquest treball, les dades publicades suggerien que CPT1C podria ser un intermediari en l'efecte del malonil-CoA hipotalàmic sobre el control de la ingesta, ja que els ratolins KO de *Cpt1c* presenten: una menor β -oxidació global en resposta al dejuni, evidenciant un efecte sistèmic d'alteracions a nivell central de l'expressió d'aquest gen, un menor pes corporal i ingesta que els ratolins *wild-type* (Wolfgang, Kurama et al. 2006) i alhora se sap que CPT1C és capaç d'unir malonil-CoA (Price, van der Leij et al. 2002). De tota manera, un segon model KO de *Cpt1c*, generat en una estratègia experimental i un *background* genètic diferents, no mostrà canvis en el pes ni la ingesta dels animals respecte l'animal *wild-type* (Gao, Chen et al. 2009).

1. Estudi de la regulació transcripcional del gen *Cpt1c*

Donat que els nuclis hipotalàmics tenen un paper fonamental en el manteniment de l'homeòstasi energètica, es van analitzar els canvis en els nivells endògens del gen *Cpt1c* davant diferents situacions i estímuls mitjançant diferents aproximacions experimentals.

1.1. *Cpt1c* no és regulat pel dejuni

Per tal d'estudiar l'efecte del dejuni sobre l'expressió del gen, s'analitzaren els nivells d'mRNA en l'hipotàlem de ratolins adults dejunats durant 24 hores (Figura R.13). S'estudià també, i a nivell comparatiu, l'expressió dels gens *Cpt1a* i *Hmgcs2*, gens clau en el metabolisme dels àcids grassos, dels quals ja se n'havia estudiat el comportament en resposta al dejuni en cervell (König, Rauer et al. 2009).

RESULTATS

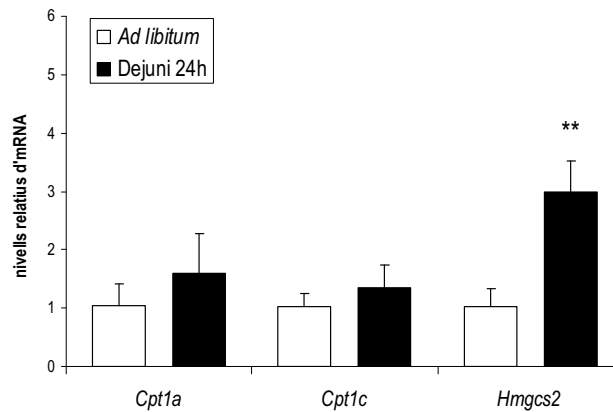


Figura R.13. Efecte del dejuni sobre l'expressió del gen *Cpt1c* en hipotàlem de ratolins. Es van dejenar ratolins C57BL6/J de 10 setmanes durant 24h, i es compararen els nivells d'expressió dels gens *Cpt1a*, *Cpt1c* i *Hmgcs2* amb els animals alimentats *ad libitum*. Els ratolins van ser sacrificats al ZT12. S'obtingué l'RNA total de l'hipotàlem i es va retrotranscriure 1µg a cDNA, 100ng del qual es van analitzar per qRT-PCR. Es mostren valors de la inducció dels nivells d'mRNA missatger (normalitzats amb els nivells d'expressió del gen 18S) respecte els ratolins *ad libitum* (mitjana de tres animals per grup experimental \pm desviació estàndard). ** $p < 0.01$, respecte els ratolins *ad libitum*.

Tal com s'observa a la figura R.13, no es detectaren canvis significatius en l'expressió dels gens *Cpt1a* i *Cpt1c* en l'hipotàlem dels ratolins dejenats, mentre que sí s'observà un augment d'aproximadament 3 vegades dels nivells d'expressió del gen *Hmgcs2*, resultats que confirmaren les observacions fetes en els mateixos gens en altres àrees del cervell (Discussió, apartat II.1).

1.2. La disminució del pes corporal observada en disminuir l'expressió del gen *Hmgcs2* en fetge no es correlaciona amb canvis en l'expressió del gen *Cpt1c*

En un estat de dejuni, el cervell consumeix cossos cetònics com a principal font d'energia, sintetitzats majoritàriament pel fetge (Morris 2005) i essent l'enzim clau de la via l'Hidroximetilglutaril-CoA Sintasa Mitocondrial (HMGCS2).

Durant la realització del treball que aquí es presenta es va generar en el laboratori un model experimental que consistia en el silenciament a nivell hepàtic del gen de la *Hmgcs2* mitjançant la injecció caudal d'un adenovirus que codificava per un shRNA específic del gen. 8 dies després de la injecció dels adenovirus els animals foren sotmesos a un dejuni de 15 hores i finalment es pesaren i se'n recollí el sèrum i s'analitzaren els nivells de cossos cetònics circulants totals.

Els ratolins als quals s'havia silenciat l'expressió de la *Hmgcs2* en fetge presentaren una disminució significativa dels nivells de cossos cetònics circulants. Com es mostra a la figura

RESULTATS

R.14A, aquests animals també mostraven una major pèrdua de pes corporal (17%) respecte els animals injectats amb l'adenovirus codificant per l'shRNA inespecífic (10%), i existia una clara correlació entre la pèrdua de pes corporal dels animals i els seus nivells de cossos cetònics circulants [(Vilà 2011), Tesi Doctoral].

En base a aquestes dades i considerant la possible existència d'una correlació entre l'expressió de *Cpt1c* i el pes corporal, vam analitzar els nivells d'mRNA de *Cpt1c* en l'hipotàlem d'aquests ratolins després del dejuni.

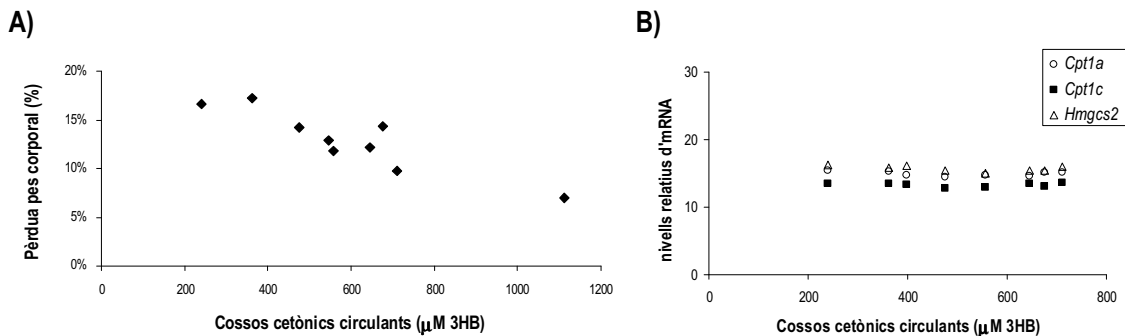


Figura R.14. Efecte de la disminució de l'expressió del gen *Hmgcs2* en fetge sobre l'expressió del gen *Cpt1c* en hipotàlem de ratolins dejunats. S'utilitzaren animals dejunats durant 15 hores on s'havia silenciat de forma aguda el gen de la *Hmgcs2* en fetge [(Vilà 2011), Tesi Doctoral]. A) Relació entre els cossos cetònics circulants i el percentatge de pèrdua de pes corporal dels animals. B) Relació entre els cossos cetònics circulants i els nivells d'mRNA dels gens indicats (normalitzats amb els nivells d'expressió del gen 18S).

A la figura R.14B s'observa que la disminució de cossos cetònics circulants no alterà l'expressió del gen *Cpt1c*, com tampoc dels gens *Cpt1a* i *Hmgcs2*, mostrant una manca de correlació entre la pèrdua de pes d'aquests animals i l'expressió hipotalàmica de *Cpt1c* (Discussió, apartat II.1).

Donat que l'hipotàlem és un teixit d'on es poden distingir varis tipus cel·lulars amb funcions i metabolismes diferents, existia la possibilitat que les variacions en els nivells d'expressió de la *Cpt1c* es donessin només en punts molts determinats i que aquestes variacions quedessin emmascarades en realitzar els assajos de missatge amb un *pool* de l'hipotàlem sencer. Per això, i considerant que s'havia demostrat l'expressió de *Cpt1c* en neurones (Dai, Wolfgang et al. 2007) ens vam proposar realitzar els estudis en un model neuronal més específic. El model escollit foren les cèl·lules Neuro2A, de neuroblastoma de ratolí, que expressen ambdós gens d'estudi, *Cpt1a* i *Cpt1c*, (Materials, apartat 3.1) i ja havia estat demostrat prèviament que són un bon model cel·lular d'estudi de la *Cpt1c* (Gao, Chen et al. 2009).

RESULTATS

1.3. La diferenciació de les cèl·lules Neuro2A no modifica l'expressió de Cpt1c

Per tal de comprovar el perfil d'expressió del gen *Cpt1c* durant el procés de diferenciació, s'induí la neurogènesi en cèl·lules Neuro2A, mitjançant la disminució en la concentració de sèrum en el medi de cultiu (Mètodes, apartat 10.2), que provoca el pas de precursors neuronals a neurones (Schubert, Humphreys et al. 1969; Seeds, Gilman et al. 1970). Es van obtenir mostres d'RNA total i proteïna de les cèl·lules en el moment d'iniciar el procés (T0), a les 8 hores (T8) i a les 24 hores (T24) per tal de realitzar experiments de *Western blot* i PCR a temps real. Com a control, s'analitzaren els nivells proteics de GAP43, proteïna associada al creixement neuronal (Skene and Willard 1981; Snipes, Chan et al. 1987) (Figura R.15).

Tal com s'observa a la figura R.15A, les cèl·lules Neuro2A sense diferenciar presentaven una morfologia arrodonida. A les 8 hores de diferenciació, els precursors neuronals ja començaven a estendre les primeres dendrites, presentant un fenotip neuronal a les 24 hores de diferenciació, amb dendrites formades en el 90% de la població cel·lular.

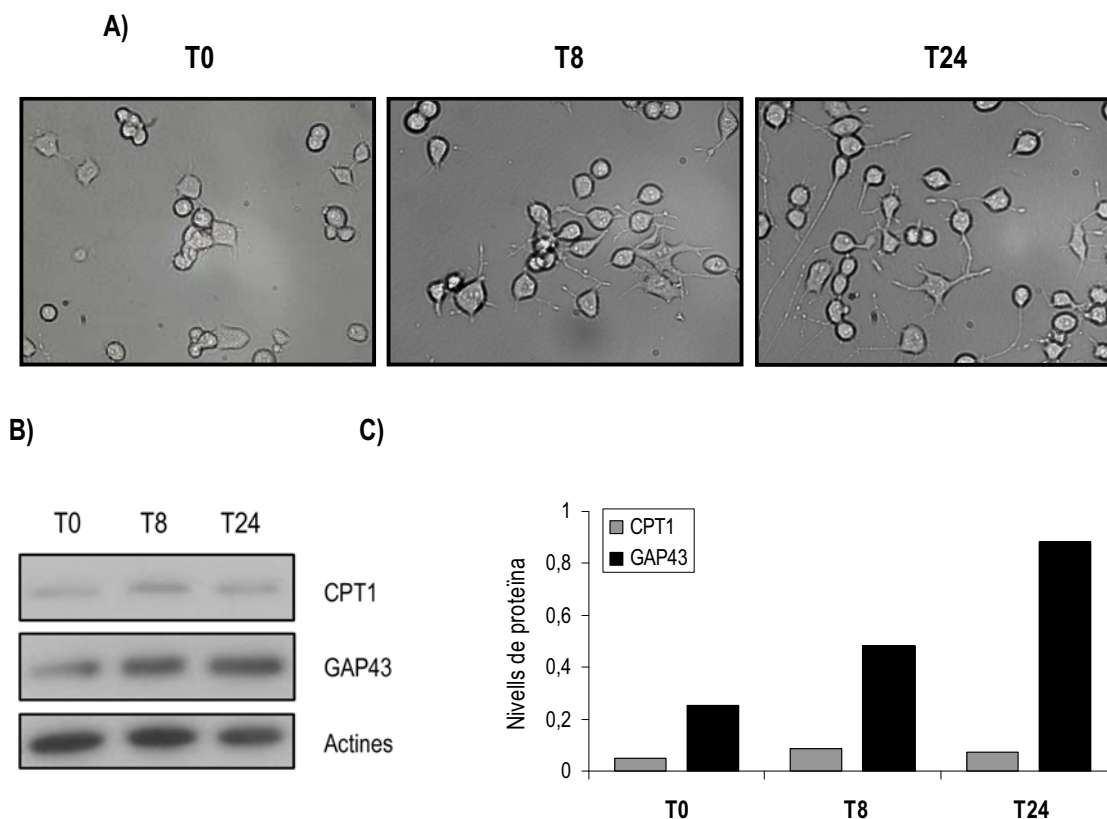


Figura R.15. Els nivells proteics de CPT1 no s'alteren per efecte de la diferenciació en les cèl·lules Neuro2A. Es van plaquejar 1×10^6 cèl·lules en plaques de 60mm i, un cop adherides, es canvià el medi a DMEM 1% FBS (T0). Es recolliren les cèl·lules passades 8h (T8) i 24h (T24). A) Canvis en la morfologia de les cèl·lules en els diferents temps estudiats. B) Anàlisi per *Western blot* dels nivells proteics de CPT1 (anticòs anti-CPT1 #139), GAP43 i actines. C) Quantificació dels nivells proteics mostrats en B).

RESULTATS

Es van analitzar els nivells proteics de CPT1 i s'observà que aquests no canviaven durant la diferenciació, a diferència de la proteïna GAP43, que incrementava els seus nivells en paral·lel amb el procés de diferenciació (Figura R.15B,C).

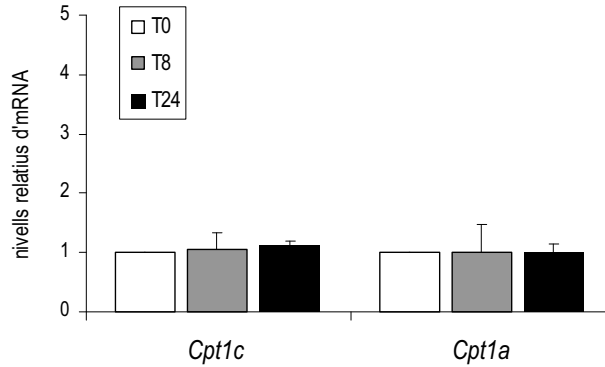


Figura R.16. L'expressió dels gens *Cpt1c* i *Cpt1a* no es veu alterada per efecte de la diferenciació en les cèl·lules Neuro2A. Es van plaquejar 1×10^6 cèl·lules en plaques de 60mm i, un cop adherides, es canvià el medi a DMEM 1% FBS (T0). Es recolliren les cèl·lules passades 8h (T8) i 24h (T24). S'obtingué l'RNA total de les cèl·lules i es va retrotranscriure 1µg a cDNA, 100ng del qual es van analitzar per qRT-PCR. Es mostren valors de la inducció dels nivells d'mRNA missatger (normalitzats amb els nivells d'expressió del gen 18S) respecte els nivells de les cèl·lules sense diferenciar (T0) (mitjana de tres experiments \pm desviació estàndard).

A la figura R.16 es mostra l'anàlisi dels nivells d'mRNA en els mateixos temps de diferenciació que en l'experiment anterior, mitjançant qRT-PCR. El resultat confirmà que, efectivament, la diferenciació de les cèl·lules Neuro2A no modificava l'expressió del gen *Cpt1c* com tampoc de *Cpt1a*.

Amb l'objectiu de garantir un context cel·lular el més proper possible a l'entorn fisiològic, els experiments *in vitro* mostrats a continuació s'iniciaren passades 24 hores del canvi de medi, un cop s'observà el fenotip neuronal.

1.4. El tractament amb forskolina no afecta l'expressió de *Cpt1c* en cèl·lules Neuro2A

En el dejuni, l'alliberament de glucagó al torrent sanguini desencadena una cascada de transducció de senyals, essent l'AMPc el principal missatger secundari (Rodbell, Birnbaumer et al. 1971; Chatelain, Deschodt-Lanckman et al. 1979). Per tal d'aprofundir en l'estudi de la regulació de *Cpt1c* pel dejuni, es van tractar cèl·lules Neuro2A diferenciades durant 24 hores amb forskolina, potent activador de l'adenilat ciclase, que provoca un augment dels nivells intracel·lulars d'AMPc, responsable de la fosforilació (a través de la PKA) i activació del factor de transcripció CREB (Gonzalez and Montminy 1989; Delghandi, Johannessen et al. 2005).

RESULTATS

Un cop s'observà el fenotip neuronal, es tractaren les cèl·lules Neuro2A durant 5 hores amb forskolina (100µM), i s'analitzaren els nivells de missatger dels gens *Cpt1a* i *Cpt1c*, com també de *Pepck*, conegut gen diana de l'AMPc en fetge (Sasaki, Cripe et al. 1984).

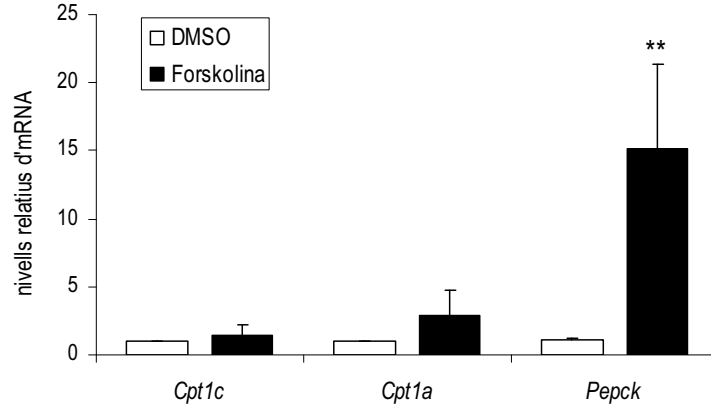


Figura R.17. Efecte del tractament amb forskolina sobre l'expressió dels gens *Cpt1c* i *Cpt1a* en cèl·lules Neuro2A diferenciades. Es van plaquejar 1×10^6 cèl·lules en plaques de 60mm i, un cop adherides, es disminuí la concentració de sèrum en el medi a 1% FBS, per tal d'induir-ne la diferenciació. 24h després, quan les cèl·lules es trobaven a una confluència del ~90%, es tractaren durant 5 hores amb forskolina (100µM). S'obtingué l'RNA total de les cèl·lules i es va retrotranscriure 1µg a cDNA, 100ng del qual es van analitzar per qRT-PCR. Es mostren valors de la inducció dels nivells d'mRNA missatger (normalitzats amb els nivells d'expressió del gen 18S) respecte els nivells basals de les cèl·lules tractades amb el vehicle (DMSO) (mitjana de tres experiments \pm desviació estàndard) ** $p < 0.01$, respecte les cèl·lules amb DMSO.

Tal com s'observa a la figura R.17, no s'observaren canvis estadísticament significatius en l'expressió dels gens *Cpt1c* i *Cpt1a* en resposta al tractament amb forskolina. Tot i que, com era esperat, es detectaren nivells d'expressió de *Pepck* molt baixos (Cruz, Scott et al. 1998), el tractament amb forskolina provocà un increment en la seva expressió, validant així el tractament.

1.5. AKT no regula els nivells d'expressió de *Cpt1c* en cèl·lules Neuro2A

Veient que el dejuni i la seva via de transducció no tenien efecte sobre l'expressió de *Cpt1c* en neurones, ens vam plantejar simular en aquestes cèl·lules un estat de re-alimentació. Donat que després de la ingesta, quan els nivells d'insulina circulant són elevats, hi ha una activació de la via de la PI3K/AKT *in vivo*, ens vam proposar activar aquesta via *in vitro* mitjançant la sobreexpressió d'AKT1. Es van infectar cèl·lules Neuro2A amb l'adenovirus AKT-CA, que codificava per una AKT1 constitutivament activa i expressava el tag HA (Mètodes, apartat 12.1), i es mesuraren els nivells d'expressió dels gens *Cpt1a* i *Cpt1c* (Figura R.18).

Tal com es mostra a la figura R.18, les cèl·lules infectades amb l'adenovirus d'AKT-CA, sobreexpressaven el tag HA, així com una proteïna amb la mobilitat electroforètica esperada per

RESULTATS

AKT1-HA, absent a les cèl·lules infectades amb l'Ad-GFP. A més a més, visualitzades al microscopi de fluorescència, un ~70% de les cèl·lules infectades amb l'Ad-GFP expressaven la proteïna fluorescent, indicant una bona eficiència d'infecció.

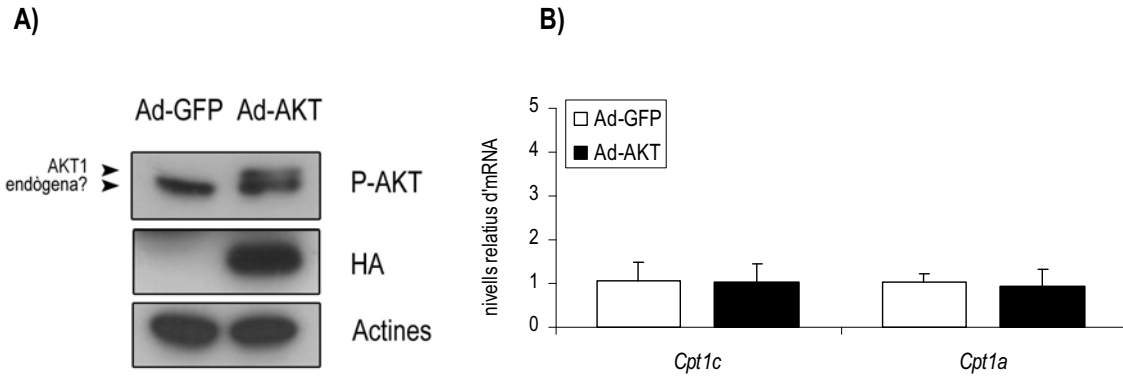


Figura R.18. Efecte de la infecció amb AKT sobre l'expressió dels gens *Cpt1c* i *Cpt1a* en cèl·lules Neuro2A. Es van plaquejar 0.75×10^6 cèl·lules en plaques de 6 pouets i, un cop adherides, es disminuí la concentració de sèrum en el medi a 1% FBS, per tal d'induir-ne la diferenciació. Passades 24h, es van infectar amb 8MOI d'un adenovirus que codificava per la proteïna AKT1 constitutivament activa. A les 48h d'infecció, es recolliren les cèl·lules. A) Anàlisi per *Western blot* de 15µg d'extracte proteic separats en un gel d' SDS-acrilamida al 8% amb els anticossos indicats. Es mostra el resultat d'un experiment representatiu. B) Determinació dels nivells d'mRNA de *Cpt1c* i *Cpt1a*. S'obtingué l'RNA total de les cèl·lules i es va retrotranscriure 1µg a cDNA, 100ng del qual es van analitzar per qRT-PCR. Es mostren valors de la inducció dels nivells d'mRNA (normalitzats amb els nivells d'expressió del gen 18S) respecte els nivells de les cèl·lules infectades amb l'adenovirus de GFP (mitjana de tres experiments \pm desviació estàndard).

No s'observaren canvis en l'expressió dels gens *Cpt1a* i *Cpt1c* en les cèl·lules infectades amb l'adenovirus d'AKT-CA, respecte les cèl·lules control (Figura R.18B).

2. Clonatge i caracterització del promotor del gen *CPT1C* humà

En no obtenir una resposta del gen *Cpt1c* en la línia neuronal Neuro2A davant els diferents estímuls estudiats que ens donés pistes sobre la seva funció cel·lular i els seus mecanismes de regulació, ens vam plantejar clonar i caracteritzar-ne la regió promotora, mitjançant l'expressió heteròloga en línies cel·lulars on sabíem que aquestes vies de senyalització funcionaven correctament.

Amb aquest objectiu, es clonà la regió promotora del gen *CPT1C* humà en el vector pGL3basic, que conté com a gen reporter el cDNA de l'enzim luciferasa de la cuca de llum. Així mateix, es generaren varis constructes amb diferents versions del mateix promotor que permetessin la caracterització d'aquesta regió del gen.

RESULTATS

2.1. Anàlisi *in silico* de la regió 5' del gen

Per tal de definir un inici de transcripció *in silico* del gen, es realitzà un alineament de les diferents ESTs (*Expressed Sequence Tag*) anotades en els bancs de dades amb la seqüència corrent amunt del gen *CPT1C* (Figura R.19). Les ESTs s'obtenen per un procés de seqüenciació a l'engròs de llibreries de cDNA resultant en un fragment d'entre 200 i 800 nucleòtids i de relativa baixa qualitat, que dóna molta informació sobre les regions transcripcionalment actives de qualsevol organisme.

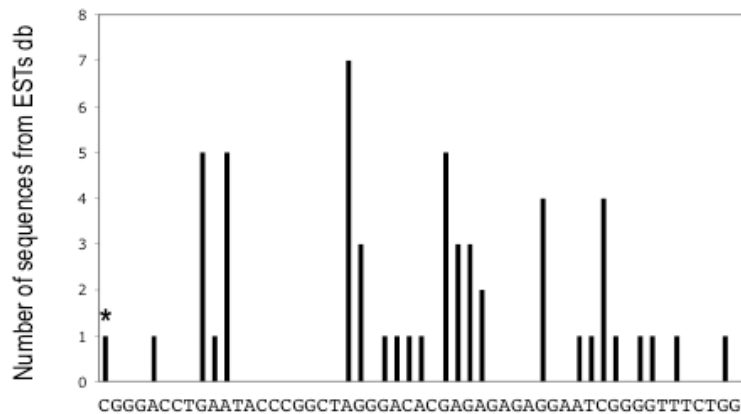


Figura R.19. Localització del putatiu inici de transcripció de *CPT1C* humà. Alineament de les seqüències presents en els bancs de dades EST (*Expressed Sequenced Tag*) del gen. (*), inici de transcripció identificat.

Tal com es mostra a la figura R.19, el gen no presenta un inici de transcripció clar, ja que en l'alineament realitzat aparegueren altres inicis possibles (Discussió, apartat II.2). S'identificà l'inici de transcripció del gen (*, en la figura R.19), corresponent a l'EST més llarg identificat, a 1145pb corrent amunt respecte l'inici de traducció descrit (Price, van der Leij et al. 2002). Aquesta posició (-1145bp respecte l'inici de traducció) es correspon, a més a més, amb el primer nucleòtid dels diferents cDNAs de *CPT1C* anotats fins al moment. D'ara en endavant en aquest treball, serà considerada la coordenada +1 del promotor del gen *CPT1C* humà.

S'analitzaren uns 1000pb corrent amunt d'aquesta posició +1 mitjançant l'eina TFSEARCH, i s'identificaren així dos putatius elements de resposta al factor de transcripció CREB (*AMPC Responsive Element Binding Protein*, coordenades -755/-745 i -274/-267), aquí anomenats CRE1 i CRE2, i un element de resposta al factor de transcripció FoxA2, de la família dels *Forkheads* (coordenades -557/-546), anomenat FRE en aquest treball.

RESULTATS

Per tal d'estudiar la funcionalitat d'aquests putatius elements de resposta, vam procedir al clonatge i caracterització de la regió promotora del gen *CPT1C* humà.

2.2. La regió 5' del gen *CPT1C* humà (-916/+41) té activitat promotora

Partint de DNA genòmic de cèl·lules humanes HepG2, s'amplificaren 957pb corresponents a la regió promotora del gen i la regió 5' no traduïda (5'UTR), fins just abans de l'inici de l'exó 1. Per tal de generar la construcció hCPT1C-*Dluc* (-916/+41), es subclonà aquest fragment en el plàsmid pGL3b, dirigint la transcripció del gen *Luc*, que codifica per la proteïna Luciferasa de *Photinus pyralis* i es comprovà que la seqüència clonada coincidia amb la seqüència publicada en el *GenBank*.

Per tal de comprovar si el promotor predit *in silico* mostrava activitat, es van realitzar experiments de transfecció transitòria en cèl·lules HepG2 amb la construcció hpCPT1C-*Dluc*. Tal com s'observa a la figura R.20, la regió amplificada presentava 14.61 vegades més activitat promotora que el vector buit pGL3b (0.059U.R.L. respecte 0.004U.R.L. del pGL3b).

2.3. Caracterització del promotor mínim de *CPT1C* humà

Amb l'objectiu d'identificar la mínima regió promotora del promotor del gen *CPT1C*, es realitzaren delecions successives de l'extrem 5' de la construcció hpCPT1C-*Dluc*, obtenint-se les construccions hpCPT1C-*DA**luc* (coordenades -401/+41) i hpCPT1C-*DC**luc* (coordenades -37/+41) (Figura R.20A). Aquestes construccions foren transfectades, de manera transitòria, en la línia cel·lular HepG2.

A la figura R.20 s'observa que les tres construccions generades presentaven activitat promotora (Discussió, apartat II.2). Per als següents experiments, s'emprà la construcció hpCPT1C-*Dluc*, per ser la més activa.

RESULTATS

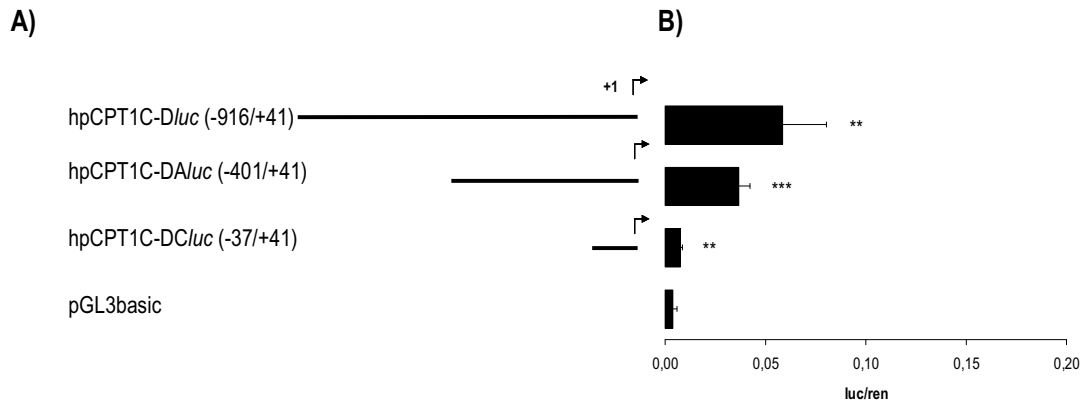


Figura R.20. Activitat basal de les diferents deleccions del promotor del gen *CPT1C* humà. A) Representació esquemàtica de les construccions reporteress analitzades. (-), seqüència nucleotídica; (+1), inici de transcripció. Entre parèntesi s'indiquen les coordenades del fragment amplificat respecte l'inici de transcripció. La fletxa indica l'inici de traducció del gen *Luc*. B) Transfecció transitoria de la línia cel·lular HepG2 amb les construccions indicades. Es mostren les unitats relatives de luciferasa (U.R.L.) normalitzades per renila (mitjana de tres experiments realitzats per duplicat \pm desviació estàndard). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecte el control, pGL3b.

2.4. La regió promotora de *CPT1C* humà s'activa en resposta a FoxA2

Durant la realització d'aquest treball es va descriure el paper de FoxA2 com a sensor metabòlic en les neurones hipotalàmiques, on regulava el comportament alimentari durant el dejuni (Silva, von Meyenn et al. 2009). Considerant que també s'havia implicat CPT1C en la regulació de la resposta al dejuni, vam analitzar *in silico* la regió promotora de *CPT1C* que teníem clonada, per comprovar si hi havia algun putatiu element de resposta a FoxA2 (FRE). El resultat d'aquest anàlisi indicava la presència d'un possible FRE en les coordenades -557/-546 del promotor estudiat, i per això ens vam proposar estudiar la funcionalitat d'aquest element.

Es van co-transfectar cèl·lules HeLa amb la construcció hpCPT1C-Dluc i un vector d'expressió del factor de transcripció FoxA2 de rata (també anomenat HNF-3 β). Donat que està descrit que *CPT1A* és un gen diana de FoxA2 (Wolfrum, Asilmaz et al. 2004), s'utilitzà com a control de la inducció per FoxA2 el reporter hpCPT1A(p600)luc, construcció validada prèviament al nostre laboratori com a diana del factor assajat. Tal com s'observa a la figura R.21, FoxA2 era capaç de transactivar el promotor de la CPT1C aproximadament 8 vegades. Es van realitzar els mateixos experiments en la línia cel·lular HepG2, amb resultats similars d'inducció (dades no mostrades).

RESULTATS

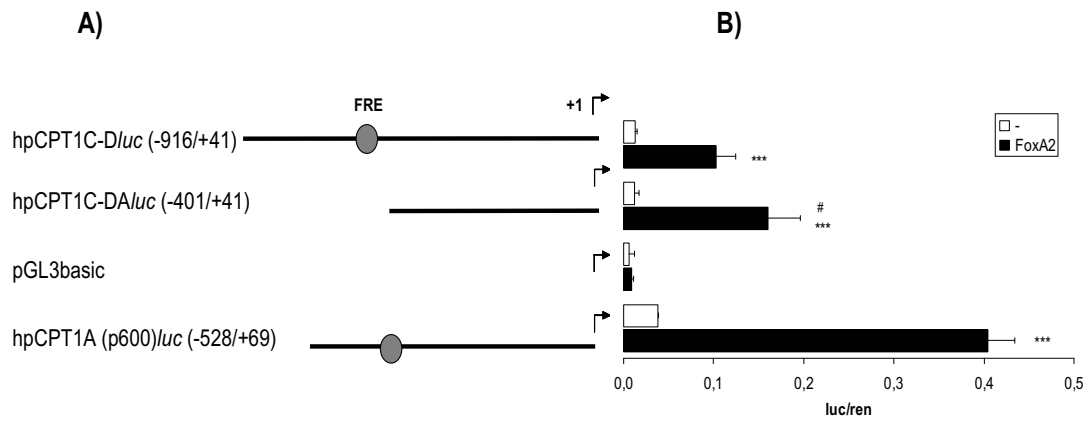


Figura R.21. Efecte de FoxA2 sobre l'activitat promotora de CPT1C humana. A) Esquema representatiu de les construccions assajades. FRE, putatiu element de resposta a FoxA2. B) Es van co-transfectar cèl·lules HeLa amb el vector d'expressió de FoxA2 i els reporters hpCPT1C-Dluc, hpCPT1C-DAIuc (FRE deletat), pGL3b (control negatiu) i hpCPT1A(p600)Iuc (control positiu). Es mostren les unitats relatives de luciferasa (U.R.L.) normalitzades per renilina en absència (□) i presència (■) del factor de transcripció FoxA2 (mitjana de tres experiments realitzats per duplicat \pm desviació estàndard). *** $p < 0.001$ respecte l'activitat basal de la construcció reportera; # $p < 0.01$ respecte la inducció per FoxA2 en la construcció hpCPT1C-Dluc.

Amb l'objectiu de confirmar la funcionalitat de l'element de resposta identificat, es co-transfectà la construcció hpCPT1C-DAIuc, on s'havia deletat l'element de resposta a FoxA2 (FRE), amb el vector d'expressió de FoxA2. A la figura R.21 s'observa que el reporter deletat seguia responent a FoxA2, indicant que el putatiu FRE identificat no era el responsable de la transactivació del promotor per FoxA2 i que FoxA2 podria estar actuant a través d'una altra regió no identificada del promotor (Discussió, apartat II.2).

2.5. La regió promotora de CPT1C humana s'activa en resposta a CREB

Tot i que no havíem observat canvis en l'expressió del gen *in vivo* en resposta al dejuni, ens vam plantejar comprovar la capacitat transactivadora de CREB sobre aquest promotor, mitjançant assajos de reporter, en un sistema heteròleg d'expressió on sabíem que aquesta via de senyalització era funcional. Per fer-ho, es van co-transfectar cèl·lules HepG2 amb la construcció hpCPT1C-Dluc i un vector d'expressió del factor de transcripció CREB de ratolí, conegut missatger de la cascada de senyalització activada durant el dejuni (Herzig, Long et al. 2001). Com a control positiu de la transfecció, s'utilitzà la construcció rpCPT1A(p4500)Iuc, que conté 2850pb de la regió promotora del gen *Cpt1a* de rata i havia estat validada prèviament al nostre laboratori com a diana del factor (-2938/-2831) [(Napal 2006), Tesi Doctoral]. Tal com s'observa a la figura R.22, CREB va incrementar en 16.81 vegades l'activitat promotora de la regió clonada, respecte la seva activitat basal, mentre que la mateixa co-transfecció utilitzant el reporter pGL3b produïa un augment de 6.38 vegades respecte la seva activitat basal.

RESULTATS

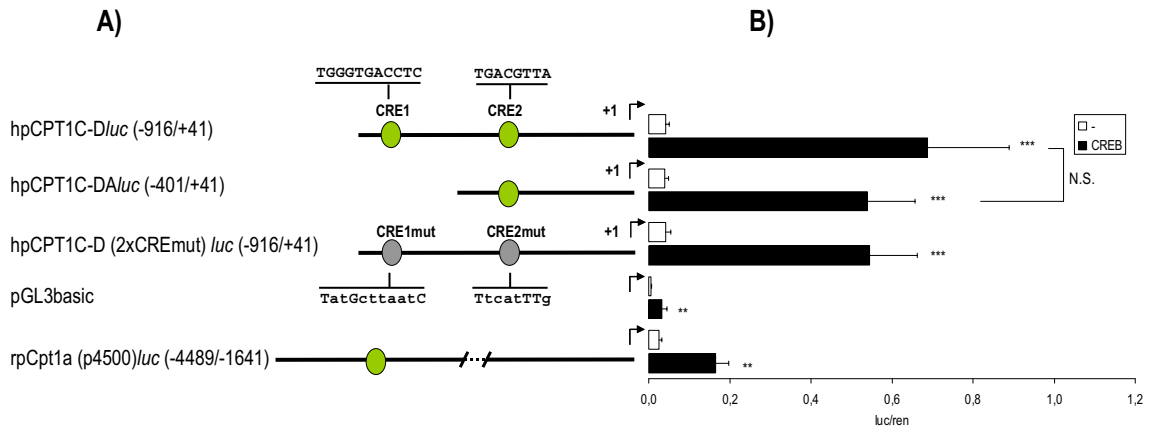


Figura R.22. Efecte de CREB sobre l'activitat promotora de CPT1C humà. A) Esquema representatiu de les construccions assajades, així com de les mutacions introduïdes als putatius elements de resposta CRE1 i CRE2 per generar la construcció hpCPT1C-D (2xCREmut) luc. B) Es van co-transfectar cèl·lules HepG2 amb el vector d'expressió de CREB i els reporters hpCPT1C-D luc, hpCPT1C-DA luc (delecció de CRE1), hpCPT1C-D(2xCREmut) luc (mutació de CRE1 i CRE2), pGL3b (control negatiu) i rpCPT1A (p4500) luc (control positiu). Es mostren les unitats relatives de luciferasa (U.R.L.) normalitzades per renila en absència (□) i presència (■) del factor de transcripció (mitjana de tres experiments realitzats per duplicat ± desviació estàndard). **p<0.01, ***p<0.001, respecte l'activitat basal de la construcció reportera.

Per tal d'analitzar la funcionalitat dels dos elements de resposta a CREB localitzats *in silico*, vam utilitzar la construcció hpCPT1C-DA luc, en què s'havien deletat els primers 510pb de la construcció hpCPT1C-D luc, eliminant així l'element de resposta més distal a l'inici de transcripció (CRE1). Tal com s'observa a la figura R.22, la construcció deletada seguia responent al factor de transcripció CREB tot i que en menor mesura, indicant que CRE1 podia ser responsable de part de la transactivació observada. Tenint en compte que aquesta construcció deletada mantenia el CRE2 intacte i que aquesta podria ser la raó de l'efecte de CREB encara observat, es mutaren els dos elements CRE1 i CRE2 localitzats *in silico*, generant així la construcció hpCPT1C-D(2xCREmut) luc (Figura R.22).

La co-transfecció en cèl·lules HepG2 de la nova construcció reportera amb el vector d'expressió de CREB resultà en una inducció de la transactivació del gen de la luciferasa similar a la construcció hpCPT1C-D luc, indicant que aquest segon element identificat no era funcional en les nostres condicions experimentals i que la regulació per aquest factor de transcripció es donaria d'una manera indirecta o bé unint-se a una altra regió del gen estudiat.

3. Estudi de l'activitat enzimàtica de la CPT1C humana

Durant els últims anys s'han publicat observacions contràries sobre la capacitat de CPT1C per catalitzar la mateixa reacció enzimàtica que els seus homòlegs CPT1A i CPT1B (Price, van der Leij et al. 2002; Sierra, Gratacós et al. 2008). Per tal de comprovar si en les

RESULTATS

nostres condicions experimentals CPT1C tenia activitat enzimàtica, ens vam proposar expressar la proteïna en llevats i en cèl·lules de mamífer i analitzar-ne la capacitat de produir palmitoïlcarnitina.

3.1. La CPT1C humana recombinant expressada en llevat no té activitat carnitina palmitoïltransferasa

Es va expressar de forma heteròloga la proteïna CPT1C humana (*Acc. Num.* NM_152359) en cèl·lules de la soca X-33 de *P.pastoris*. El cDNA clonat en el vector pGAPZB, que expressa l'epítot myc (plàsmid cedit pel grup del Dr. Victor Zammit), es transformà en les cèl·lules de llevat i s'obtingueren els extractes mitocondrial i microsomal. Es validà l'expressió de la proteïna per *Western blot* amb un anticòs anti-myc i es mesurà l'activitat CPT1 d'extractes de cèl·lules que expressaven *Human CPT1C* o *Rat CPT1A* (control positiu) així com de cèl·lules transformades amb el plàsmid buit, pGAPZB (control negatiu).

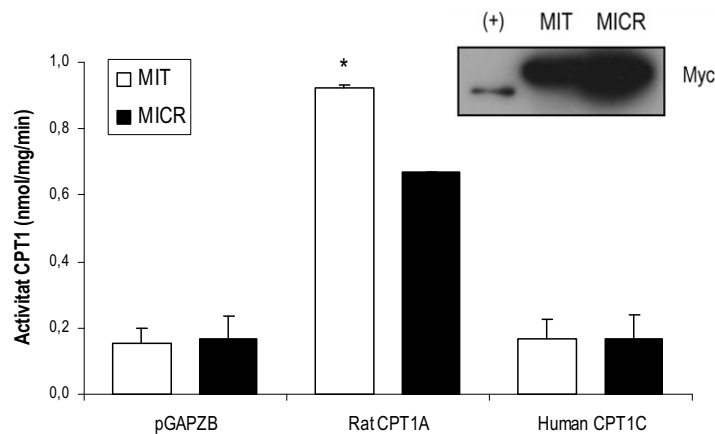


Figura R.23. CPT1C no presenta activitat CPT1 expressada en *P. pastoris*. Es van assajar 100µg d'extracte mitocondrial (MIT) i microsomal (MICR) de *P. pastoris* soca X-33 transformada amb els vectors pGAPZB, *Rat CPT1A*-pGAPZB i *Human CPT1C*-pGAPZB (mitjana de dos experiments \pm desviació estàndard). * $p < 0.05$ respecte el control, pGAPZB. Figura interior, anàlisi per *Western blot* anti-myc de l'expressió de *Human CPT1C* en les fraccions mitocondrial (MIT) i microsomal (MICR) d'una colònia transformant del llevat. 20µg d'extracte proteic es van separar en un gel SDS-acrilamida al 8%. (+), 2µg de proteïna recombinant purificada no relacionada, etiquetada amb l'epítot myc.

La figura R.23 mostra que, un cop demostrada l'expressió de *Human CPT1C* per *Western blot*, ni l'extracte mitocondrial ni el microsomal de *P. pastoris* no presentaven activitat CPT1 en el nostre sistema d'expressió i assaig, d'acord amb els resultats d'altres laboratoris (Price, van der Leij et al. 2002; Wolfgang, Kurama et al. 2006) (Discussió, apartat II.4).

RESULTATS

3.2. La CPT1C humana recombinant sobreexpressada en cèl·lules de mamífer no té activitat carnitina palmitoiltransferasa

Per tal d'estudiar la capacitat de CPT1C per catalitzar la reacció de transesterificació d'acils-CoA amb carnitina en un context més fisiològic, s'assajà l'activitat CPT total de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector d'expressió de *Human CPT1C(myc)*, que genera una proteïna de fusió on la CPT1C queda etiquetada amb l'epítip myc a l'extrem C-terminal. Com a control positiu de l'assaig, es transfectaren cèl·lules HeLa amb el plàsmid *Rat CPT1A(flag)* que genera una proteïna de fusió on la CPT1A queda etiquetada amb l'epítip flag a l'extrem C-terminal (Figura R.24). Aquesta última construcció s'havia validat prèviament en el nostre laboratori per comprovar que l'etiqueta introduïda no produïa canvis en l'activitat específica de la proteïna.

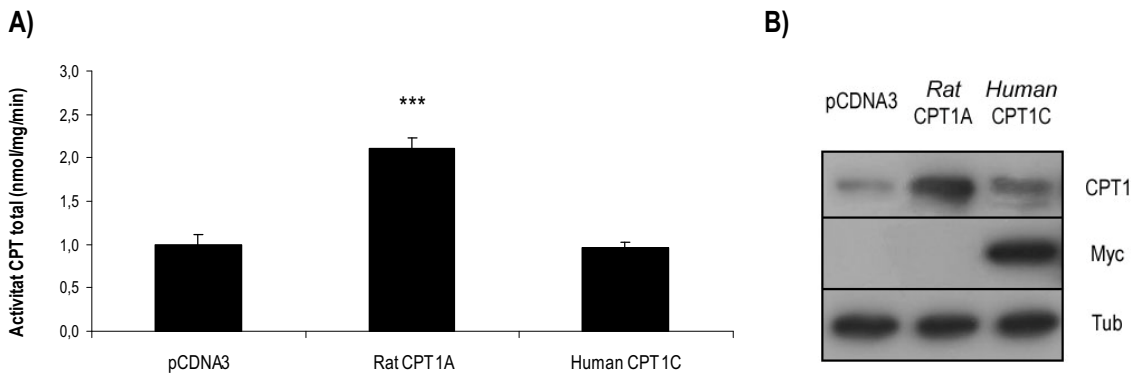


Figura R.24. La sobreexpressió de CPT1C en cèl·lules HeLa no augmenta l'activitat CPT total. A) Assaig d'activitat CPT en cèl·lules HeLa. Es van plaquejar $2,5 \times 10^5$ cèl·lules en plaques de 6 pouets. A les 24h, es van transfectar els plàsmids pCDNA3, *Rat CPT1A(flag)*-pCDNA3 i *Human CPT1C(myc)*-pCDNA3. Passades 48h de la transfecció, es procedí a l'assaig CPT en cèl·lules (mitjana de dos experiments per duplicat \pm desviació estàndard). *** $p < 0.001$ respecte el control, pCDNA3. B) Anàlisi per *Western blot* anti-CPT1 (#139), anti-myc i anti-tubulines de 15 μ g d'extracte proteic total resolt en un gel d'SDS-acrilamida al 8%.

Tal com s'observa a la figura R.24, es demostrà per *Western blot* anti-myc la sobreexpressió de *Human CPT1C(myc)* en les cèl·lules, però no es detectà un augment de l'activitat CPT total respecte l'activitat endògena basal. Un augment d'activitat CPT en les cèl·lules que sobreexpressaven *Rat CPT1A(flag)* validà l'assaig.

3.3. La manca d'activitat CPT1 de la proteïna CPT1C no és deguda a l'extensió C-terminal que presenta

La seqüència aminoacídica de CPT1C presenta una extensió C-terminal de 32 residus respecte els enzims CPT1A i CPT1B que, analitzada *in silico*, no presenta cap domini estructural ni funcional destacable (Introducció, figura I.16). Per tal d'estudiar l'efecte d'aquesta regió sobre

RESULTATS

la cinètica de l'enzim, es generà una quimera fusionant els últims 32 aminoàcids de la CPT1C de rata a l'extrem C-terminal de CPT1A de la mateixa espècie, generant la construcció *Rat* CPT1A/C-pHWO10 que s'expressà en la soca GS115 de *P. pastoris*.

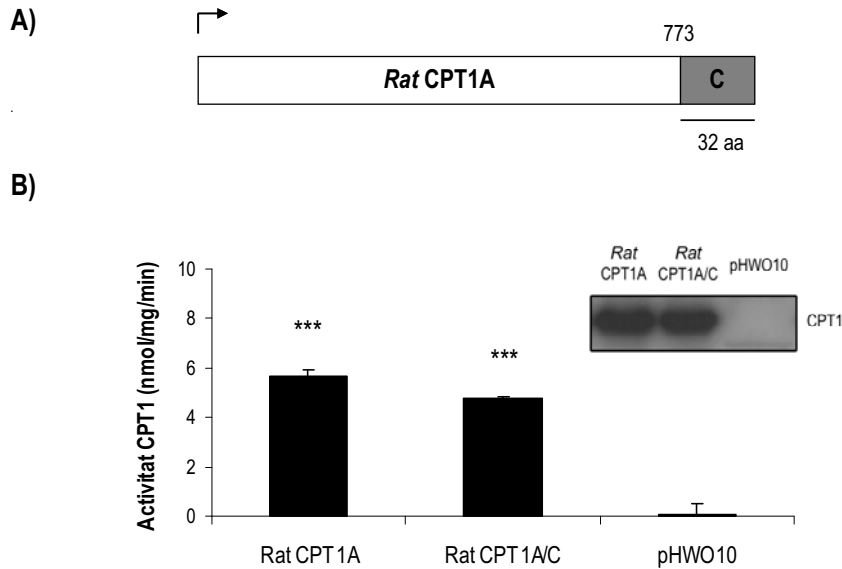


Figura R.25. Expressió i activitat de la quimera *Rat* CPT1A/C en *P. pastoris*. A) Esquema de la construcció generada, clonada en el plàsmid pHWO10 d'expressió en llevats. S'afegiren els últims 32 aminoàcids de la seqüència de *Rat* CPT1C a l'extrem carboxiterminal de *Rat* CPT1A, eliminant el codó de parada. B) Assaig d'activitat CPT1 de 100µg d'extracte mitocondrial de *P. pastoris* soca GS115 transformada amb els plàsmids *Rat*CPT1A-pHWO10, *Rat*CPT1A/C-pHWO10 i pHWO10 (mitjana de tres experiments ± desviació estàndard). ***p<0.001 respecte el control, pHWO10. Figura interior, anàlisi per *Western blot* anti-CPT1 (#139) de 10µg d'extracte mitocondrial de les proteïnes indicades separats en un gel d' SDS-acrilamida al 8%.

Tal com es mostra a la figura R.25, l'expressió en *P. pastoris* de la construcció quimèrica resultà en un enzim funcional, detectable per *Western blot* amb un anticòs específic contra la CPT1 i amb una activitat específica CPT1 similar a la de l'enzim *Rat* CPT1A (4.76µM respecte 5.64µM del *wild-type*). Es demostrava així que l'extensió carboxiterminal característica de la CPT1C no és la responsable de la manca d'activitat catalítica de la proteïna.

3.4. L'extensió C-terminal característica de CPT1C afecta la sensibilitat al malonil-CoA i l'afinitat pels substrats carnitina i palmitoïl-CoA de l'enzim CPT1A de rata

Per tal d'estudiar quin efecte podia exercir aquesta extensió C-terminal de la CPT1C en l'afinitat de l'enzim CPT1A de rata pels seus substrats i a la sensibilitat a l'inhibidor malonil-CoA, es va assajar l'activitat de l'enzim a concentracions creixents de palmitoïl-CoA, carnitina i malonil-CoA, respectivament, per tal de determinar-ne els paràmetres K_m i IC_{50} . A la figura R.26 es

RESULTATS

mostren els valors obtinguts, on la K_m va ser de $118.77 \pm 19.47 \mu\text{M}$ per la carnitina i de $36.4 \pm 5.1 \mu\text{M}$ pel palmitoil-CoA, i la IC_{50} de $10.37 \pm 3.01 \mu\text{M}$.

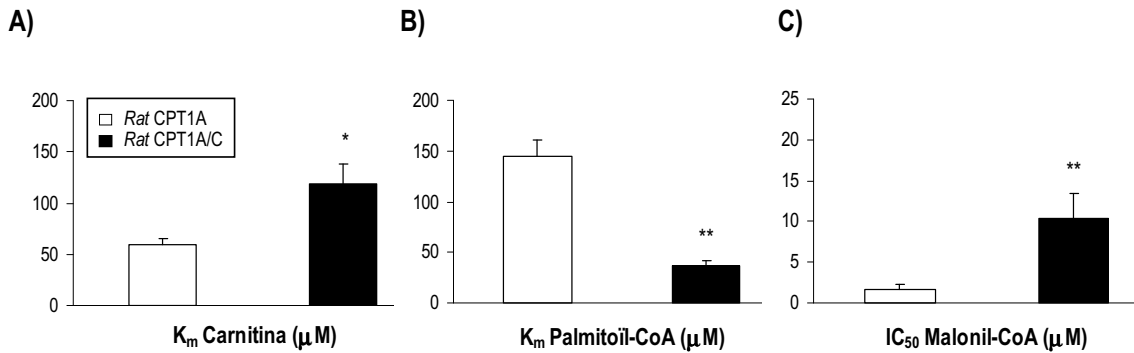


Figura R.26. Afinitat de la quimera *Rat CPT1A/C* pels substrats carnitina (A) i palmitoil-CoA (B) i sensibilitat pel malonil-CoA (C). Es van assajar 100 μg d'extracte mitocondrial de *P. pastoris* expressant les proteïnes *Rat CPT1A* (□) i *Rat CPT1A/C* (■) en concentracions creixents de carnitina, palmitoil-CoA i malonil-CoA, respectivament. Es mostra la mitjana d'almenys dos experiments amb almenys dues preparacions mitocondrials diferents \pm desviació estàndard. * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ respecte *Rat CPT1A*.

S'observa que l'extensió de 32 aminoàcids que presenta CPT1C com a tret diferencial produïa una disminució en l'afinitat de la CPT1A de rata pel substrat carnitina (major K_m), així com en la sensibilitat de l'enzim pel malonil-CoA (major IC_{50}), i un augment en la seva afinitat pel palmitoil-CoA (menor K_m) (Discussió, apartat II.4).

4. L'anàlisi del TM2 de CPT1C per espectroscopia de dicromisme circular presenta el mateix patró d'estructura secundària que el TM2 de CPT1A.

Utilitzant la tècnica d'espectroscopia de dicromisme circular, s'ha determinat la disposició en estructura d'hèlix alfa d'un pèptid la seqüència del qual correspon al segon fragment transmembrana (TM2) de la CPT1A de rata. L'estructura d'aquesta regió, responsable de la formació d'oligòmers, es confirmà posteriorment mitjançant electroforesi en gel natiu (BN-PAGE) (Faye, Esnous et al. 2007; Jenei, Borthwick et al. 2009; Jenei, Warren et al. 2011; Rao, Warren et al. 2011).

Per tal d'estudiar una possible estructura quaternària també per CPT1C, i considerant que, igual que en CPT1A i CPT1B, l'estudi de la seqüència de CPT1C mitjançant el programa *TMHMM Server* identifica dues regions altament hidrofòbiques (amb un índex de probabilitat major de 0.5) entre els residus Ala⁵² - Ser⁶⁷ i Leu¹⁰⁴ - Leu¹²⁶, s'establí una col·laboració amb el grup del Dr. Jesús Pérez Gil de la Universidad Complutense de Madrid.

RESULTATS

Es dissenyaren dos pèptids: TM2C i TM2A, corresponents al segon fragment transmembrana de la CPT1C de rata (TM2C, Leu¹⁰⁴ - Leu¹²⁶) i de la CPT1A de rata (TM2A, Lys¹⁰² - Arg¹²³), aquest últim idèntic a l'emprat en el treball de Jenei i col·laboradors (Jenei, Borthwick et al. 2009). S'encarregà la síntesi dels pèptids a la companyia *Peptide 2.0*, que els envià liofilitzats. Aquests pèptids foren resuspesos en metanol per tal d'augmentar-ne l'exposició al detergent, en aquest cas Lipofosfatidilcolina (LPC, component lipídic majoritari en les membranes cel·lulars) i s'analitzà l'elipticitat molar mitjançant espectroscopia de dicroisme circular (Mètodes, apartat 9).

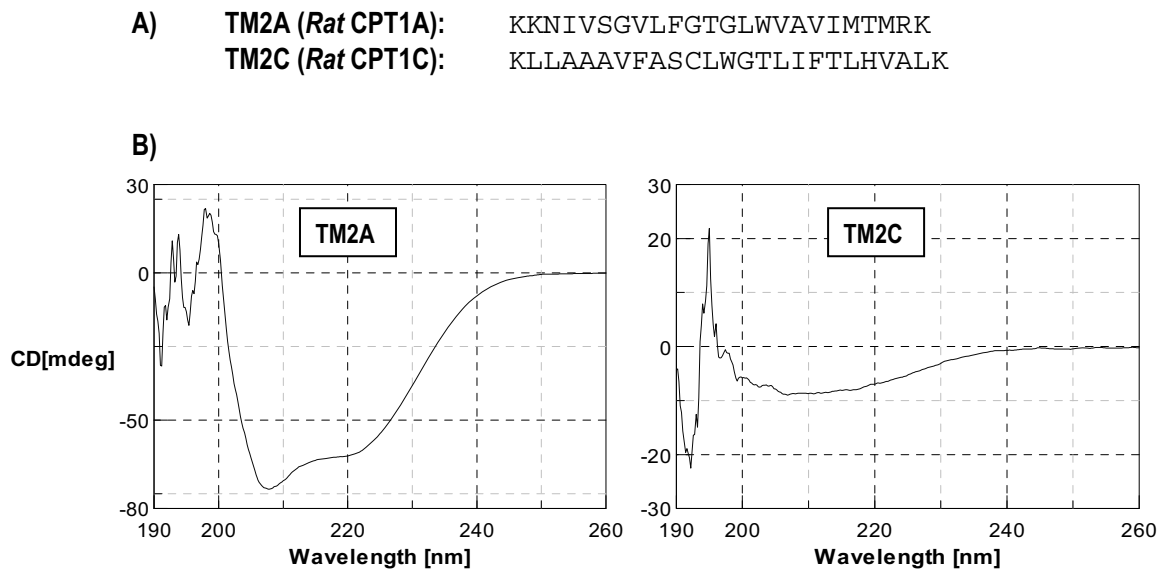


Figura R.27. El pèptid TM2C presenta un espectre semblant al pèptid TM2A. A) Alineament dels pèptids analitzats en aquest experiment, sintetitzats per *Peptide 2.0*. B) Espectres obtinguts per dicroisme circular en afegir el detergent LPC a 0.35mg de cada pèptid en una relació pèptid:detergent de 1:5. Dades processades amb el software *Spectra manager*. (Veure processament mostres a Mètodes, apartat 9).

Tal com s'observa a la figura R.27, l'espectre obtingut mostrà que, efectivament, el segon fragment transmembrana de CPT1C també presenta un percentatge de plegament en hèlix alfa, que podria fer pensar en una possible disposició oligomèrica de la proteïna, com en el cas de CPT1A.

Es realitzà una estada al laboratori del Dr. Victor Zammit a la Universitat de Warwick (UK), per tal d'analitzar la possible estructura quaternària de CPT1C en gels nadius d'acrilamida (BN-PAGE). Per a la immunodetecció s'utilitzà un anticòs contra la CPT1C dissenyat i produït pel mateix grup, però la no-especificitat d'aquest anticòs no va permetre treure una conclusió clara en aquest sentit (Mètodes, apartat 8.3; Figura M.10).

RESULTATS

5. Anàlisi de la distribució subcel·lular de la CPT1C humana

Durant la realització d'aquest treball han aparegut diferents publicacions que presenten controvèrsia respecte la ubicació subcel·lular de CPT1C, com s'ha mencionat a la introducció, apartat III.3.3.2 (Dai, Wolfgang et al. 2007; Sierra, Gratacós et al. 2008). Per tal d'analitzar en quin compartiment es localitzava la proteïna en el nostre model d'expressió, es realitzaren experiments d'immunohistoquímica en cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb el vector d'expressió *Human CPT1C(myc)-pCDNA3*.

La detecció de la CPT1C amb l'anticòs anti-myc no co-localitzà amb el marcatge de la membrana mitocondrial realitzat amb Mitotracker (Figura R.28). Per tal d'ubicar la proteïna endògena, i durant una estada que es va realitzar al laboratori del Dr. Victor Zammit (Universitat de Warwick), es van obtenir cultius primaris d'hipotàlem de ratolí. Cap dels anticossos testats va permetre la detecció de la proteïna endògena en estat natiu per immunohistoquímica.

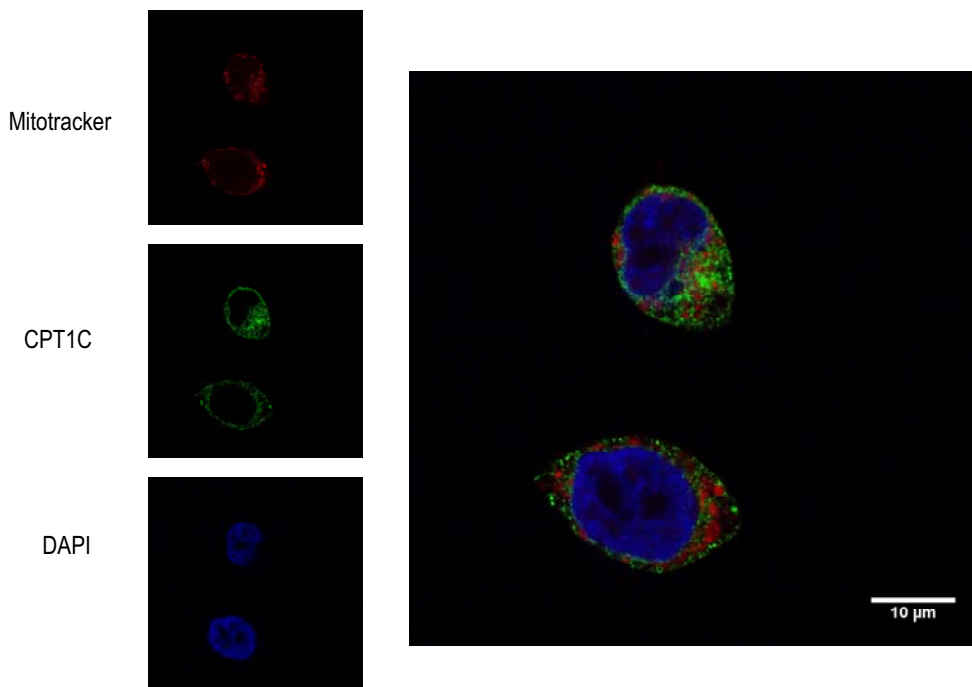


Figura R.28. Immunolocalització de la proteïna CPT1C humana recombinant en cèl·lules de mamífer. Es van plaquejar 2×10^5 cèl·lules HeLa sobre cubreobjectes de vidre de 12mm de diàmetre en plaques de 60mm i, passades 24h, es transfectaren amb els plàsmids *Human CPT1C(myc)-pCDNA3* o *pCDNA3* com a control. Passades 48h de la transfecció, les cèl·lules van ser tractades segons el protocol descrit d'immunofluorescència indirecta (Mètodes, apartat 7.10). Per a la detecció específica de CPT1C s'emprà l'anticòs primari anti-myc. Els nuclis van ser visualitzats amb el reactiu DAPI (blau), i la membrana mitocondrial amb el marcador Mitotracker (vermell).

RESULTATS

6. Isoforma AK299866 del gen *CPT1C* humà

6.1. Estudi de diferents isoformes del gen *CPT1C*

Els resultats mostrats fins ara sobre el gen *CPT1C* humà corresponen a la isoforma NM_152359 (*transcript variant 2*), clonada per Price i col·laboradors, que codifica per una proteïna de 803 aminoàcids (Price, van der Leij et al. 2002). A més a més, durant la realització d'aquesta tesi doctoral es va treballar amb la isoforma BC_029104 (actualment anomenada NM_001136052.2, *transcript variant 1*), disponible comercialment. Aquesta isoforma presenta un 5'UTR diferent i utilitza un lloc donador d'*splicing* alternatiu a l'exó 11, que resulta en una proteïna 11 residus més curta (792aa).

Amb l'objectiu de respondre quina de les dues isoformes descrites era la majoritària en el teixit cerebral, on s'ha descrit la màxima expressió de proteïna CPT1C, vam dissenyar dos encebadors (oligos DH1118 i DH1119, detallats als Apèndixs, apartat III.2.3) flanquejant la regió codificant que contenia la deleció en la isoforma BC_029104. L'amplicó esperat era de 850pb en el cas de la isoforma NM_152359 i de 817pb per la isoforma BC_029104. A la figura R.29B es mostra el resultat obtingut en realitzar un RT-PCR utilitzant com a motlle un *pool* d'mRNAs de cervell humà adult (*Applied Biosystems*, Ref.: AM6050).

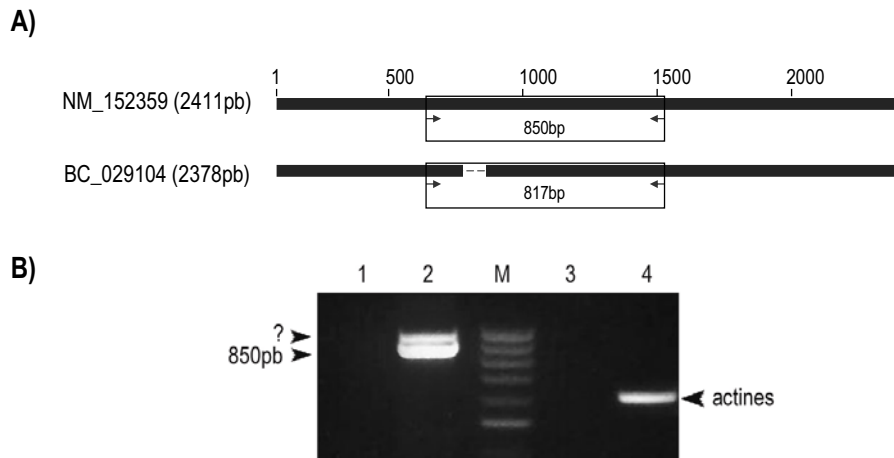


Figura R.29. Amplificació per PCR de la regió diferencialment transcrita entre les isoformes NM_152359 i BC_029104 de *CPT1C* humà. A) Alineament de les seqüències de cDNA de dues isoformes de *CPT1C*, indicant la numeració en pb. Entre parèntesis s'indiquen la longitud de les seqüències nucleotídiques. La línia discontinua indica una deleció en la seqüència. La regió emmarcada es correspon a la regió amplificada per PCR, i el tamany de l'amplicó esperat. B) S'utilitza un *pool* d'mRNA de cervell humà adult com a motlle (carrils 2 i 4) i s'amplifica mitjançant RT-PCR. S'empraren els oligos DH1118 (*forward*) i DH1119 (*reverse*) que hibriden amb la seqüència del gen *CPT1C* humà (carrils 1 i 2) i els oligos β act1 i β act2, específics del gen de les β -actines, com a control de la reacció de retrotranscripció (carrils 3 i 4). Els carrils 1 i 3 contenen aigua enlloc de motlle en la reacció de PCR. Es visualitzà el resultat en un gel d'agarosa al 2.5% i es carregà un marcador de pes molecular conegut (M).

RESULTATS

Com s'observa a la figura R.29, l'anàlisi electroforètic del DNA mostrà la banda de 850bp esperada que correspondria a la isoforma NM_152359 i una segona banda més gran, d'un 950pb, que, per la intensitat de la senyal, era expressada consistentment en la mostra de partida. Per tal d'identificar aquestes bandes, es purificaren ambdues bandes del gel d'agarosa i es seqüenciaren. L'anàlisi dels cromatogrames indicà que, efectivament, la banda més petita es corresponia a la isoforma NM_152359, suggerint que aquesta era la isoforma de *CPT1C* majoritària en cervell.

6.2. Identificació d'una nova isoforma de *CPT1C* expressada en cervell humà

Pel que fa a la segona banda de 950pb, l'alineament amb l'eina *BLAST* de la seqüència obtinguda identificà una nova isoforma del gen *CPT1C* humà (*Acc. Num.* AK299866), descrita només per a l'espècie humana. Es tracta d'un mRNA originat per un *splicing* alternatiu a l'exó 2, que produeix un salt en el marc obert de lectura que retrassa l'inici de transcripció fins al 8è exó. El producte de la traducció d'aquest mRNA és una proteïna de només 485 aminoàcids que comparteix el marc obert de lectura de la *CPT1C*, amb dues insercions de 33 i 37 aminoàcids a la regió carboxiterminal. El fragment proteic generat correspon a la part soluble de la proteïna *CPT1C* (92% d'identitat de seqüència), no conté els fragments transmembrana, i comparteix més del 50% d'identitat amb *CPT1A* i *CPT1B*.

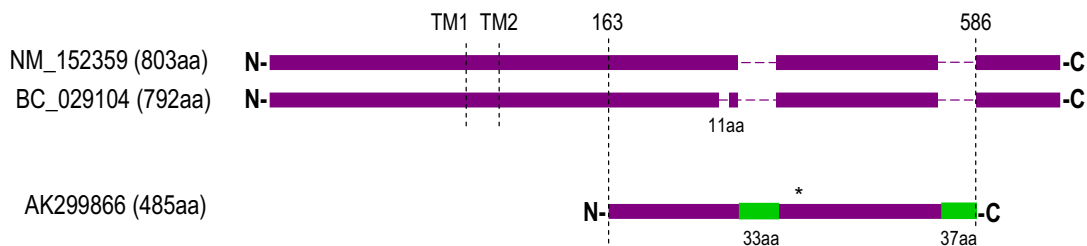


Figura R.30. La isoforma AK299866 comparteix l'ORF de *CPT1C*. Esquema de les característiques de la seqüència de les dues isoformes majoritàries de la *CPT1C* humana, i comparació amb la nova isoforma identificada, AK299866. Entre parèntesis s'indiquen la longitud de les seqüències; TM1, TM2, primera i segona regió transmembrana; *, variació d'un aminoàcid en la seqüència; línia discontinua, deleció en la seqüència; rectangles verds, insercions que presenta la nova isoforma respecte la isoforma NM_152359 (indicant el nombre de residus).

L'anàlisi de la seqüència de la *CPT1C* humana (isoforma NM_152359) amb el programa *Uniprot*, prediu la regió d'unió al coenzim A entre els residus 552 i 564, i els residus Tyr⁵⁸⁶, Ser⁵⁸⁸ i Thr⁵⁹⁹ com a responsables de la unió a la carnitina; prediccions fetes per homologia amb les seqüències de *CPT1A* i *CPT1B* i diverses evidències experimentals. Tal com s'observa a la

RESULTATS

Figura R.31, el centre catalític (His⁴⁷³) i la regió d'unió al coenzim A de les CPT1 es troben 100% conservats en la isoforma AK299866.

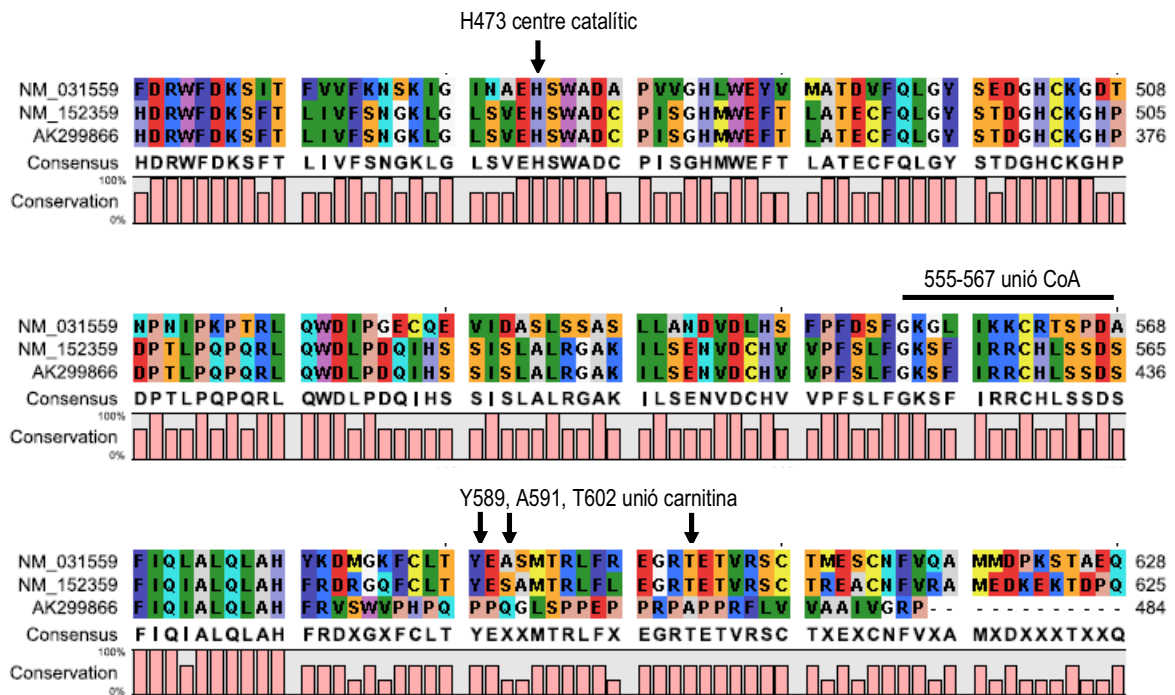


Figura R.31. Comparació dels dominis funcionals entre CPT1A i diferents isoformes de CPT1C. Alineament de les seqüències aminoacídiques de la CPT1A de rata (NM_031559) i de dues isoformes de la CPT1C humana (NM_152359 i AK299866), on s'indiquen el centre catalític i els dominis predits per *Uniprot* d'unió al coenzim CoA i la carnitina. La numeració dels dominis funcionals es correspon a la CPT1A de rata.

6.3. Clonatge i expressió heteròloga de la isoforma AK299866

Amb l'objectiu de clonar i expressar la proteïna produïda pel transcrit AK299866 i estudiar-ne la seva solubilitat, s'amplificaren els 1500pb d'aquest cDNA amb els oligos DH1252 i DH1266, partint del mateix *pool* d'mRNA de cervell humà i mitjançant RT-PCR (Mètodes, apartat 6.3).

6.3.1. La isoforma AK299866 expressada en un sistema eucariota és soluble

Clonats els cDNAs d'AK299866 i *CPT1C* humana en els vectors d'expressió pGEMT i pCDNA3, vam voler comprovar que, efectivament, es tractava d'una forma soluble de CPT1C. Utilitzant el sistema de transcripció i traducció (TnT) *in vitro*, s'expressaren els constructes AK299866-pGEMT i *Human CPT1C*-pCDNA3, ambdós dirigits pel promotor de la T7 RNA polimerasa. Mitjançant fluorografia (Mètodes, apartat 7.9) es visualitzaren les diferents fraccions

RESULTATS

dels extractes obtinguts (sobrenedant i *pellet*) després d'una centrifugació de 20min a 14.000g a 4°C. (Figura R.32).

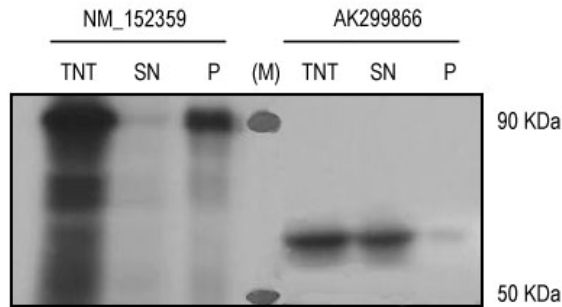


Figura R.32. La isoforma AK299866 traduïda i transcrita *in vitro* és soluble. Es realitzà un TNT *in vitro* marcat amb ^{35}S de les isoformes de *CPT1C* humana NM_152359 i AK299866, i es centrifugaren els extractes obtinguts (20min, 14.000g, 4°C). Es carregaren 5µL de les fraccions obtingudes (SN, sobrenedant; P, *pellet*) en un gel d'SDS-acrilamida al 6%, així com també 5µL de l'extracte original sense centrifugar (TNT). (M), marcador de pes molecular. Es visualitzaren les proteïnes per fluorografia.

La figura R.32 mostra que, efectivament, la isoforma AK299866 expressada en un sistema eucariota (lisat de reticulòcits de conill, en aquest cas), es trobava a la fracció soluble, mentre que la isoforma NM_152359 es trobava a la fracció insoluble, com s'esperava.

6.3.2. La isoforma AK299866 expressada en un sistema procariota és soluble

Per comprovar la solubilitat de la proteïna en un sistema procariota, es subclonà el cDNA de la isoforma AK299866 en el plàsmid d'expressió procariota pGEX4T2, generant la proteïna de fusió GST-AK299866. L'expressió en *E.coli* resultà en una proteïna insoluble (Mètodes, apartat 7.11.2; Figura M.3) i per això es procedí a canviar la proteïna de fusió i, per tant, el sistema de purificació, intentant solubilitzar la forma AK299866.

Pel seu alt rendiment en l'expressió de proteïnes solubles en *E.coli* vam escollir com a proteïna solubilitzadora la proteïna NusA (Davis, Elisee et al. 1999). Així, s'originà la proteïna de fusió NusA-AK299866 mitjançant el subclonatge del cDNA de la isoforma humana AK299866 en el plàsmid pET43a. Tal com es pot observar a la figura M.4 de Materials i Mètodes, la proteïna de fusió generada es trobava al sobrenedant de l'extracte bacterià sonicat.

Paral·lelament a la fusió amb la proteïna NusA, el plàsmid pET43a permet, gràcies al tag d'histidines que presenta, la purificació de la proteïna mitjançant una columna de níquel d'intercanvi iònic, i la posterior elució per competició amb imidazol. Analitzada per electroforesi en gel d'acrilamida, la proteïna purificada presentava el pes molecular esperat per tinció amb

RESULTATS

Comassie Blue, i es pogué detectar per *Western blot* amb un anticòs anti-His, com també amb un anticòs anti-CPT1 generat contra la regió carboxiterminal de *Pig* CPT1A, fet que alhora confirmà l'alta identitat de seqüència de la isoforma AK299866 amb la regió C-terminal de CPT1A (Figura R.33).

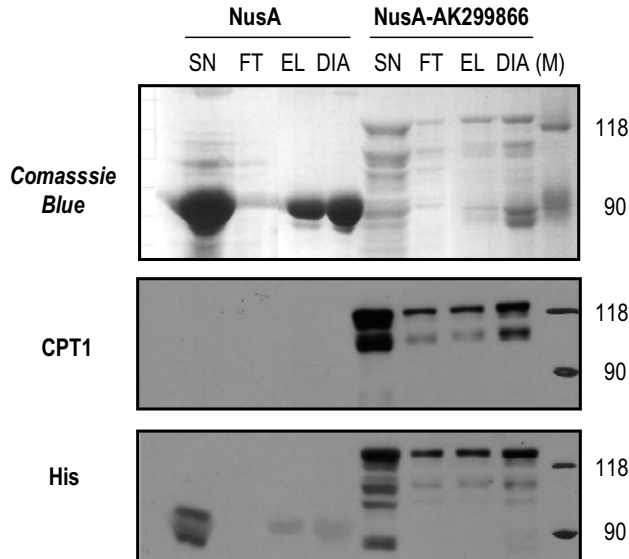


Figura R.33. Patró electroforètic de la proteïna NusA-AK299866 i anàlisi per *Western blot*. S'analitzaren 10µg de les proteïnes indicades expressades en *E.coli*, per tinció amb *Comassie Blue* (panel superior) i 5µg per *Western blot* anti-CPT1 (#139) i anti-His, resultats en un gel d'acrilamida al 8%. SN, sobrenedant de l'extracte bacterià sonicat, afegit a la columna de purificació; FT, *flow-through* de la columna, o allò que no queda retingut per aquesta; EL, eluït, en afegir una solució d'imidazol 200mM; DIA, dialitzat amb els dispositius Amicon; (M), marcador de pes molecular.

6.4. La isoforma AK299866 no presenta activitat CPT1 *in vitro*

Per tal de determinar la capacitat catalítica d'aquesta isoforma per generar acilcarnitines, i considerant que una elevada concentració de sals, provinents de la purificació de la proteïna, pot afectar l'assaig d'activitat CPT1, es va posar a punt un protocol de concentració i diàlisi de mostres proteiques mitjançant un dispositiu Amicon d'ultracentrifugació (Mètodes, apartat 7.11.3). D'aquesta manera s'intentava minimitzar al màxim la presència de sals en les mostres a assajar (NusA i NusA-AK299866), i alhora assimilar el tampó final de les proteïnes purificades al tampó de resuspensió de les mostres mitocondrials obtingudes a partir de llevats transformats.

Es van realitzar assajos d'activitat CPT1 de les mostres concentrades i desalades NusA i NusA-AK299866 expressades en *E.coli*, i d'extracte mitocondrial de CPT1A de rata expressada en *P. pastoris* (control positiu) (Figura R.34).

RESULTATS

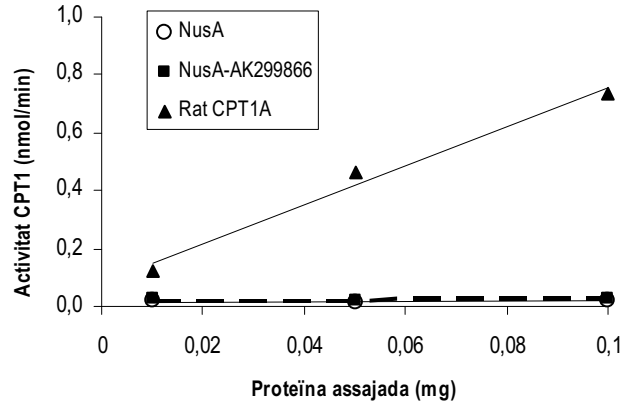


Figura R.34. La isoforma AK299866 no presenta activitat CPT1 *in vitro*. S'assajaren 10, 50 i 100µg d'extracte mitocondrial del llevat *P. pastoris* que expressava la proteïna *Rat CPT1A* així com extractes de les proteïnes NusA i NusA-AK299866 purificades i dialitzades. Es mostra la mitjana de dos assajos diferents de dues obtencions proteiques diferents.

Tal com es mostra a la figura R.34, la isoforma AK299866 de la *CPT1C* humana no presentà activitat CPT1 en les nostres condicions d'assaig, tot i augmentar la quantitat de proteïna en la mescla de la reacció. D'altra banda, l'enzim CPT1A de rata augmentà proporcionalment la quantitat de palmitoilcarnitina formada respecte la quantitat d'enzim present a l'assaig.

6.5. La isoforma AK299866 no competeix amb la CPT1A de rata pel malonil-CoA

Donat que la isoforma AK299866 conserva la regió d'unió al coenzim A, ens vam plantejar la hipòtesi que aquesta proteïna unís malonil-CoA provocant un efecte reclutador de malonil-CoA. Aquest reclutament de malonil-CoA per part de la CPT1C podria, a nivell fisiològic, donar un paper a aquesta proteïna aparentment inactiva com a proteïna reguladora, modulant els nivells hipotalàmics de malonil-CoA lliure i per tant disponible.

Per tal de determinar si la isoforma AK299866 era capaç d'unir malonil-CoA i competir així amb la CPT1A de rata per l'inhibidor, es va mesurar l'activitat CPT1 en presència de malonil-CoA 2µM (que havia de produir una inhibició del 50% de l'activitat) i en concentracions creixents de NusA i NusA-AK299866 (Figura R.35).

RESULTATS

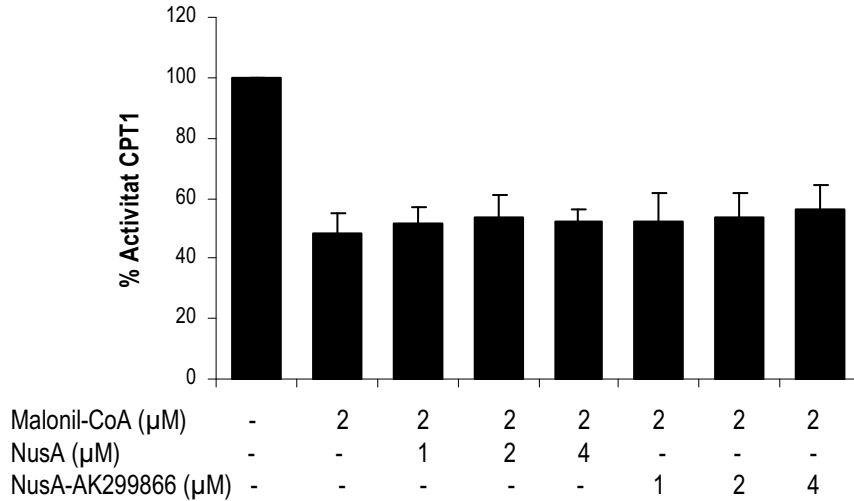


Figura R.35. La isoforma AK299866 no competeix amb la CPT1A de rata pel malonil-CoA. Assaig enzimàtic de 100μg d'extracte mitocondrial de *Rat* CPT1A expressada en el llevat *P. pastoris* en presència de 2μM de l'inhibidor malonil-CoA i en concentracions creixents (1, 2 i 4μM) de les proteïnes purificades i desalades NusA i NusA-AK299866. Mitjana de dos experiments realitzats per duplicat ± desviació estàndard.

A la figura R.35 s'observa que el malonil-CoA (2μM) produí una inhibició d'aproximadament el 50% de l'activitat de la CPT1A de rata, validant així l'assaig i l'efecte de l'inhibidor. En afegir concentracions creixents de la proteïna purificada NusA-AK299866, no s'observaren canvis en la capacitat d'inhibició del malonil-CoA, indicant que no estaven variant els nivells de malonil-CoA lliure a la solució de reacció. Segons aquests estudis preliminars i en les nostres condicions d'assaig, la isoforma AK299866 de la *CPT1C* humana no té capacitat d'unió al malonil-CoA, tot i que caldran més experiments per confirmar aquesta hipòtesi.

DISCUSSIÓ

I. ANÀLISI DE DETERMINANTS MOLECULARS DE LA INHIBICIÓ PER MALONIL-CoA DE L'ENZIM CPT1

La regulació exercida pel malonil-CoA sobre CPT1A i CPT1B és un punt clau en la coordinació entre la síntesi i l'oxidació dels àcids grassos. Entendre al detall els mecanismes d'aquesta regulació seria un gran avanç en la investigació i el desenvolupament de medicaments que controlin l'oxidació d'àcids grassos, fet que es dona en la diabetis mellitus (Prentki and Corkey 1996), i la isquèmia miocárdial, on l'acumulació d'àcids grassos lliures s'ha relacionat amb l'aparició d'arítmies (Corr and Yamada 1995).

Tal com s'observa a la figura D.1, s'han identificat diferents determinants de la sensibilitat al malonil-CoA dels enzims CPT1A i CPT1B. Així, mentre la regió de residus 19-30 de CPT1A de rata es comporta com un determinant negatiu, explicant la menor sensibilitat d'aquest isotip, la mateixa regió en CPT1B es comporta com un determinant positiu amb major efecte que els primers 18 residus de la proteïna sobre el grau de sensibilitat a l'inhibidor.

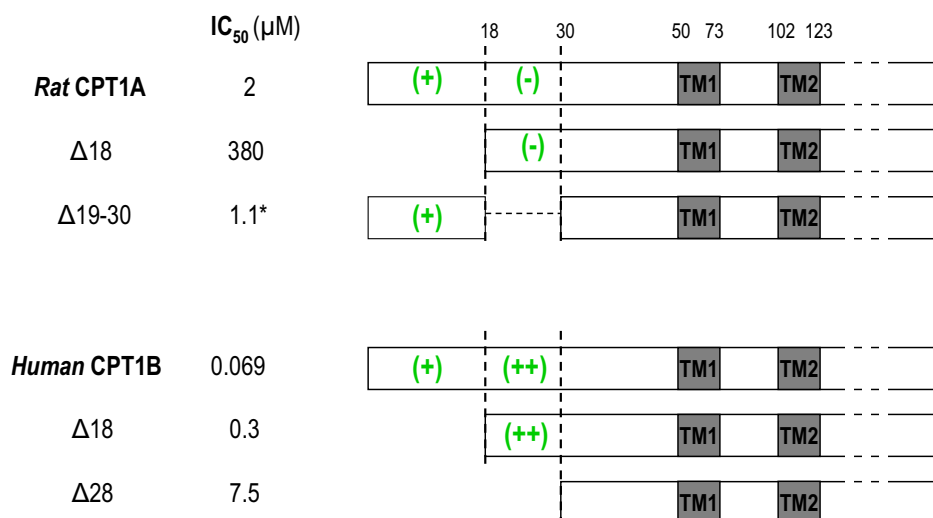


Figura D.1. Representació esquemàtica dels diferents determinants moleculars de sensibilitat al malonil-CoA descrits per les proteïnes CPT1A de rata i CPT1B humana. Es mostren els valors d'IC₅₀ de construccions delecionades dels enzims *Rat CPT1A* i *Human CPT1B*, així com els corresponents enzims *wild-type*, expressats en *P. pastoris*. En ombrejat s'indiquen les regions transmembranares; en verd el tipus de determinant molecular. *Valor obtingut en un sistema d'expressió diferent (*S. cerevisiae*), on la IC₅₀ pel *wt* és de 38μM.

1. Anàlisi de determinants moleculars de la inhibició de la CPT1A de rata

El sistema CPT consta de tres enzims que s'encarreguen de la translocació d'àcids grassos de cadena llarga des del citosol fins la matriu mitocondrial on podran ser β -oxidats. Aquest sistema llançadora d'àcids grassos funciona a través de la transesterificació d'acils-CoA amb carnitina, reacció catalitzada per la CPT1, la translocació de les acilcarnitines formades gràcies a la CACT i finalment la reversió de la transesterificació per l'enzim CPT2. Es tracta d'un sistema finament regulat per malonil-CoA, capaç d'inhibir la CPT1 però no la CPT2, tot i l'alt grau d'identitat de seqüència que presenten ambdós enzims (Woeltje, Esser et al. 1990). Amb aquestes dades, i donat que la diferència més important entre les dues CPTs es troba en la regió aminoterminal, absent en CPT2, la major part dels esforços per trobar la regió responsable de la sensibilitat a l'inhibidor s'han centrat en els residus de l'extrem N-terminal de les CPT1. En el cas de la CPT1A de rata, s'ha demostrat que la regió aminoterminal de l'enzim exerceix un paper fonamental en permetre la unió al malonil-CoA, havent-se identificat un mecanisme molt precís de regulació de l'enzim en aquesta regió.

L'expressió en *P. pastoris* de les construccions de la CPT1A de rata generades, mostra variacions en l'activitat específica dels diferents enzims respecte el *wild-type* (Taula R.1). En el cas concret del mutant E590A *Rat* CPT1A, i d'acord amb els resultats publicats pel nostre grup i col·laboradors, s'observa que presentava menor activitat específica que l'enzim *wild-type*, donada la importància del residu Glu⁵⁹⁰ en establir el centre catalític de l'enzim (Napal, Dai et al. 2003). De tota manera, els experiments realitzats en aquesta tesi doctoral no estaven dissenyats amb l'objectiu d'estudiar canvis que afectessin l'activitat catalítica de l'enzim i amb la informació disponible no podem concloure que les mutacions introduïdes siguin responsables de les variacions en l'activitat específica que presenten respecte l'enzim *wild-type*. Es considerarà que aquestes variacions no afectaven els estudis de sensibilitat al malonil-CoA de les proteïnes generades (Figura R.2).

Les construccions $\Delta 18$ i E590A *Rat* CPT1A van ser generades i expressades en el context de la col·laboració amb el laboratori del Dr. Gebre Woldegiorgis. És per aquest motiu que, tot i haver estat publicades amb anterioritat a l'inici d'aquest treball, també es mostren els valors d'activitat a la Taula R.1 i de sensibilitat a la figura R.2. Es va realitzar almenys una corba d'inhibició per malonil-CoA d'aquests enzims juntament amb el *wild-type*, que confirmaren que ens trobàvem en les mateixes condicions d'assaig que les de partida.

DISCUSSIÓ

La construcció M593A *Rat* CPT1A resultà en un enzim menys sensible al malonil-CoA, respecte l'enzim *wild-type* ($IC_{50}=11\mu M$), fet que suggeria que el residu Met⁵⁹³ estaria afavorint la unió de l'inhibidor a l'enzim. Aquest resultat confirmava observacions anteriors realitzades en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, on la mutació d'aquest residu produïa enzims menys sensibles que el *wild-type* (Morillas, Gómez-Puertas et al. 2003). Tot i això, vam considerar necessari generar de nou aquest mutant i expressar-lo en *P. pastoris*, ja que la IC_{50} per malonil-CoA de *Rat* CPT1A *wild-type* en aquests estudis va ser de $12.3\mu M$, mentre que en el nostre sistema d'expressió (*P. pastoris*) aquesta era de $1.71\mu M$, similar al valor obtingut en aïllar mitocondris de fetge de rata.

Posteriorment a aquests estudis es publicà un model tridimensional *in silico* per a la proteïna CPT1A humana (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007), que confirmà els nostres resultats en rata. Donat que segons aquest model ambdós residus, Glu⁵⁹⁰ i Met⁵⁹³, conservats entre les espècies humana i de rata, estarien formant part d'un dels dos centres d'unió al malonil-CoA, es podria explicar així l'efecte sobre la sensibilitat a l'inhibidor observat en els mutants simples *Rat* CPT1A E590A i M593A, estudiats en aquest capítol.

La deleció dels primers 18 residus produí un enzim menys sensible a la inhibició per malonil-CoA en les proteïnes $\Delta 18$ +M593A i $\Delta 18$ +E590A+M593A *Rat* CPT1A, suggerint un paper dominant de l'efecte sobre la sensibilitat a l'inhibidor d'aquesta regió respecte l'efecte exercit per les posicions Glu⁵⁹⁰ i Met⁵⁹³ (Figura R.3). Una nova proposta conformacional per la CPT1A humana publicada recentment, confirmà aquest resultat (Rao, Warren et al. 2011) (Introducció, apartat III.3.1.4). Tal com discuteixen els autors en aquest estudi, probablement la manca dels primers 18 residus de la seqüència de l'enzim ($\Delta 18$ *Rat* CPT1A) estaria impeding la formació de l'hèlix $\alpha 1$, de manera que no és possible el canvi a la conformació N α de la regió aminoterminal, afavorint la interacció amb l'extrem carboxiterminal i resultant així en un enzim més actiu i menys sensible al malonil-CoA. Igualment, en localitzar el residu Met⁵⁹³ en aquest mateix model, s'observà que efectivament es trobava proper al lloc d'entrada de l'acil-CoA (on alhora també s'hi pot unir el malonil-CoA), interaccionant amb l'estructura N β formada en l'estat catalíticament actiu.

Cal destacar que quan es parla de canvi conformacional, no es parla de conformacions absolutes, sinó que molt probablement existeixen ambdues conformacions alhora, desplaçant-se l'equilibri cap a una estructura o una altra en funció de la fluïdesa de la membrana, de la

DISCUSSIÓ

curvatura d'aquesta (segons si la proteïna es troba als llocs de contacte de la membrana mitocondrial o a la membrana pròpiament), etc, com es discuteix també en l'anomenat treball.

La construcció $\Delta 18+E590A$ *Rat* CPT1A, però, presentà una IC_{50} al malonil-CoA intermitja a l'observada pels mutants simples, suggerint que el residu Glu⁵⁹⁰ no estaria interaccionant directament amb la regió N-terminal, sinó que cada determinant molecular exercia el seu efecte independentment, interaccionant amb estructures diferents que feien variar la sensibilitat a la inhibició.

2. Anàlisi de determinants moleculars de la inhibició de la CPT1B humana

La IC_{50} pel malonil-CoA de l'enzim CPT1B humà ($IC_{50}=0.096\mu M$) (Zhu, Shi et al. 1997; Shi, Zhu et al. 2000; Relat, Nicot et al. 2004) és ~10 vegades menor que el seu gen ortòleg en porc ($IC_{50}=0.804\mu M$) (Relat, Nicot et al. 2004), és a dir, l'enzim humà de múscul és molt més sensible a l'inhibidor que el porcí, fet que explicaria els alts nivells de β -oxidació muscular observats en el porc.

L'anàlisi dels valors d' IC_{50} obtinguts en expressar els mutants $\Delta 18$ i $\Delta 28$ *Pig* CPT1B en *P. pastoris* (Figura R.4), indicaren la presència d'un determinant positiu en els residus 1-18 però també la manca d'un determinant negatiu entre els residus 19 i 28, que expliqués la baixa sensibilitat de l'enzim porcí al malonil-CoA. Alternativament, el mateix tipus d'experiments realitzats en l'enzim humà ($\Delta 28$ *Human* CPT1B) resultaren en un enzim encara menys sensible ($IC_{50}=7.5\mu M$), que el mutant $\Delta 18$ ($IC_{50}=0.3\mu M$) (Shi, Zhu et al. 1998; Shi, Zhu et al. 2000).

Els resultats obtinguts indicaven que els determinants positius per a la sensibilitat al malonil-CoA es trobaven en diferents posicions en l'enzim de porc (residus 1–18) respecte a l'enzim humà (residus 18–28). Per contra, l'alt grau d'identitat en la seqüència de la regió aminoterminal d'aquestes dues proteïnes (Figura R.7) suggereix que les diferències entre els dos enzims podrien ser degudes a diferències en el *docking* entre els extrems amino- i carboxiterminal d'aquests enzims, o bé que algun altre element de la seqüència –com podrien ser els fragments TMs o el *loop* intermembrana- fa variar l'anclatge de les proteïnes a la membrana afectant així l'entrada de l'inhibidor al canal catalític. Els experiments de deleció de l'extrem N-terminal que s'han dut a terme expliquen les diferències en la sensibilitat al malonil-CoA entre els enzims CPT1B humà i de porc, però no el mecanisme.

Per tal de resoldre aquesta qüestió es generaren les construccions H50P i H128P, combinació dels primers 50 i 128 aminoàcids, respectivament, de l'enzim de porc amb la proteïna

DISCUSSIÓ

humana, i viceversa, per les construccions P50H i P128H (Figura R.5A). Resultats previs del nostre grup havien demostrat que tant el patró de migració electroforètica com la sensibilitat a l'inhibidor dels enzims CPT1A de porc i de rata venien determinats per la regió C-terminal de la proteïna (Nicot, Relat et al. 2002). L'anàlisi per *Western blot* anti-CPT1 de les quimeres aquí estudiades mostrarà que aquest fenomen també succeïa pels enzims CPT1B. Així, les quimeres H50P i H128P presentaren la mateixa mobilitat electroforètica que l'enzim *Human* CPT1B, i les quimeres P50H i P128H la mobilitat corresponent a *Pig* CPT1B (Figura R.5B).

Tots els enzims recombinants van ser actius, amb diferents graus de sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA, depenent del tamany de regió N-terminal que contenien (Figura R.6). Aquests resultats divergien dels obtinguts amb les construccions on s'havien intercanviat regions entre els enzims CPT1A de rata i porc (Nicot, Relat et al. 2002) o CPT1A de rata i CPT1B humà (Swanson, Foster et al. 1998; Jackson, Cameron et al. 2000), on la sensibilitat al malonil-CoA s'atribuï a la regió C-terminal de les proteïnes. Amb les dades obtingudes, es demostrà que la regió aminoterminal de CPT1B juga un paper crític sobre la sensibilitat a l'inhibidor malonil-CoA.

Donat l'elevat grau d'identitat, sobretot entre els primers 50 residus d'ambdues proteïnes (Figura R.7), vam pensar que en aquest cas, la sensibilitat de l'enzim a l'inhibidor dependria d'una interacció específica de l'extrem N-terminal amb la regió C-terminal dels enzims, molt menys conservada.

De fet, el mutant P50H, que combina els primers 50 residus de la CPT1B humana i els residus 51–773 de la CPT1B de porc (Figura R.5A), es correspon al mutant doble *Pig* E17D / I31V CPT1B, ja que la posició Val³¹ només es troba en humans. Cal destacar que el residu Glu¹⁷ és present en les seqüències de porc, ovella [també de baixa sensibilitat al malonil-CoA, (Price, Jackson et al. 2003)] i vaca, espècie on l'enzim no ha estat caracteritzat cinèticament.

Considerant que el metabolisme lipídic del porc difereix dels humans (Duée, Pégrier et al. 1994; Schmidt and Herpin 1998), i que les característiques cinètiques dels enzims recombinants de CPT1A i CPT1B de porc poden explicar aquestes peculiaritats (Nicot, Hegardt et al. 2001; Relat, Nicot et al. 2004), ens vam plantejar analitzar si la posició 17 de la seqüència proteica, la única diferència observada entre les seqüències porcina i humana (Asp¹⁷ en humans i Glu¹⁷ en porcs), podria ser la responsable de marcar aquestes diferències observades.

Així doncs, es van generar i expressar en *P. pastoris* dos mutants simples (*Pig* E17D i *Human* D17E) de CPT1B i es va determinar el seu grau d'inhibició pel malonil-CoA (IC₅₀), i la

DISCUSSIÓ

seva capacitat d'unió a la carnitina (K_m), paràmetres que difereixen clarament entre ambdós enzims *wild-type* (Relat, Nicot et al. 2004). Donada la putativa relació establerta entre la unió de la carnitina i el malonil-CoA a l'enzim (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007), es va determinar la sensibilitat a l'inhibidor (IC_{50}) a dues concentracions diferents de carnitina: 1mM (per tal de poder comparar els resultats amb altres publicacions), i a una concentració igual a la K_m de cada enzim per la carnitina (per tal de poder comparar els resultats entre mutants). Els resultats mostraren que el canvi en el residu Glu¹⁷ de *Pig* CPT1B afectava la seva afinitat per la carnitina i la inhibició per malonil-CoA (comportant-se com un determinant negatiu per a la inhibició), mentre que el canvi en la posició Asp¹⁷ de la CPT1B humana només afectava la inhibició per malonil-CoA (comportant-se com un determinant positiu, en aquest cas) (Figura R.9).

Segons aquests resultats, el mutant *Pig* E17D CPT1B mostrà les característiques cinètiques típiques d'un isotip CPT1B [alta K_m carnitina (605.95 μ M) i baixa IC_{50} pel malonil-CoA (0.297 μ M)], perdent les pròpies de l'enzim CPT1B de porc *wild-type*.

La importància del residu Asp¹⁷ en determinar la sensibilitat al malonil-CoA de la CPT1B humana no es correlaciona amb experiments de deleció de l'extrem aminoterminal en què la manca dels primers 28, però no 18, residus de l'enzim humà aboliren la inhibició per malonil-CoA (Shi, Zhu et al. 2000), però sí amb altres mutacions puntuals en aquesta regió que afecten la sensibilitat de l'enzim a la inhibició, com el residu Glu³ (Zhu, Shi et al. 2003), suggerint que la interacció aminocarboxiterminal es veu diferencialment afectada per una deleció o una substitució de càrregues. De tota manera, caldrien més estudis per entendre totalment el paper del residu Asp¹⁷ sobre la sensibilitat al malonil-CoA de l'enzim CPT1B humà.

Per contra, la posició Val³¹ en els enzims CPT1B humà i de porc sembla no tenir efecte sobre la sensibilitat al malonil-CoA, ja que els valors de IC_{50} observats en els mutants simples *Human* D17E CPT1B (IC_{50} =0.279 μ M) i *Pig* E17D CPT1B (IC_{50} =0.297 μ M) no presentaren diferències estadísticament significatives respecte els mutants dobles *Human* D17E/V31I CPT1B (quimera H50P, IC_{50} =0.19 μ M) i *Pig* E17D/I31V CPT1B (quimera P50H, IC_{50} =0.39 μ M). A més a més, el residu Val³¹ no es troba a la seqüència de CPT1B d'ovella, en què s'ha relacionat la regió N-terminal (residus 1–79) amb la baixa IC_{50} que presenta aquest enzim (Prentki and Corkey 1996).

Donat que la regió aminoterminal de la CPT1B de porc és capaç de modificar la sensibilitat al malonil-CoA de l'enzim humà (Figura R.6), proposem en aquest treball l'ús de

DISCUSSIÓ

l'enzim porcí com a eina per a l'estudi de les diferències moleculars entre els isotips muscular i hepàtic de CPT1, que determinen les característiques cinètiques d'aquests enzims.

Per primer cop en un enzim CPT1, una diferència tan petita entre aminoàcids com és la longitud de la cadena hidrocarbonada (de 4 a 5 àtoms de carboni), és capaç de fer canviar la sensibilitat de l'enzim pel seu inhibidor fisiològic. Per aquest motiu, ens vam plantejar com a següent aproximació experimental ubicar el residu 17 en el model 3-D més recentment publicat de l'enzim CPT1A humà (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007). En situar-hi l'aminoàcid Asp¹⁷, però, aquest no es trobava orientat cap a l'extrem carboxiterminal de l'enzim, essent estèricament improbable una interacció intramolecular entre aquest residu 17 i la regió C-terminal de la proteïna. Una explicació per aquest fet podria ser que ambdós isotips, hepàtic i muscular, presentin plegaments diferents en l'espai. Una segona hipòtesi, i considerant les últimes dades publicades sobre la formació d'oligòmers de la CPT1A de rata (Faye, Esnous et al. 2007; Jenei, Borthwick et al. 2009), els nostres resultats es podrien explicar si el residu Asp¹⁷ interacciona amb una molècula CPT1 adjacent en l'estructura quaternària predita. Hi ha evidència experimental, però, que demostra que CPT1B no oligomeritza (Dr. Victor Zammit, comunicació personal). Per tant, ens vam plantejar realitzar una predicció estructural *in silico* de l'enzim CPT1B humà.

3. Estructura tridimensional de la CPT1B humana

Un dels mètodes més utilitzats per tal de conèixer l'estructura tridimensional atòmica de les proteïnes és la cristal·lografia de raigs X, que consisteix en l'anàlisi del patró de difracció que presenta el cristall d'una proteïna en irradiar-la amb raigs X (Heinemann, Illing et al. 2001). Així és com l'any 1958 es va descriure la primera estructura cristal·lina d'una proteïna: la mioglobina (Kendrew, Bodo et al. 1958). Més recentment, aquesta tècnica ha permès identificar, per exemple, la proteïna piruvat decarboxilasa com un enzim que forma dímers que alhora s'organitzen en tetràmers, i s'han pogut identificar els residus importants per a l'activitat catalítica de l'enzim (Furey, Arjunan et al. 1998).

Per dur a terme aquesta tècnica, cal que la proteïna es trobi en una puresa del 90-95%, lliure d'estructures cel·lulars i en una qualitat que garanteixi l'adequada formació del cristall. En el cas de les proteïnes de membrana, com canals iònics o receptors acoblats a proteïnes G, la seva estructura es pot veure alterada en modificar les proteïnes annexes amb les quals estableixen interaccions, o l'entorn lipídic que les estabilitza. En aquests casos la formació del cristall és de gran dificultat, i sovint l'estructura final no és representativa de l'estat natiu de la proteïna

DISCUSSIÓ

(Friedmann, Messick et al. 2001). Tot i així, s'han descrit protocols per a l'obtenció de cristalls de proteïnes de membrana, sempre i quan siguin estables en preparacions pures i monodisperses i en el detergent adequat (Garavito, Picot et al. 1996; Lévy, Mosser et al. 1999).

Fins al moment, però, les CPT1 només s'han pogut aïllar de la membrana mitocondrial després d'un tractament agressiu amb detergents (Esser, Britton et al. 1993), resultant en una pèrdua de l'activitat catalítica de l'enzim i probablement de la seva estructura tridimensional (Woeltje, Kuwajima et al. 1987). De tota manera, i considerant que el domini catalític de CPT1A comparteix aproximadament un 30% d'identitat de seqüència amb altres aciltransferases, com poden ser la Carnitina Acetiltransferasa (CrAT) (Lian, Govindasamy et al. 2002; Jogl and Tong 2003; Wu, Govindasamy et al. 2003), la Carnitina Octanoïltransferasa (COT) (Jogl, Hsiao et al. 2005) i la Carnitina Palmitoïltransferasa 2 (CPT2) (Hsiao, Jogl et al. 2006), les estructures 3-D de CPT1 descrites fins al moment s'han dissenyat per homologia amb els cristalls de les proteïnes citades. La gran diferència que presenten aquests enzims respecte la CPT1 és la manca dels segments transmembrana de la regió aminoterminal, de manera que es poden aïllar fàcilment del compartiment cel·lular on es troben ubicats sense alterar-ne massa la seva conformació.

Donat que els models 3-D descrits fins al moment es corresponien a la seqüència de CPT1A, i donada la diferència en les característiques cinètiques que presenten ambdós isotips, ens vam proposar realitzar un nou model 3-D per CPT1B.

3.1. Model estructural preliminar

Per tal d'identificar possibles interaccions moleculars que poguessin determinar el grau de sensibilitat al malonil-CoA en el nostre model de CPT1B humana, vam buscar els residus més propers de l'extrem amino- i carboxiterminal que, per les característiques físicoquímiques que presentaven, poguessin estar formant ponts salins entre ells. Així, s'identificaren les parelles de residus Asp¹⁷ i Lys⁵⁶¹, Arg²² i Glu⁴³³, Arg²⁵ i Glu⁵⁰⁰ com a possibles punts d'interacció.

A continuació, i amb l'objectiu de validar el model, ens vam proposar realitzar mutacions puntuals que intercanviessin l'aminoàcid objecte d'estudi per l'aminoàcid amb què aquest putativament interaccionava, generant els constructes D17K, K561D, R22E, E433R, R25E i E500R *Human* CPT1B. En cas que les interaccions predites fossin certes, estariem generant enzims que tindrien una repulsió intramolecular estèrica i, per tant, amb una possible desestabilització del plegament de la proteïna, donant lloc a alteracions en les seves constants d'afinitat als substrats i inhibició. En cas que el doble mutant, resultant de l'intercanvi de residus

DISCUSSIÓ

que interaccionarien entre ells, recuperés les constants del *wild-type*, es confirmaria que efectivament aquesta interacció és real i afecta la funció de l'enzim. Aquest tipus d'experiments, o experiments de *swapping*, són utilitzats recurrentment per tal de validar models estructurals i localitzar interaccions intramoleculares (Pazos, Helmer-Citterich et al. 1997; O'Neill, Kim et al. 2001; Carettoni, Gómez-Puertas et al. 2003; López-Viñas, Bentebibel et al. 2007; Siggers, Soto et al. 2007).

En analitzar la constant IC_{50} dels diferents constructes generats, observàrem que cap dels enzims generats mostrà diferències en la sensibilitat per l'inhibidor malonil-CoA (Taula R.3), indicant que els residus analitzats no estarien implicats en interaccions entre la regió amino- i carboxiterminal de l'enzim que determinessin la sensibilitat a l'inhibidor. Cal dir que no es determinaren les constants del mutant *Human R22E CPT1B*, ja que no es pogué expressar en el sistema escollit. De tota manera, i donat que l'objecte d'estudi en aquest cas era la putativa interacció entre els residus Arg²² i Glu⁴³³, el resultat del mutant simple *Human E433R CPT1B* ja ens donava informació parcial sobre aquesta possible interacció.

L'estudi preliminar de la K_m per la carnitina mostrà que les mutacions introduïdes no afectaven el grau d'afinitat per la carnitina de l'enzim CPT1B humà (Taula R.3). Coneixent l'alta reproducibilitat dels assajos CPT1 en el nostre laboratori, i donat que en aquest experiment en concret es consumeix gran quantitat de radioactivitat amb els corresponents residus i costos que això suposa, vam decidir no seguir analitzant l'afinitat per la carnitina de la resta d'enzims generats.

No obstant, cal indicar que s'observen tendències consistents en la resposta de la sensibilitat al malonil-CoA en certes mutacions. Per exemple, el canvi de la posició Asp¹⁷ a lisina (mutant *Human D17K CPT1B*) disminueix el valor de l' IC_{50} en un factor lleugerament inferior a 2 respecte l'enzim *wild-type* ($IC_{50}=0.057\mu M$ vs. $0.096\mu M$ del *wt*), mentre que la mutació d'aquesta mateixa posició a glutamat dona lloc a un increment en un factor de 3 el valor de l' IC_{50} (mutant *Human D17E CPT1B*, $IC_{50}=0.279\mu M$) (Relat, Pujol-Vidal et al. 2009). Aquest fet suggereix la possible interacció entre el residu Asp¹⁷ de l'extrem N-terminal amb un residu carregat positivament de l'extrem C-terminal, que al seu torn incrementaria lleugerament l'estabilitat de la unió entre l'acil-CoA i la regió C-terminal. Així, la substitució per glutamat (igualmente carregat negativament) permetria una millor interacció entre càrregues oposades, estabilitzant per tant la interacció entre els extrems N- i C-terminal, mentre que la substitució per lisina (carregat

DISCUSSIÓ

positivament) desestabilitzaria la interacció, i per tant comportaria un afebliment en la unió de CoA respecte al *wild-type*, fent l'enzim més sensible a l'inhibidor.

Aquests resultats suggereixen de nou que el *docking* entre l'extrem amino- i carboxiterminal juga un paper important en determinar la sensibilitat de l'enzim CPT1B humà al malonil-CoA i que les diferències en els paràmetres enzimàtics amb l'enzim porcí radiquen no només en la posició 17, sinó també en l'extrem carboxil.

El model 3-D publicat per CPT1A, doncs, no és aplicable a CPT1B, fet que es correspon amb la diferència que presenten ambdós enzims en les seves constants cinètiques. A més a més, l'estructura 1TF3 utilitzada per al plegament de la regió N-terminal comparteix només un 26% d'identitat de seqüència amb la CPT1B humana, mentre que per l'isotip hepàtic la identitat és del 47%.

De tota manera, i considerant que les mutacions realitzades són canvis tan importants com un intercanvi de càrregues, podem dir que d'aquest estudi s'extreu informació rellevant que permet avançar en la comprensió del mecanisme de regulació de l'enzim CPT1B humà pel malonil-CoA, així com de les seves diferències respecte CPT1A. De fet, dues de les posicions analitzades, Arg²² i Lys⁵⁶¹, conservades en ambdós isotips, s'havien mutat prèviament en l'isotip hepàtic de rata donant lloc a canvis en la seva sensibilitat per l'inhibidor (Jackson, Price et al. 2001; López-Viñas, Bentebibel et al. 2007), i reflectint de nou les diferències de plegament entre les dues proteïnes.

3.2. Model revisat de la interacció entre les regions amino- i carboxiterminal

Les estructures corresponents a la regió aminoterminal escollides per al modelatge realitzat en aquesta segona aproximació experimental compartien una identitat de seqüència del 15-27% amb els primers 50 residus de la CPT1B humana, valors inferiors al límit requerit per obtenir un model que s'ajusti a la realitat. Tot i això, s'empraren aquestes davant la manca d'estructures amb major identitat de seqüència a l'enzim disponibles en el moment de la recerca.

El baix nombre d'estudis estructura-funció de l'isotip muscular de CPT1, comparat amb l'isotip hepàtic, ens obligà a restringir la construcció del model a evidències experimentals realitzades amb aquest últim isotip, comprovant sempre que es tractés de posicions conservades en ambdós enzims CPT1A i CPT1B humans.

DISCUSSIÓ

L'estructura finalment escollida per al modelatge de la regió aminoterminal (3CNW), era la única que mantenia les restriccions introduïdes al programa *Haddock*, i era l'estructura més estable de les tres analitzades, després de sotmetre-les a una simulació de dinàmica molecular (*software Mare Nostrum*).

La disposició en una sola hèlix alfa dels residus 25 al 50 era un fet diferencial de l'estructura aquí presentada respecte l'anterior model de CPT1A, que establia 4 fulles beta dels residus 12 al 37 i una hèlix alfa dels residus 38 al 47 (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007). Tot i això, el nostre model ha estat posteriorment corroborat per l'estructura d'NMR publicada recentment pel Dr. Victor Zammit i col·laboradors (Rao, Warren et al. 2011), amb el qual coincidien en l'hèlix alfa dels residus 25 al 39 (Introducció, apartat III.3.1.4). Aquest últim model, a més a més, ens ajudà a orientar en l'espai les dues fulles beta preliminarment predites pels residus 11-23. De manera que, globalment, els estudis realitzats permeten extreure les següents consideracions:

1. L'estructura emprada per la regió N-terminal de CPT1B humana consisteix en dues fulles beta, que comprenen els residus 11-14 i 20-23, així com una extensa regió helicoïdal, que inclou els residus 26-51.

2. El model estructural finalment proposat es basa en la interacció de l'hèlix que comprèn els residus 26-51 sobre l'extrem C-terminal al llarg d'un eix que implicaria els residus Lys⁵⁶¹ i Cys⁵⁰⁴ en les zones distals de l'hèlix (Figura D.2). Aquesta interacció ha estat predita pels estudis de *docking* i concorda amb les dues evidències experimentals disponibles: a) l'absència d'un canvi significatiu en l'activitat enzimàtica quan s'aplica l'experiment de *swapping* entre els residus Asp¹⁷ i Lys⁵⁶¹, i b) la proximitat espacial que ha d'existir entre els residus Lys⁴⁷ i Cys⁵⁰⁴, segons l'estudi publicat per Faye i col·laboradors entre una lisina de la regió amino i una cisteïna de la regió carboxiterminal (Faye, Borthwick et al. 2005).

DISCUSSIÓ

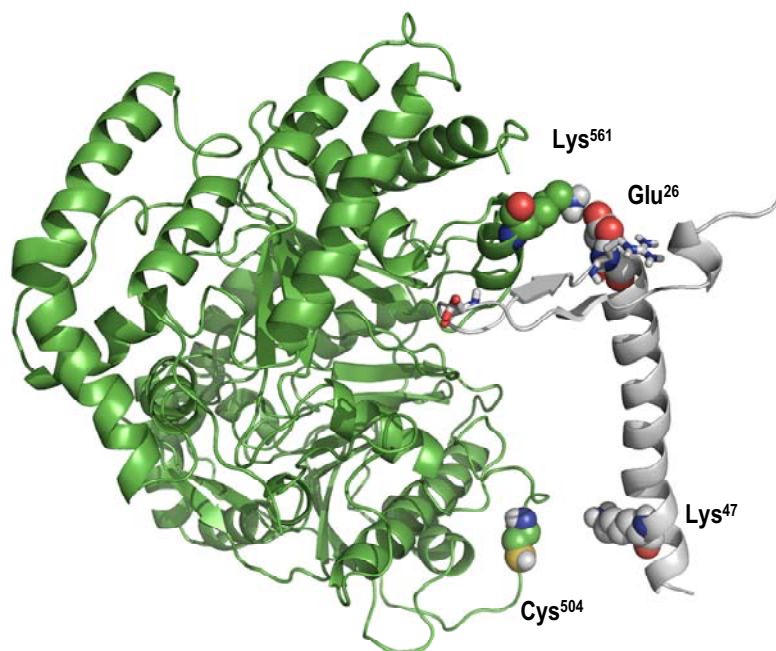


Figura D.2. Proposta definitiva de model 3-D de la CPT1B humana. Representació en forma de cintes dels residus (167-773) que formen l'esquelet de la regió C-terminal de la CPT1B humana (verd) formant un complex amb un nou model de l'extrem aminoterminal (gris). S'indiquen amb esferes les interaccions que presenta el model, i amb bastons les posicions Asp¹⁷ i Arg²⁵.

3. S'assumeix que la posició relativa de les dues fulles beta es manté generalment inalterada en l'entorn biològic. Aquesta hipòtesi estaria recolzada per l'estabilitat conferida pels ponts d'hidrogen entre grups de l'esquelet peptídic dels parells de residus Phe¹² i Leu²³ així com Val¹⁴ i Phe²¹, a més dels ponts d'hidrogen entre el grup carboxil de Asp²⁰ i el grup hidroxil de Thr¹⁵ (Figura D.3).

4. D'altra banda, si s'assumeix la configuració relativa entre les fulles beta i l'hèlix alfa observada a l'estructura cristal·logràfica, el segment de residus Asp¹⁷-Thr¹⁵ es col·locaria directament sobre la unitat adenina del CoA, protegint el CoA del contacte directe amb el solvent aquós. Per tant, cal esperar que aquelles interaccions que millorin el *docking* entre els extrems N- i C-terminal, hauran d'estabilitzar la unió de l'acil-CoA en impedir la seva sortida a l'entorn aquós, i per tant l'enzim hauria d'esdevenir menys sensible a l'acció de malonil-CoA. D'altra banda, si un canvi afebleix la interacció entre les regions N- i C-terminal, cal esperar que l'acil-CoA estigui menys protegit i per tant l'enzim esdevindria més sensible al malonil-CoA.

DISCUSSIÓ

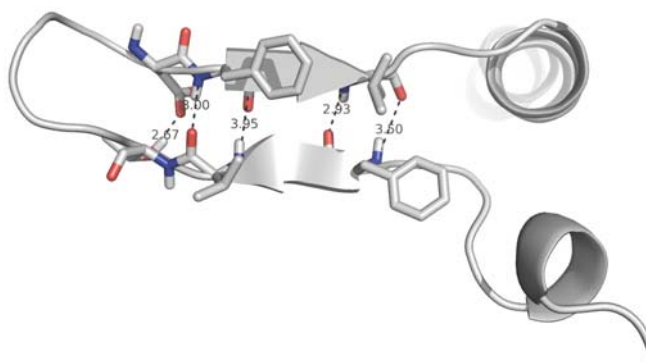


Figura D.3. Visió ampliada de les dues fulles beta de la regió aminoterminal de la CPT1B humana. Representació en forma de cintes de les dues fulles beta de la regió N-terminal de la proteïna, corresponents als residus 11-14 i 20-23. S'indiquen amb bastons els residus que estableixen l'estructura per ponts d'hidrogen i les distàncies a què es troben. Aquesta regió manté un angle d'uns 90° respecte l'hèlix alfa que comprèn els residus 26-51 (situada a l'extrem superior dret de la figura).

Segons el model proposat, el residu Arg²⁵ no estableix cap interacció amb l'extrem C-terminal. No obstant, la mutació a glutamat pot provocar una competència entre aquest residu i la posició Glu²⁶ per interaccionar amb el residu Lys⁵⁶¹, fet que podria afectar al correcte posicionament de l'extrem N-terminal i per tant fer l'enzim lleugerament més sensible al malonil-CoA (Taula R.3).

D'altra banda, la posició Glu⁴³³ no participa directament en la regió d'interacció segons aquest model, fet que explica que no s'observin diferències en la sensibilitat a l'inhibidor. Igualment, la posició Glu⁵⁰⁰ es troba en un *loop*, allunyat de la Lys⁴⁰, sent raonable que no tingui cap efecte sobre el grau d'inhibició per malonil-CoA. Finalment, la mutació K561D pot compensar la repulsió iònica que apareix amb el residu Glu²⁶ (negatiu-negatiu) tot establint una nova interacció amb la càrrega positiva de l'Arg²⁵ (canviant la interacció nativa E26-K561 per R25-K561D). Aquest resultat contrasta amb les observacions fetes en CPT1A, on el mutant E26K produí una important pèrdua de sensibilitat de l'enzim a la inhibició per malonil-CoA (López-Viñas, Bentebibel et al. 2007). Com s'observa a la figura R.7, els isotips A presenten una histidina (càrrega neutra) enlloc d'una arginina (càrrega positiva) en la posició 25, que no pot compensar la interacció amb la Lys⁵⁶¹ i desestabilitza per tant les interaccions intramoleculares de la proteïna.

El model generat permet, a més a més, explicar les observacions sobre la sensibilitat en construccions prèviament generades. Així, la deleció dels 18 primers aminoàcids impedeix l'estabilització de la segona fulla beta per la manca dels ponts d'hidrogen. Artefactualment, però,

DISCUSSIÓ

la posició 18 és un metionina (inici transcripció de la proteïna delecionada) capaç d'interaccionar amb l'acil-CoA i resultant així en un enzim 4 vegades menys sensible a la inhibició. A més, la manca de la primera fulla beta dóna més mobilitat de torsió i és més fàcil que apareguin altres interaccions. D'altra banda, en delecionar els 28 primers residus de la proteïna, la manca de les dues fulles β antisentit confereix una major mobilitat a la posició Lys²⁹, que pot interaccionar fortament amb l'acil-CoA, fent així l'enzim 100 vegades menys sensible al malonil-CoA (Shi, Zhu et al. 2000).

L'alineament dels primers residus d'ambdós isotips hepàtics i musculars de CPT1 mostra un canvi d'aminoàcid en la posició 30 (Figura R.7), de glutamina en CPT1A a histidina en CPT1B. Rao i col·laboradors van descriure que la interacció S24-Q30 era important per al manteniment de l'estabilitat de la regió N-terminal en CPT1A (Rao, Warren et al. 2011), de manera que aquest pot ser un altre punt important de distinció en el plegament entre ambdós isotips que podria explicar les diferències en el comportament cinètic que presenten.

L'alineament de seqüències dels isotips hepàtic i muscular de CPT1 entre diferents espècies mostrà que les regions menys conservades es trobaven en els fragments TM i la regió intermembrana. De fet, s'ha descrit que el fragment TM2 és el responsable de l'oligomerització de l'enzim *Rat* CPT1A (Jenei, Borthwick et al. 2009), i que la mutació dels motius GXXXG(A) augmenta la sensibilitat de l'enzim al malonil-CoA (Jenei, Warren et al. 2011), convertint-lo doncs, en una CPT1 amb una cinètica més semblant a un isotip muscular que a un hepàtic. El fet que CPT1B no conservi els anomenats motius d'oligomerització, fa pensar que l'enzim no s'associa en complexos i que aquest podria ser un altre factor responsable de la diferència de comportament cinètic entre isotips. Es relacionaria així, doncs, un estat monomèric de l'enzim amb una alta sensibilitat a l'inhibidor, mentre que la formació de trímers o hexàmers que es dóna en CPT1A es correspondria a un estat de baixa sensibilitat al malonil-CoA.

En contra d'aquesta hipòtesi, però, es pot observar que la seqüència del TM2 de l'enzim *Pig* CPT1A, d'alta sensibilitat al malonil-CoA, també presenta els anomenats motius d'oligomerització (Figura I.15) (Nicot, Hegardt et al. 2001). A més, diferents evidències experimentals amb quimeres entre isotips hepàtics i musculars mostren que, tot i conservar el TM2 de l'isotip hepàtic, es poden generar enzims amb alta sensibilitat a l'inhibidor (Jackson, Cameron et al. 2000; Nicot, Relat et al. 2002).

DISCUSSIÓ

Analitzant la seqüència primària de la proteïna, s'observa que el TM1 és més llarg que el TM2, que presenta el mínim nombre de residus necessari per travessar la membrana perpendicularment. Aquest fet pot explicar que la regió N-terminal presenti mobilitat respecte la membrana i, per tant, respecte la regió C-terminal, i que depenent de la fluïdesa de la membrana les interaccions que s'estableixen entre ambdues regions siguin diferents. A més a més, ambdós isotips A i B presenten baixa identitat de seqüència proteica en els segments TMs, focalitzant de nou la importància d'aquestes regions en explicar les diferències de plegament i comportament cinètic entre CPT1A i CPT1B.

Com a fet destacable, el nostre model mostrà una tendència a l'estabilització de l'extrem N-terminal a la cara contrària respecte el model de López-Viñas i col·laboradors, és a dir, al lloc d'unió "O". Aquestes observacions concorden amb la posterior predicció de Rao i col·laboradors per CPT1A, on també es contemplà el *docking* de l'extrem N-terminal al lloc d'unió a la carnitina, i ens feren plantejar la hipòtesi que aquest fos un fet diferencial del comportament cinètic de CPT1A respecte CPT1B.

II. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE *Cpt1c* I ESTUDI DE LA PROTEÏNA

Com ja s'ha indicat en altres apartats, la poca informació disponible sobre CPT1C a l'inici d'aquest treball ens va fer plantejar com uns dels principals objectius estudiar els possibles mecanismes que controlarien l'expressió gènica de la *CPT1C* i alhora determinar quina podria ser la seva funció fisiològica.

En el treball de Price i col·laboradors, i mitjançant l'anàlisi dels nivells d'expressió de l'mRNA per la tècnica de *Northern blot*, es detectà una bona expressió del gen *Cpt1c* en gairebé totes les estructures del SNC de rata, seguint un patró d'expressió molt semblant al del gen *Cpt1a* (Price, van der Leij et al. 2002). Considerant que el cervell no és un teixit que típicament consumeixi àcids grassos de cadena llarga, la identificació d'una proteïna CPT1 en el cervell va plantejar la qüestió sobre quin podia ser el seu paper. Es coneix que CPT1C uneix malonil-CoA, que al seu torn s'ha postulat com una molècula senyalitzadora de l'estat energètic cel·lular en hipotàlem (Lane, Wolfgang et al. 2008).

1. Estudi de la regulació transcripcional de *Cpt1c*

Per a l'estudi de la regulació *in vivo* del gen vàrem analitzar els nivells d'mRNA en hipotàlem, regió del SNC que juga un paper fonamental en la regulació de la ingesta i el desgast energètic (Abizaid, Gao et al. 2006; Coll, Farooqi et al. 2007).

Està descrit que en ratolins dejunats durant 24 hores, la via de la insulina en hipotàlem es troba apagada, FoxA2 es troba desfosforilat i actiu en el nucli cel·lular, induint l'expressió de gens diana com els pèptids orexigènics (*Pmch* i *Hcrt*, que codifiquen per MCH i Orexina) i gens d'oxidació d'àcids grassos (*Cpt1*, *Mcad*, *Vicad*) (Silva, von Meyenn et al. 2009). Paral·lelament, els ratolins dejunats 24 hores no presentaren canvis en els nivells d'expressió de *Cpt1c*, ni *Cpt1a*, tot i que aquest darrer mostrava una lleugera tendència a l'alça (Figura R.13). Aquests resultats van en la mateixa direcció que observacions anteriors fetes en còrtex frontal, diencèfal i glàndula pituïtària de rates dejunades durant 36 hores, on tampoc s'observaren canvis significatius en l'expressió de *Cpt1a* i *Cpt1c* i sí en els nivells de *Hmgcs2* (König, Rauer et al. 2009).

D'altra banda, Poplawski i col·laboradors observaren un augment en l'expressió de *Cpt1a* d'unes 1.3 vegades en animals dejunats respecte els animals alimentats *ad libitum*, i una disminució d'aproximadament el 50% en els nivells d'mRNA de *Cpt1c* que es mantenia fins a 4 hores després de realimentar els animals. (Poplawski, Mastaitis et al. 2010). El fet que els animals en aquest cas haguessin estat dejunats durant 48 hores, suggereix que la regulació de *Cpt1c* per dejuni pugui requerir de més temps d'iniciació i depengui d'algun dels mecanismes que s'activen en un dejuni prolongat. Així per exemple, en el cas del neuropèptid NPY, s'ha descrit que no és fins passades 24 hores de dejuni que les neurones NPY augmenten l'excitabilitat i inicien els seus efectes (Takahashi and Cone 2005), i fins passades 48 hores de dejuni no s'observa una regulació del gen *NPY* (Mizuno, Makimura et al. 1999).

De tota manera, els nostres resultats *in vivo* es reforçaren quan, *in vitro*, en la línia neuronal Neuro2A i en resposta a un tractament amb forskolina, el gen *Cpt1c* no veia alterada la seva expressió i, de nou, *Cpt1a* presentava una tendència a la inducció, encara que no significativa (Figura R.17).

Existeix certa controvèrsia sobre quin és l'efecte de les dietes cetogèniques (amb un alt contingut en àcids grassos i molt baix contingut en hidrats de carboni) sobre la gana i el pes corporal en pacients obesos (Dashti, Mathew et al. 2007; Johnstone, Horgan et al. 2008). Els

DISCUSSIÓ

estudis coincideixen, però, en què la major part dels efectes d'aquestes dietes són deguts als nivells sèrics de cossos cetònics, responsables de la resposta dels diferents òrgans per mantenir l'homeòstasi perifèrica de glucosa i energia.

Considerant la relació establerta entre el gen *Cpt1c* i el control de la ingesta i el pes corporal (Wolfgang, Kurama et al. 2006), ens vam plantejar la hipòtesi que els cossos cetònics poguessin regular l'expressió de *Cpt1c*, essent aquest un dels mecanismes pel qual els cossos cetònics exerceixin el seu efecte sobre el pes corporal.

Per aquest motiu vam analitzar els nivells de missatge de *Cpt1c* en resposta al dejuni en ratolins als quals se'ls havia interferit l'expressió del gen *Hmgcs2* en fetge i presentaven nivells disminuïts de cossos cetònics circulants i una major pèrdua de pes corporal que els animals control, igualment dejunats. El resultat indicà, però, que no existia una correlació entre els nivells de cossos cetònics circulants i l'expressió del gen *Cpt1c* (Figura R.14). De tota manera, aquest resultat no descarta que els efectes de CPT1C sobre la ingesta puguin donar-se en resposta als cossos cetònics, però sense alterar els seus nivells d'mRNA.

Es coneix que AKT és fosforilada i així activada posteriorment a la unió de la insulina al seu receptor (Alessi, James et al. 1997), donant lloc a l'activació o inhibició de diferents vies amb efectes sobre el metabolisme així com la supervivència i proliferació cel·lular. S'ha descrit l'expressió de la proteïna en cervell, en l'ordre AKT3>AKT1>AKT2 entre les diferents isoformes descrites de la proteïna, i que AKT3 s'expressa majoritàriament en còrtex i hipocamp. L'efecte principal es troba relacionat amb el metabolisme de la glucosa en resposta a insulina i factors de creixement, però també a la supervivència i regeneració neuronal (Namikawa, Honma et al. 2000), motiu pel qual AKT s'ha validat com un bon *target* per al tractament de malalties com Parkinson o Alzheimer.

Per tal d'analitzar què succeïa *in vitro* amb l'expressió endògena dels gens d'estudi en una situació similar a la realimentació, s'infectaren cèl·lules Neuro2A amb un adenovirus que codificava per l'AKT1-HA constitutivament activa, mantenint-les en un medi de cultiu amb molt baixa concentració en sèrum (1%FBS). Segons el treball de Silva i col·laboradors, AKT provocaria la fosforilació de FoxA2, mantenint-lo inactiu en el citoplasma cel·lular, de manera que gens d'oxidació lipídica com *Cpt1a* veurien la seva expressió reprimida. En el nostre model de treball, no s'observaren canvis en els nivells d'mRNA de *Cpt1a* ni *Cpt1c*, tot i haver validat la infecció de les cèl·lules per *Western blot* amb l'anticòs anti-HA (Figura R.18). Aquest fet plantejà

DISCUSSIÓ

la possibilitat que aquesta línia neuronal no expressés el factor de transcripció FoxA2 i la cascada de senyalització insulina-AKT1-FoxA2 es trobés inactiva. Experiments de transfecció transitòria en una línia heteròloga on aquesta via fos funcional podrien resoldre aquesta qüestió, tal i com es presenta més endavant.

A part de la possible no funcionalitat de la via cal també dir que la baixa concentració en sèrum del medi de cultiu en aquest experiment hauria de mantenir apagada la via d'AKT, i activar-se només com a resultat de la infecció amb l'adenovirus d'AKT1 constitutivament actiu. Observant el resultat de la immunodetecció amb l'anticòs P-AKT, capaç de detectar qualsevol de les tres isoformes d'AKT fosforilades, podríem pensar que alguna de les isoformes es trobava activa (Figura R.18A). Aquest fet podria emascarar els nostres resultats, i impedir visualitzar la repressió del gen *Cpt1a* anteriorment descrita (Silva, von Meyenn et al. 2009).

2. Clonatge i caracterització del promotor del gen *CPT1C* humà

L'anàlisi *in silico* de la regió 5' del gen *CPT1C* humà mostrarà una manca de regions reguladores, com són les caixes TATA o la seqüència *Inr* localitzades normalment prop de l'inici de la transcripció, que identificarien el punt d'inici de lectura de la RNA polimerasa II. Probablement, aquest fet provoca que no hi hagi un inici de transcripció precís, sinó que l'alineament d'ESTs anotats per aquest gen presenta diferents nucleòtids possibles de ser l'inici de transcripció (Figura R.19). De fet, l'estudi dels mínims elements necessaris per generar una activitat promotora confirmà aquesta imprecisió, ja que, com s'observa a la figura R.20, no hi havia cap regió que en perdre's eliminés completament la transactivació del gen reporter, indicant que no hi havia cap element clau en induir l'activitat promotora de la regió amplificada. Tot i així, la major pèrdua en la capacitat de transactivació del fragment clonat es donà en delectonar la regió -401 a -37, on podrien situar-se les senyals més importants per posar en marxa la maquinària de transcripció.

Tenint en compte aquests resultats vam considerar que efectivament la regió del gen clonada com a regió promotora del gen *CPT1C* humà presentava activitat transactivadora del gen reporter, indicant que, efectivament, la regió 5' del gen *CPT1C* humà (-916/+41) contenia elements que regulaven la transcripció del gen i era vàlida per a l'estudi dels elements que regulaven la seva expressió.

Silva i col·laboradors havien demostrat, mitjançant experiments de transfecció transitòria i d'immunoprecipitació de cromatina, que FoxA2 era capaç d'unir-se a la regió promotora i induir

DISCUSSIÓ

la transactivació de gens orexigènics com *orexin* i *MCH* (que augmenten la sensació de gana) en hipotàlem de ratolins dejunats. A més, la injecció a l'hipotàlem d'un adenovirus de FoxA2 constitutivament actiu produí un augment dels nivells d'mRNA de gens relacionats amb l'oxidació d'àcids grassos, com *Cpt1a*, *Vlcad* i *Mcad*, tot i que sense demostrar en aquest cas la unió directa del factor sobre aquests promotors (Silva, von Meyenn et al. 2009). En aquest context, la identificació *in silico* d'un element de resposta a FoxA2 en la regió promotora del gen *CPT1C* humà ens semblà interessant i per això en vam estudiar la funcionalitat. El resultat de transfeccions transitòries en cèl·lules HeLa demostrà que, efectivament, hi havia una clara activació (unes 8 vegades) del promotor del gen *CPT1C* humà per FoxA2, així com del gen *CPT1A* humà, que validà l'experiment (Figura R.21). L'absència de resposta obtinguda en la línia neuronal Neuro2A, doncs, podria ser deguda a la manca d'expressió del factor de transcripció FoxA2, com havíem postulat. Tot i els resultats positius de transactivació, aquest element semblava no ser l'únic responsable d'aquesta resposta ja que una delecció del promotor que eliminava aquesta putatiu element de resposta continuava sent capaç d'induir la transactivació del gen reporter luciferasa.

En un *screening* de tot el genoma murí, s'ha vist que FoxA2 és capaç d'unir-se a elements de resposta que no segueixen la seqüència consens descrita, amb menor afinitat pel factor, però igualment funcionals (Tuteja, Jensen et al. 2008). Donat que aquests estudis van ser realitzats en ratolí, no vam poder comprovar el resultat sobre el gen *CPT1C* humà, però se'ns plantejà la possibilitat que FoxA2 estigui induint la transactivació del gen unint-se a un element de molt poca similitud respecte la seqüència consens, i per aquest motiu el software *in silico* utilitzat no el localitza.

Un altre dels mecanismes de resposta al dejú descrits és la via AMPc-PKA-CREB, on CREB s'activa per fosforilació sent capaç aleshores de regular l'expressió dels seus gens diana (Gonzalez and Montminy 1989). Per tal de comprovar si el gen *CPT1C* era diana d'aquesta cascada de senyalització, es va co-transfectar CREB amb la regió promotora del gen *CPT1C* humà, resultant en una inducció del gen reporter 3 vegades major que la inducció observada pel vector control, pGL3b (Figura R.22), confirmant que, de nou, els resultats *in vivo* sobre el gen endogen no es correlacionaven amb els resultats obtinguts en sistemes d'expressió heteròlegs amb el promotor transfectat. De tota manera, l'activació del promotor de la *Cpt1a* de rata, gen diana de CREB (Louet, Hayhurst et al. 2002), validà l'experiment i ens va permetre concloure que efectivament CREB activava transcripcionalment *CPT1C*.

DISCUSSIÓ

Tot i això, no vam poder afirmar que els putatius elements CRE identificats *in silico* fossin funcionals, ja que ni la deleció ni la mutació d'aquests van disminuir la inducció exercida per CREB sobre el promotor de *CPT1C* humana (Figura R.22). Alternativament, ens plantejem la possibilitat que tant FoxA2 com CREB estiguin induint la transactivació del gen a través d'un mecanisme indirecte, actuant com a co-factors d'altres factors de transcripció.

3. Anàlisi de l'estructura de la CPT1C humana

El fet que l'estructura primària de CPT1C conservi més d'un 50% d'identitat de seqüència amb els isotips hepàtic i muscular de la mateixa proteïna ha fet pensar que tindrien la mateixa funció i adoptarien la mateixa conformació. Tal com es mostra a la Figura R.31, CPT1C conserva tant l'histidina catalítica (His⁴⁷³) com les regions d'unió al Coenzim A i a la carnitina descrites per CPT1A. A més a més, una predicció estructural preliminar de CPT1C construïda per homologia amb el cristall de l'enzim COT (Jogl, Hsiao et al. 2005), suggeria que el tamany del *pocket* d'unió era suficient per acollir-hi un acil-CoA de cadena llarga (Wolfgang, Cha et al. 2008), suggerint així que la proteïna podia tenir activitat carnitina palmitoiltransferasa, teòricament. Les evidències experimentals, però, mostraren una clara controvèrsia sobre la funció i distribució subcel·lular de CPT1C, fet que ens va fer pensar en la possibilitat que la proteïna adoptés una conformació diferent respecte els isotips CPT1A i CPT1B.

S'ha descrit que l'enzim *Rat* CPT1A s'associa en forma d'oligòmers a la membrana mitocondrial, i que la regió TM2 té un paper fonamental en determinar aquesta associació (Faye, Esnous et al. 2007; Jenei, Borthwick et al. 2009). De fet, recentment s'ha demostrat que aquesta regió és un determinant molecular de la sensibilitat al malonil-CoA de la proteïna, donat que canvis en la seqüència del TM2 alteren el grau de sensibilitat a la inhibició de l'enzim (Jenei, Warren et al. 2011). La predicció estructural de la regió TM2 de *Rat* CPT1C mostrà que aquest era un residu més llarg i no conservava l'anomenat motiu d'oligomerització GXXXG(A), motiu pel qual ens vam proposar seguir la mateixa estratègia experimental emprada per Jenei i col·laboradors, i determinar per espectroscòpia de dicromisme circular i posteriorment per BN-PAGE si aquests canvis en la seqüència del TM2 de CPT1C eren els responsables del diferent comportament de la proteïna.

Els resultats de dicromisme circular mostraren que el TM2 de la CPT1C de rata presentava el mateix patró d'hèlix alfa que el pèptid corresponent al TM2 de l'enzim CPT1A de rata (Figura R.27). Eren resultats preliminars que havien d'anar seguits de l'anàlisi per BN-PAGE d'extractes mitocondrials i microsòmals de llevat expressant la proteïna CPT1C humana, però degut a la

DISCUSSIÓ

inespecificitat dels anticossos emprats (Discussió, apartat III.5) no es va poder treure una conclusió clara de l'estructura real del TM2 de CPT1C. Com s'explica més endavant, l'ús de la isoforma AK299866 de *CPT1C* humana per a l'obtenció d'anticossos específics contra la proteïna permetria solventar aquest problema i avançar en la investigació (Discussió, apartat III.6).

De tota manera, el fet que la seqüència de CPT1C i CrAT comparteixin només un 31% d'identitat de seqüència fa pensar que el model tridimensional proposat per CPT1A (creat per homologia al cristall de la CrAT) podria estar molt lluny de la conformació real que adopta CPT1C de forma nativa. De nou, la cristal·lització de la proteïna codificada per la isoforma AK299866 de *CPT1C* humana ens donaria probablement informació de gran valor sobre la conformació i la funció de la proteïna.

4. Estudi de l'activitat enzimàtica de la CPT1C humana

En el moment d'escriure aquesta tesi doctoral s'havien publicat quatre treball científics estudiant la capacitat de CPT1C per catalitzar la mateixa reacció enzimàtica que CPT1A i CPT1B. Dels quatre estudis, en només un es detectà un augment significatiu de molècules d'acilcarnitina formades, en cèl·lules neuronals PC12 que sobreexpressaven la proteïna per transfecció transitòria, i en un rendiment de reacció 100 vegades menor que CPT1A (Sierra, Gratacós et al. 2008).

Davant de la controvèrsia generada, ens plantejarem analitzar què succeïa en el nostre laboratori, i en les nostres condicions d'assaig. Donat que no disposàvem d'un anticòs que reconegués CPT1C específicament (Discussió, apartat III.5), vàrem utilitzar plàsmids que codificaven per les proteïnes de fusió *Human CPT1C(myc)* i *Rat CPT1A(flag)* etiquetades, que ens permeteren validar-ne l'expressió usant anticossos anti-myc i anti-flag. La immunodetecció d'extractes microsomals i mitocondrials d'ambdós isotips *Rat CPT1A* i *Human CPT1C* expressats en el llevat *P. pastoris*, mostrà que la proteïna es localitzava en ambdós compartiments cel·lulars, i que no tenia activitat CPT1, com ja s'havia observat anteriorment (Price, van der Leij et al. 2002). S'observà una menor activitat específica de la proteïna CPT1A, comparada amb els valors obtinguts en la soca GS115, que atribuïrem al canvi de soca (Comparar figures R23 i R25).

Davant la possibilitat que CPT1C requerís un entorn membranós determinat o bé la presència d'una proteïna acobladora per poder realitzar la seva funció, vam repetir l'experiment

DISCUSSIÓ

en cèl·lules de mamífer. La sobreexpressió de CPT1C en cèl·lules HeLa semi-intactes, tampoc produí un augment en la quantitat de palmitoïlcarnitina formada (Figura R.24). Així doncs, podem concloure que en les nostres condicions experimentals, la CPT1C humana recombinant no té activitat carnitina palmitoïltransferasa.

La major diferència que presenta la seqüència primària de CPT1C respecte els isotips CPT1A i CPT1B és una extensió de 32 residus a la regió carboxiterminal de la proteïna. La fusió d'aquesta regió a l'extrem C-terminal de l'enzim *Rat* CPT1A generà un enzim funcional, amb activitat específica CPT1 similar a l'enzim *Rat* CPT1A *wild-type* (Figura R.25), indicant que l'addició d'aquesta regió no bloquejava el canal catalític de la proteïna. De tota manera, la quimera *Rat* CPT1A/C generada presentà canvis significatius en l'afinitat pels substrats carnitina i palmitoïl-CoA, i la sensibilitat pel malonil-CoA. L'enzim generat presentà menor sensibilitat al malonil-CoA que l'enzim *wild-type* ($IC_{50}=10,37\mu\text{M}$ vs. $1.64\mu\text{M}$ del *wild-type*) i, assajada a $100\mu\text{M}$ de malonil-CoA, no assolí una inhibició del 100% de l'activitat CPT1, indicant que s'havia alterat el lloc d'unió de baixa afinitat per l'inhibidor. El fet que l'afinitat pel palmitoïl-CoA també es veiés alterada respecte l'enzim *wild-type* (Figura R.26), confirmà observacions prèvies, on s'havia descrit que el palmitoïl-CoA i el malonil-CoA competeixen pel lloc d'unió "A", de baixa afinitat pel malonil-CoA (Bird and Saggerson 1984; Cook, Mynatt et al. 1994; Kashfi, Mynatt et al. 1994; López-Viñas, Bentebibel et al. 2007). Contrastant amb la relació inversa entre la unió de la carnitina i el malonil-CoA observada en la resta d'enzims CPT1 generats, la quimera *Rat* CPT1A/C mostrà alhora menor sensibilitat pel malonil-CoA i menor afinitat pel substrat carnitina. Els resultats indicaven, doncs, que l'addició dels 32 residus de la CPT1C de rata a la regió C-terminal de la CPT1A de rata produeix canvis en el lloc d'unió competitiva entre el malonil-CoA i l'acil-CoA, que alhora alteren el lloc d'unió a la carnitina, modificant així també l'afinitat de l'enzim per aquest substrat.

Posteriorment, estudis d'un altre laboratori mostraren que la quimera anomenada RnCPT1(ACA), que combinava la regió N-terminal (residus 1-171) i l'extrem C-terminal (residus 664-773) de CPT1A de rata amb la resta de seqüència de CPT1C de rata (residus 171-664), no presentava activitat enzimàtica ni en extractes mitocondrials ni microsomals del llevat *S. cerevisiae* [(Gratacòs 2010), Tesi Doctoral].

En conjunt, aquests resultats demostraven que l'extensió de 32 aminoàcids característica de l'isotip cerebral de CPT1C no és un determinant molecular que expliqui la manca d'activitat CPT1 de la proteïna.

5. Distribució subcel·lular de la CPT1C humana

Un altre motiu de controvèrsia entre les publicacions existents en iniciar aquest treball era la distribució subcel·lular de CPT1C. Resultats d'immunofluorescència en cèl·lules GT1-7 mostraven una clara co-localització amb el marcador mitocondrial Mitotracker (Dai, Wolfgang et al. 2007), mentre que la sobreexpressió de la proteïna de fusió CPT1C-GFP en fibroblasts mostrà una co-localització amb la proteïna calnexina, ubicada en el reticle endoplasmàtic (Sierra, Gratacós et al. 2008). Els autors en aquest treball discuteixen que la putativa seqüència de transport mitocondrial de CPT1C presenta menys residus amb càrrega que la de CPT1A [residus 123-148, descrit l'any 1998 (Cohen, Kohl et al. 1998)]. A més a més, el TM2 de CPT1C és un residu més llarg que en els isotips hepàtic i muscular, fet que s'ha vist que pot afavorir l'ancoratge a la membrana de reticle endoplasmàtic enlloc de la membrana mitocondrial (Horie, Suzuki et al. 2002).

El principal inconvenient amb el que ens vàrem enfrontar, però, fou la immunodetecció de la proteïna CPT1C endògena. Com s'explica a l'apartat 8 dels Mètodes, es van provar tres anticossos diferents per a la detecció d'aquesta proteïna que ens permetés diferenciar-la de CPT1A, sense èxit. A la figura M.7 es mostra que l'anticòs generat en conills contra CPT1C no va ser capaç de detectar la proteïna sobreexpressada en cèl·lules HeLa com tampoc l'endògena en la línia neuronal SK-N-JD. Es provaren dos anticossos més, un de comercial (*Sigma*, Ref.: HPA014529) i el generat en el laboratori del Dr. Victor Zammit contra la CPT1C de ratolí (Price, van der Leij et al. 2002), que tot i que podien reconèixer la proteïna denaturada sobreexpressada per *Western blot*, no pogueren detectar-la en estat natiu en gels BN-PAGE (Figura M.10).

Per solventar aquestes dificultats, i davant la possibilitat que la immunodetecció de la proteïna de fusió CPT1C-GFP pogués presentar una localització aberrant pel fet de ser una proteïna 238 residus més gran que CPT1C, vam repetir els estudis d'immunodetecció sobreexpressant la proteïna recombinant *Human CPT1C(myc)* (10 residus més gran) en cèl·lules HeLa. Tal com s'observa a la figura R.28, la immunotinció amb l'anticòs anti-myc no co-localitzà amb el marcador de membrana mitocondrial Mitotracker, tot i que no ho vàrem poder contrastar amb un marcador de reticle endoplasmàtic. Per tal de localitzar la proteïna endògena, i durant l'estada al laboratori del Dr. Victor Zammit (Universitat de Warwick), s'obtingueren cultius primaris d'hipotàlem de ratolí. Cap dels anticossos testats fou capaç de detectar la proteïna en estat natiu, de manera que no vàrem poder treure una conclusió clara sobre la distribució subcel·lular de CPT1C en els models estudiats.

6. Estudi de diferents isoformes del gen *CPT1C* humà

A partir de la seqüència genòmica de *CPT1C* (*software Evidence Viewer*), veiem que agrupant tots els EST, mRNA, trànscrips potencials o coneguts i RefSeq anotats, aquests es corresponen a 14 models diferents (Introducció, apartat III.3.3.1). Donat que durant la realització d'aquesta tesi doctoral s'havia treballat amb dues seqüències del gen *CPT1C* humà diferents, vam dissenyar una estratègia de PCR per tal de determinar quina de les dues era predominant en cervell, i vam comprovar que la isoforma més expressada era la NM_152359 (Figura R.29).

Inesperadament, en aquest mateix experiment vàrem identificar una nova isoforma del gen, també expressada en cervell, corresponent només a la part soluble de *CPT1C*, que compartia un 92% d'identitat de seqüència amb la *CPT1C* humana. Aquest descobriment ens donava la possibilitat de cristal·litzar aquest fragment i obtenir informació estructural de gran valor sobre aquesta proteïna, almenys de la regió carboxiterminal citosòlica, no només de la *CPT1C*, sinó potser també de les altres *CPT1*. A més a més, la inoculació en conills d'aquesta proteïna purificada ens permetria obtenir un nou anticòs de *CPT1C*, probablement molt més específic que els obtinguts fins al moment.

L'alineament amb la seqüència proteica de la *CPT1A* de rata i la *CPT1C* humana (NM_152356), mostrà que la isoforma AK299866 conserva la histidina catalítica (His⁴⁷³) i el domini d'unió al coenzim A, fet que ens feu plantejar la possibilitat que presentés activitat *CPT1* o, com s'ha descrit per *CPT1C*, capacitat d'unió al malonil-CoA (Wolfgang, Kurama et al. 2006).

El primer intent d'expressió de la proteïna de fusió GST-AK299866 en *E. coli*, però, mostrà que la proteïna es trobava a la fracció insoluble del lisat cel·lular (Mètodes, figura M.3). Per aquest motiu vam escollir utilitzar el transportador NusA (Davis, Elisee et al. 1999), que ens va permetre obtenir la proteïna de fusió NusA-AK299866 a la fracció soluble del lisat bacterià (Mètodes, figura M.4). La detecció per *Western blot* amb un anticòs anti-*CPT1* confirmà que efectivament les dues proteïnes presentaven gran similitud. Vam purificar la proteïna NusA-AK299866 mitjançant una columna d'intercanvi iònic i es va assajar l'activitat *CPT1* d'extractes desalats i dialitzats. En cap cas la proteïna purificada mostrà activitat enzimàtica (Figura R.34).

Com s'observa a la figura R.33, la proteïna presentava un patró de migració irregular, amb bandes de diferents tamanys entre els marcadors de pes molecular de 118 i 90kDa, reconegudes específicament per ambdós anticòsos (anti-His i anti-*CPT1*). Per descartar una

DISCUSSIÓ

possible proteòlisi de la mostra, s'analitzà l'estabilitat de la proteïna a diferents temperatures, sense mostrar canvis entre condicions (dades no mostrades).

En cas que ambdós isotips CPT1A i CPT1C tinguessin la mateixa distribució cel·lular, o bé que les regions d'aquestes proteïnes que interactuessin amb l'inhibidor es trobessin en el mateix compartiment cel·lular, es podria pensar que CPT1C segresta malonil-CoA de manera que disminueix la seva concentració en el medi cel·lular, regulant així l'activitat de CPT1A. Donat que s'ha descrit que CPT1C efectivament uneix malonil-CoA (Price, van der Leij et al. 2002) i havíem vist que la isoforma AK299866 de la *CPT1C* humana conservava el domini d'unió al coenzim A, vam voler analitzar si era capaç d'unir-se al malonil-CoA. Considerant el cost i la dificultat dels estudis de *binding* a substrat i inhibidors, ens vam plantejar una aproximació experimental indirecta, mesurant l'activitat d'un enzim actiu i sensible al malonil-CoA, com és CPT1A de rata, en presència de la isoforma AK299866 i de malonil-CoA (Figura R.35). El fet que la presència de la isoforma AK299866 a la solució de reacció no alterés el grau d'inhibició de CPT1A de rata per malonil-CoA, descartà la hipòtesi que aquesta isoforma expressada pogués estar segrestant molècules de l'inhibidor en l'entorn cel·lular i afectar així l'activitat de l'enzim CPT1A.

Donat que aquesta isoforma es correspon a la regió carboxiterminal de CPT1C humana, teòricament soluble, i davant la possibilitat que CPT1C estigui interaccionant amb altres proteïnes d'un context neuronal per dur a terme la seva funció, ens vam plantejar utilitzar la isoforma AK299866 per a estudiar possibles interaccions amb proteïnes d'un extracte hipotalàmic humà (Mètodes, apartat 7.12). Resultats preliminars d'aquest experiment no mostraren proteïnes significativament més abundants en la mostra NusA-AK299866 respecte el control NusA. Caldrà ajustar les condicions i repetir-ho per poder-ne treure una conclusió més clara.

De tota manera, per l'alt percentatge d'identitat de seqüència amb CPT1A i CPT1B (més del 50%), la cristal·lització de la proteïna AK299866 ens permetria descriure de manera molt propera a la realitat per primer cop l'estructura de la part soluble d'un enzim CPT1, donat que les estructures construïdes fins ara s'han fet per homologia amb el cristall de la CrAT, amb el qual hi ha una identitat de seqüència del 30% aproximadament.

7. Paper del gen *CPT1C* humà

Des que fa deu anys es va identificar i clonar *CPT1C*, s'han publicat només una desena de treballs sobre la seva funció i distribució cel·lular, sense tenir encara una idea clara de per quin mecanisme es desencadenen els fenotips observats en els diferents animals transgènics publicats (Wolfgang, Kurama et al. 2006; Gao, Chen et al. 2009; Reamy and Wolfgang 2011).

Es coneix que la proteïna comparteix més d'un 50% d'identitat de seqüència amb els isotips hepàtic i muscular, que s'expressa exclusivament en cervell i que uneix malonil-CoA (Price, van der Leij et al. 2002). S'ha demostrat per immunohistoquímica que l'expressió de la proteïna és específica de neurones, i en concret, de zones relacionades amb el control de la ingesta, com són els nuclis hipotalàmics (Dai, Wolfgang et al. 2007). Per aquest motiu, de seguida se li adjudicà un paper mediador dels efectes de malonil-CoA sobre el control del balanç energètic. De fet, els primers animals KO de *Cpt1c* presentaren una disminució de la ingesta i el pes corporal total respecte els animals *wild-type* i, alimentats amb una dieta rica en grasses, presentaven un major augment de pes (Wolfgang, Kurama et al. 2006). Tot i així, és important destacar que posteriorment s'han generat dos models KO d'aquest mateix gen on no s'observaren diferències de pes respecte els animals *wild-type* (Gao, Chen et al. 2009) i [(Carrasco 2012), Tesi Doctoral], generant controvèrsia sobre el fenotip d'aquest animal i l'efecte de la interferència en l'expressió d'aquest gen en el control del pes corporal i la ingesta. En aquest sentit, els nostres estudis sobre la regulació transcripcional del gen mostren que l'expressió no és regulada per dejuni ni per canvis en els nivells circulants de cossos cetònics, tot i que sí hem identificat una resposta del promotor del gen humà als factors FoxA2 i CREB, que caldrà validar amb posteriors experiments.

Tot i que conserva els dominis catalítics més importants d'un enzim CPT1, no hem pogut demostrar que tingui capacitat per catalitzar la mateixa reacció, d'acord amb estudis anteriors (Price, van der Leij et al. 2002; Wolfgang, Kurama et al. 2006; Wolfgang, Cha et al. 2008). Només un laboratori havia pogut mesurar-ne activitat enzimàtica, amb un rendiment unes 100 vegades menor que CPT1A. Els mateixos autors mostraren per immunofluorescència cel·lular indirecta que CPT1C sobreexpressada en diferents línies cel·lulars es localitzava només al reticle endoplasmàtic i no al mitocondri (Sierra, Gratacós et al. 2008). Els nostres resultats d'immunofluorescència suporten una localització no mitocondrial, tot i que no podem concloure que efectivament es trobi en el reticle endoplasmàtic.

DISCUSSIÓ

Price i col·laboradors aïllaren la isoforma NM_152359 de *CPT1C* d'un clon de l'*IMAGE Consortium* de retinoblastoma humà (Price, van der Leij et al. 2002). Després que en aquesta tesi doctoral s'hagi demostrat l'expressió en cervell humà de diferents isoformes de *CPT1C*, ens plantegem la possibilitat que el clon amb el qual la comunitat científica està treballant sigui una isoforma inactiva, de la mateixa manera que s'havia posat en dubte que les diferents isoformes catalíticament inactives identificades de *CPT1B* en teixit cardíac i muscular de rata fossin les responsables de la fracció de β -oxidació no inhibible per malonil-CoA (Introducció, apartat III.3.2). Plantegem com a hipòtesi que aquesta isoforma pugui presentar un ensamblatge diferent i/o topologia de membrana que no permetin la reacció catalítica dels enzims *CPT1* i que afecti la resposta a hormones o a estats metabòlics de la proteïna.

En els últims estudis funcionals s'ha plantejat la hipòtesi que *CPT1C*, ancorada a la membrana del reticle endoplasmàtic, modula els nivells de ceramides, i que no és a través de l'activació de la síntesi *de novo* (Carrasco, Sahun et al. 2012). Es postula que el malonil-CoA i *CPT1C* estiguin actuant com a molècules mediadores dels efectes anorèctics de la leptina, tot i que sense demostrar el mecanisme d'acció (Gao, Zhu et al. 2011). S'ha relacionat també l'expressió de *CPT1C* amb l'elongació dels àcids grassos de cadena llarga a cadena molt llarga, resultant en una microencefàlia en animals que sobreexpressen la proteïna, així com un retràs en el creixement (Reamy and Wolfgang 2011). Així, animals KO de *Cpt1c* presenten disfuncions motrius i dificultats en l'aprenentatge, efectes també relacionats amb l'alteració dels nivells d'espècies C18 a C24 (Carrasco, Sahun et al. 2012). Per últim, s'ha proposat *CPT1C* com una nova diana terapèutica pel tractament de tumors hipòxics, ja que promou la supervivència cel·lular i el creixement tumoral en condicions d'estrès metabòlic (Zaugg, Yao et al. 2011).

En l'actualitat, encara es desconeix quina és la funció específica de *CPT1C*, com també per quin mecanisme és capaç de desencadenar una resposta que afecti l'homeòstasi energètica. L'únic que sembla clar és que ambdós fenotips de pèrdua i guany de funció poden ser modulats per la dieta, concretament per dietes amb un alt contingut en grasses, suggerint que efectivament *CPT1C* podria ser diana de malonil-CoA. En aquesta línia, s'ha demostrat l'existència d'un marc obert de lectura no traduït (uORF) corrent amunt de l'inici de traducció que estaria reprimint l'expressió del gen en condicions normals, permetent-ne l'expressió només en resposta a determinats estímuls com la deprivació de la glucosa, tractament amb BSA-palmitat o inhibició de l'AMPK (Lohse, Reilly et al. 2011). Caldrà seguir investigant per resoldre aquests dubtes i poder per fi eliminar l'interrogant que relaciona el malonil-CoA hipotalàmic amb *CPT1C* i l'homeòstasi energètica.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Els primers 18 residus de l'extrem aminoterminal de la CPT1A de rata no afecten la sensibilitat al malonil-CoA a través d'una interacció directa amb els residus Glu⁵⁹⁰ i Met⁵⁹³.
2. Els determinants moleculars de la sensibilitat al malonil-CoA de l'extrem aminoterminal (residus 1-28) de la CPT1B de porc i la CPT1A de rata són diferents, de manera que no poden explicar la similitud de sensibilitat al malonil-CoA que presenten.
3. Els extrems aminoterminal de la CPT1B humana i de porc són gairebé idèntics. Tot i això, la interacció amb l'extrem carboxiterminal és diferent, com ho demostra la diferència en el comportament de mutants del residu 17.
4. El model 3-D de CPT1B humana proposat en aquesta tesi doctoral és compatible en part amb l'últim model publicat de CPT1A, però no explica encara les diferències cinètiques que presenten ambdós enzims.
5. El patró d'expressió observat del gen *Cpt1c* no és compatible amb el paper que se li ha atorgat sobre la regulació de la ingesta.
6. La CPT1C és una proteïna sense activitat enzimàtica, independentment de la característica extensió C-terminal que presenta respecte els altres isotips.
7. La identificació de l'expressió en cervell humà adult d'una isoforma soluble de *CPT1C* ofereix una eina útil per a l'obtenció d'un cristall de la part soluble de CPT1C.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- A'Bháird, N. N. and R. R. Ramsay (1992). "Malonyl-CoA inhibition of peroxisomal carnitine octanoyltransferase." Biochem J 286 (Pt 2): 637-640.
- Abizaid, A., Q. Gao, et al. (2006). "Thoughts for Food: Brain Mechanisms and Peripheral Energy Balance." Neuron 51(6): 691-702.
- Abu-Elheiga, L., D. B. Almarza-Ortega, et al. (1997). "Human Acetyl-CoA Carboxylase 2." Journal of Biological Chemistry 272(16): 10669-10677.
- Abu-Elheiga, L., A. Jayakumar, et al. (1995). "Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms." Proceedings of the National Academy of Sciences 92(9): 4011-4015.
- Abu-Elheiga, L., M. M. Matzuk, et al. (2001). "Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2." Science 291(5513): 2613-2616.
- Abumrad, N., C. Harmon, et al. (1998). "Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process." J Lipid Res 39(12): 2309-2318.
- Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrabi, et al. (1993). "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 268(24): 17665-17668.
- Alessi, D. R., S. R. James, et al. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α ." Current Biology 7(4): 261-269.
- Anderson, R. C. (1998). "Carnitine palmitoyltransferase: a viable target for the treatment of NIDDM?" Curr Pharm Des 4(1): 1-16.
- Ardail, D., F. Lerme, et al. (1991). "Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria." J Biol Chem 266(13): 7978-7981.
- Asins, G., D. Serra, et al. (1995). "Developmental changes in carnitine palmitoyltransferases I and II gene expression in intestine and liver of suckling rats." Biochem J 306 (Pt 2): 379-384.
- Asins, G., D. Serra, et al. (1994). "The effect of etomoxir on the mRNA levels of enzymes involved in ketogenesis and cholesterologenesis in rat liver." Biochem Pharmacol 47(8): 1373-1379.
- Assimacopoulos-Jeannet, F., S. Thumelin, et al. (1997). "Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic beta-cell line INS-1." J Biol Chem 272(3): 1659-1664.
- Baillet, L., R. S. Mullur, et al. (2000). "Elucidation of the Mechanism by Which (+)-Acylcarnitines Inhibit Mitochondrial Fatty Acid Transport." Journal of Biological Chemistry 275(47): 36766-36768.
- Barrero, M. J., N. Camarero, et al. (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(Pt 3): 721-729.
- Barrero, M. J., P. F. Marrero, et al. (2000). "Regulation of the Rat Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Gene Transcription by Thyroid Hormone." Biochemical and Biophysical Research Communications 279(1): 81-88.
- Bartelds, B., J. Takens, et al. (2004). "Myocardial carnitine palmitoyltransferase I expression and long-chain fatty acid oxidation in fetal and newborn lambs." Am J Physiol Heart Circ Physiol 286(6): H2243-2248.

BIBLIOGRAFIA

- Becker, T. C., R. J. Noel, et al. (1994). "Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells." Methods Cell Biol 43 Pt A: 161-189.
- Bentebibel, A., D. Sebastián, et al. (2006). "Novel Effect of C75 on Carnitine Palmitoyltransferase I Activity and Palmitate Oxidation." Biochemistry 45(14): 4339-4350.
- Benz, R. (1994). "Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins." Biochim Biophys Acta 1197(2): 167-196.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, et al. (2007). Biochemistry. New York, W. H. Freeman ; Basingstoke : Palgrave [distributor].
- Berk, P. D. (1996). "How do long-chain free fatty acids cross cell membranes?" Proc Soc Exp Biol Med 212(1): 1-4.
- Beverly, J. L. and R. J. Martin (1991). "Influence of fatty acid oxidation in lateral hypothalamus on food intake and body composition." Am J Physiol 261(2 Pt 2): R339-343.
- Bird, M. I. and E. D. Saggerson (1984). "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 222(3): 639-647.
- Bird, M. I. and E. D. Saggerson (1985). "Interacting effects of L-carnitine and malonyl-CoA on rat liver carnitine palmitoyltransferase." Biochem J 230(1): 161-167.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res 7(6): 1513-1523.
- Black, P. N. and C. C. DiRusso (2003). "Transmembrane Movement of Exogenous Long-Chain Fatty Acids: Proteins, Enzymes, and Vectorial Esterification." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(3): 454-472.
- Blázquez, C., C. Sánchez, et al. (1998). "Role of carnitine palmitoyltransferase I in the control of ketogenesis in primary cultures of rat astrocytes." Journal of Neurochemistry 71(4): 1597-1606.
- Bone, A. J., H. S. Sherratt, et al. (1982). "Increased activity of peroxisomal beta-oxidation in rat liver caused by ethyl 2(5(4-chlorophenyl)pentyl)-oxiran-2-carboxylate: an inhibitor of mitochondrial beta-oxidation." Biochem Biophys Res Commun 104(2): 708-712.
- Bonnefont, J.-P., F. Djouadi, et al. (2004). "Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects." Molecular Aspects of Medicine 25(5-6): 495-520.
- Bonnefont, J. P., F. Demaugre, et al. (1999). "Carnitine palmitoyltransferase deficiencies." Mol Genet Metab 68(4): 424-440.
- Borthwick, K., V. N. Jackson, et al. (2006). "The Mitochondrial Intermembrane Loop Region of Rat Carnitine Palmitoyltransferase 1A Is a Major Determinant of Its Malonyl-CoA Sensitivity." Journal of Biological Chemistry 281(44): 32946-32952.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
- Brandt, J. M., F. Djouadi, et al. (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(37): 23786-23792.

BIBLIOGRAFIA

- Bremer, J. (1981). "The effect of fasting on the activity of liver carnitine palmitoyltransferase and its inhibition by malonyl-CoA." Biochim Biophys Acta 665(3): 628-631.
- Bremer, J., G. Woldegiorgis, et al. (1985). "Carnitine palmitoyltransferase. Activation by palmitoyl-CoA and inactivation by malonyl-CoA." Biochim Biophys Acta 833(1): 9-16.
- Bressler, R., R. Gay, et al. (1989). "Chronic inhibition of fatty acid oxidation: new model of diastolic dysfunction." Life Sci 44(25): 1897-1906.
- Britton, C. H., D. W. Mackey, et al. (1997). "Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A and CPT1B)." Genomics 40(1): 209-211.
- Britton, C. H., R. A. Schultz, et al. (1995). "Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene." Proceedings of the National Academy of Sciences 92(6): 1984-1988.
- Brown, N. F., V. Esser, et al. (1991). "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 266(23): 15446-15449.
- Brown, N. F., R. S. Mullur, et al. (2001). "Molecular characterization of L-CPT I deficiency in six patients: insights into function of the native enzyme." J Lipid Res 42(7): 1134-1142.
- Brown, N. F., A. Sen, et al. (1993). "Expression of precursor and mature carnitine palmitoyltransferase II in Escherichia coli and in vitro: differential behaviour of rat and human isoforms." Biochem J 294 (Pt 1): 79-86.
- Brown, N. F., B. C. Weis, et al. (1995). "Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase I Isoform Switching in the Developing Rat Heart." Journal of Biological Chemistry 270(15): 8952-8957.
- Buckholz, R. G. and M. A. Gleeson (1991). "Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins." Biotechnology (N Y) 9(11): 1067-1072.
- Campbell, S. E., N. N. Tandon, et al. (2004). "A Novel Function for Fatty Acid Translocase (FAT)/CD36." Journal of Biological Chemistry 279(35): 36235-36241.
- Carettoni, D., P. Gómez-Puertas, et al. (2003). "Phage-display and correlated mutations identify an essential region of subdomain 1C involved in homodimerization of Escherichia coli FtsA." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 50(2): 192-206.
- Carrasco, P. (2012). "Study of the physiological function of carnitine palmitoyltransferase 1C enzyme", Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Carrasco, P., I. Sahun, et al. (2012). "Ceramide levels regulated by carnitine palmitoyl transferase 1C control dendritic spine maturation and cognition." Journal of Biological Chemistry.
- Caspi, L., P. Y. Wang, et al. (2007). "A balance of lipid-sensing mechanisms in the brain and liver." Cell Metab 6(2): 99-104.
- Casteels, M., V. Foulon, et al. (2003). "Alpha-oxidation of 3-methyl-substituted fatty acids and its thiamine dependence." Eur J Biochem 270(8): 1619-1627.
- Cha, S. H. and M. D. Lane (2009). "Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway." Biochem Biophys Res Commun 386(1): 212-216.

BIBLIOGRAFIA

- Cha, S. H., M. Wolfgang, et al. (2008). "Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake." Proc Natl Acad Sci U S A 105(44): 16871-16875.
- Chakravarthy, M. V., Y. Zhu, et al. (2007). "Brain fatty acid synthase activates PPARalpha to maintain energy homeostasis." J Clin Invest 117(9): 2539-2552.
- Chatelain, F., C. Kohl, et al. (1996). "Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes." Eur J Biochem 235(3): 789-798.
- Chatelain, P., M. Deschodt-Lanckman, et al. (1979). "Effect of secretin, glucagon and vasoactive intestinal peptide on the hormone-sensitive rat cardiac adenylate cyclase [proceedings]." Arch Int Physiol Biochim 87(4): 783-784.
- Chegary, M., H. te Brinke, et al. (2008). "Characterization of l-aminocarnitine, an inhibitor of fatty acid oxidation." Molecular Genetics and Metabolism 93(4): 403-410.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-159.
- Cohen, I., F. Guillerault, et al. (2001). "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 276(7): 5403-5411.
- Cohen, I., C. Kohl, et al. (1998). "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 273(45): 29896-29904.
- Coll, A. P., I. S. Farooqi, et al. (2007). "The Hormonal Control of Food Intake." Cell 129(2): 251-262.
- Conti, R., E. Mannucci, et al. (2011). "Selective reversible inhibition of liver carnitine palmitoyl-transferase 1 by teglicar reduces gluconeogenesis and improves glucose homeostasis." Diabetes 60(2): 644-651.
- Cook, G. A., R. L. Mynatt, et al. (1994). "Yonetani-Theorell analysis of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I inhibition indicates two distinct inhibitory binding sites." Journal of Biological Chemistry 269(12): 8803-8807.
- Cook, G. A., D. A. Otto, et al. (1980). "Differential inhibition of ketogenesis by malonyl-CoA in mitochondria from fed and starved rats." Biochem J 192(3): 955-958.
- Cook, G. A. and E. A. Park (1999). "Expression and regulation of carnitine palmitoyltransferase-lalpha and -lbeta genes." Am J Med Sci 318(1): 43-48.
- Corr, P. B. and K. A. Yamada (1995). "Selected metabolic alterations in the ischemic heart and their contributions to arrhythmogenesis." Herz 20(3): 156-168.
- Cregg, J. M., T. S. Vedvick, et al. (1993). "Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*." Biotechnology (N Y) 11(8): 905-910.
- Cronin, C. N. (1997). "cDNA Cloning, Recombinant Expression, and Site-Directed Mutagenesis of Bovine Liver Carnitine Octanoyltransferase." European Journal of Biochemistry 247(3): 1029-1037.
- Cruz, F., S. R. Scott, et al. (1998). "Ontogeny and Cellular Localization of the Pyruvate Recycling System in Rat Brain." Journal of Neurochemistry 70(6): 2613-2619.

BIBLIOGRAFIA

- Cullingford, T. E., K. K. Bhakoo, et al. (1998). "Hormonal regulation of the mRNA encoding the ketogenic enzyme mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in neonatal primary cultures of cortical astrocytes and meningeal fibroblasts." J Neurochem 71(5): 1804-1812.
- Cullingford, T. E., C. T. Dolphin, et al. (1998). "Molecular cloning of rat mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase and detection of the corresponding mRNA and of those encoding the remaining enzymes comprising the ketogenic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA cycle in central nervous system of suckling rat." Biochem J 329 (Pt 2): 373-381.
- Cutler, R. G. and M. P. Mattson (2001). "Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan." Mechanisms of Ageing and Development 122(9): 895-908.
- Dai, J., H. Zhu, et al. (2000). "Identification by Mutagenesis of Conserved Arginine and Tryptophan Residues in Rat Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Important for Catalytic Activity." Journal of Biological Chemistry 275(29): 22020-22024.
- Dai, Y., M. J. Wolfgang, et al. (2007). "Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers." Biochem Biophys Res Commun 359(3): 469-474.
- Dalvi, P. S., A. Nazarians-Armavil, et al. (2012). "Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist, Exendin-4, Regulates Feeding-Associated Neuropeptides in Hypothalamic Neurons in Vivo and in Vitro." Endocrinology.
- Dashti, H., T. Mathew, et al. (2007). "Beneficial effects of ketogenic diet in obese diabetic subjects." Molecular and Cellular Biochemistry 302(1): 249-256.
- Davis, G. D., C. Elisee, et al. (1999). "New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli." Biotechnology and Bioengineering 65(4): 382-388.
- Davis, G. D., C. Elisee, et al. (1999). "New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli." Biotechnology and Bioengineering 65(4): 382-388.
- De Lucas, J. R., A. I. Domínguez, et al. (1999). "The acuH gene of Aspergillus nidulans, required for growth on acetate and long-chain fatty acids, encodes a putative homologue of the mammalian carnitine/acylcarnitine carrier." Arch Microbiol 171(6): 386-396.
- de Vries, Y., D. N. Arvidson, et al. (1997). "Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast Pichia pastoris." Biochemistry 36(17): 5285-5292.
- Deems, R. O., R. C. Anderson, et al. (1998). "Hypoglycemic effects of a novel fatty acid oxidation inhibitor in rats and monkeys." Am J Physiol 274(2 Pt 2): R524-528.
- Delghandi, M. P., M. Johannessen, et al. (2005). "The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells." Cellular Signalling 17(11): 1343-1351.
- Demaugre, F., J. P. Bonnefont, et al. (1990). "Immunoquantitative analysis of human carnitine palmitoyltransferase I and II defects." Pediatr Res 27(5): 497-500.
- Distler, A. M., J. Kerner, et al. (2007). "Post-translational modifications of rat liver mitochondrial outer membrane proteins identified by mass spectrometry." Biochim Biophys Acta 1774(5): 628-636.
- Diéguez, C., G. Fruhbeck, et al. (2009). "Hypothalamic lipids and the regulation of energy homeostasis." Obes Facts 2(2): 126-135.

BIBLIOGRAFIA

- Dobbins, R. L., L. S. Szczepaniak, et al. (2001). "Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats." Diabetes 50(1): 123-130.
- Dowell, P., Z. Hu, et al. (2005). "Monitoring energy balance: metabolites of fatty acid synthesis as hypothalamic sensors." Annu Rev Biochem 74: 515-534.
- Dunn-Meynell, A. A., V. H. Routh, et al. (2002). "Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons." Diabetes 51(7): 2056-2065.
- Duée, P. H., J. P. Pégorier, et al. (1994). "Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity." Biochem J 298 (Pt 1): 207-212.
- Eaton, S., K. Bartlett, et al. (1996). "Mammalian mitochondrial beta-oxidation." Biochem J 320 (Pt 2): 345-357.
- Edmond, J. (1992). "Energy metabolism in developing brain cells." Can J Physiol Pharmacol 70 Suppl: S118-129.
- Edmond, J., R. A. Robbins, et al. (1987). "Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture." J Neurosci Res 18(4): 551-561.
- Escartin, C., K. Pierre, et al. (2007). "Activation of Astrocytes by CNTF Induces Metabolic Plasticity and Increases Resistance to Metabolic Insults." The Journal of Neuroscience 27(27): 7094-7104.
- Esser, V., C. H. Britton, et al. (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(8): 5817-5822.
- Esser, V., N. F. Brown, et al. (1996). "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)." Journal of Biological Chemistry 271(12): 6972-6977.
- Evangelopoulos, M. E., J. Weis, et al. (2005). "Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR." 24(20): 3309-3318.
- Faergeman, N. J., P. N. Black, et al. (2001). "The Acyl-CoA synthetases encoded within FAA1 and FAA4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular Utilization." J Biol Chem 276(40): 37051-37059.
- Faye, A., K. Borthwick, et al. (2005). "Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular interactions in rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity." Biochem. J. 387(1): 67-76.
- Faye, A., C. Esnous, et al. (2007). "Rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 forms an oligomeric complex within the outer mitochondrial membrane." J Biol Chem 282(37): 26908-26916.
- Ferrer, A., C. Caelles, et al. (1985). "Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate." Biochem Biophys Res Commun 132(2): 497-504.
- Finocchiaro, G., I. Colombo, et al. (1990). "Purification, characterization and partial amino acid sequences of carnitine palmitoyl-transferase from human liver." FEBS Lett 274(1-2): 163-166.

BIBLIOGRAFIA

- Fisher, C. L. and G. K. Pei (1997). "Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method." Biotechniques 23(4): 570-571, 574.
- Flier, J. S. (2004). "Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic." Cell 116(2): 337-350.
- Foley, J. E. (1992). "Rationale and application of fatty acid oxidation inhibitors in treatment of diabetes mellitus." Diabetes Care 15(6): 773-784.
- Forgacs, G. (1995). "On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signaling: an approach based on percolation." J Cell Sci 108 (Pt 6): 2131-2143.
- Fraser, F., C. G. Corstorphine, et al. (1999). "Evidence that carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) is expressed in microsomes and peroxisomes of rat liver. Distinct immunoreactivity of the N-terminal domain of the microsomal protein." FEBS Lett 446(1): 69-74.
- Fraser, F., C. G. Corstorphine, et al. (1997). "Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane." Biochem J 323 (Pt 3): 711-718.
- Fraser, F., R. Padovese, et al. (2001). "Distinct kinetics of carnitine palmitoyltransferase i in contact sites and outer membranes of rat liver mitochondria." J Biol Chem 276(23): 20182-20185.
- Fraser, F. and V. A. Zammit (1998). "Enrichment of carnitine palmitoyltransferases I and II in the contact sites of rat liver mitochondria." Biochem. J. 329(2): 225-229.
- Fraser, F. and V. A. Zammit (1999). "Submitochondrial and subcellular distributions of the carnitine-acylcarnitine carrier." FEBS Lett 445(1): 41-44.
- Friedmann, D., T. Messick, et al. (2001). Crystallization of Macromolecules. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc.
- Frühbeck, G. and J. Gómez-Ambrosi (2003). "Control of body weight: a physiologic and transgenic perspective." Diabetologia 46(2): 143-172.
- Furey, W., P. Arjunan, et al. (1998). "Structure-function relationships and flexible tetramer assembly in pyruvate decarboxylase revealed by analysis of crystal structures." Biochim Biophys Acta 1385(2): 253-270.
- Gacias, M., A. Pérez-Martí, et al. (2012). "PGC-1 β regulates mouse carnitine-acylcarnitine translocase through estrogen-related receptor α ." Biochemical and Biophysical Research Communications Paper in press.
- Gamble, J. and G. D. Lopaschuk (1997). "Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate—activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation." Metabolism 46(11): 1270-1274.
- Gao, S., W. Keung, et al. (2011). "Malonyl-CoA mediates leptin hypothalamic control of feeding independent of inhibition of CPT-1a." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301(1): R209-217.
- Gao, S. and M. D. Lane (2003). "Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem." Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 5628-5633.
- Gao, S., G. Zhu, et al. (2011). "Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding." Proceedings of the National Academy of Sciences 108(23): 9691-9696.

BIBLIOGRAFIA

- Gao, X., W. Chen, et al. (2009). "Enhanced susceptibility of *Cpt1c* knockout mice to glucose intolerance induced by a high-fat diet involves elevated hepatic gluconeogenesis and decreased skeletal muscle glucose uptake." Diabetologia 52(5): 912-920.
- Gao, X., W. Chen, et al. (2009). "Enhanced susceptibility of *Cpt1c* knockout mice to glucose intolerance induced by a high-fat diet involves elevated hepatic gluconeogenesis and decreased skeletal muscle glucose uptake." Diabetologia 52(5): 912-920.
- Garavito, R. M., D. Picot, et al. (1996). "Strategies for crystallizing membrane proteins." J Bioenerg Biomembr 28(1): 13-27.
- Gargiulo, C. E., S. M. Stuhlsatz-Krouper, et al. (1999). "Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane." J Lipid Res 40(5): 881-892.
- Gellera, C., E. Verderio, et al. (1994). "Assignment of the human carnitine palmitoyltransferase II gene (CPT1) to chromosome 1p32." Genomics 24(1): 195-197.
- Ghadiminejad, I. and E. D. Saggerson (1990). "Carnitine palmitoyltransferase (CPT2) from liver mitochondrial inner membrane becomes inhibitable by malonyl-CoA if reconstituted with outer membrane malonyl-CoA binding protein." FEBS Letters 269(2): 406-408.
- Ghosh, A., Y. Y. Cheung, et al. (2005). "Brain Contains a Functional Glucose-6-Phosphatase Complex Capable of Endogenous Glucose Production." Journal of Biological Chemistry 280(12): 11114-11119.
- Giangregorio, N., A. Tonazzi, et al. (2010). "Site-directed mutagenesis of charged amino acids of the human mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: insight into the molecular mechanism of transport." Biochim Biophys Acta 1797(6-7): 839-845.
- Giannessi, F., P. Chiodi, et al. (2001). "Reversible carnitine palmitoyltransferase inhibitors with broad chemical diversity as potential antidiabetic agents." J Med Chem 44(15): 2383-2386.
- Giannessi, F., P. Pessotto, et al. (2003). "Discovery of a long-chain carbamoyl aminocarnitine derivative, a reversible carnitine palmitoyltransferase inhibitor with antiketotic and antidiabetic activity." J Med Chem 46(2): 303-309.
- Gilde, A. J. and M. Van Bilsen (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle." Acta Physiol Scand 178(4): 425-434.
- Gilde, A. J., K. A. van der Lee, et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism." Circ Res 92(5): 518-524.
- Gobin, S., L. Thuillier, et al. (2003). "Functional and structural basis of carnitine palmitoyltransferase 1A deficiency." J Biol Chem 278(50): 50428-50434.
- Gonzalez, G. A. and M. R. Montminy (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133." Cell 59(4): 675-680.
- Grantham, B. D. and V. A. Zammit (1986). "Binding of [14C]malonyl-CoA to rat liver mitochondria after blocking of the active site of carnitine palmitoyltransferase I. Displacement of low-affinity binding by palmitoyl-CoA." Biochem J 233(2): 589-593.
- Grantham, B. D. and V. A. Zammit (1986). "Restoration of the properties of carnitine palmitoyltransferase I in liver mitochondria during re-feeding of starved rats." Biochem J 239(2): 485-488.

BIBLIOGRAFIA

- Grantham, B. D. and V. A. Zammit (1987). "Studies on the activation in vitro of carnitine palmitoyltransferase I in liver mitochondria from normal, diabetic and glucagon-treated rats." Biochemical Journal 243(1): 261-265.
- Grantham, B. D. and V. A. Zammit (1988). "Role of carnitine palmitoyltransferase I in the regulation of hepatic ketogenesis during the onset and reversal of chronic diabetes." Biochem J 249(2): 409-414.
- Gratacòs, E. (2010). "Molecular characterization of carnitine palmitoyltransferase 1C", Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Green, S., I. Issemann, et al. (1988). "A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering." Nucleic Acids Res 16(1): 369.
- Greenfield, N. and G. D. Fasman (1969). "Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation." Biochemistry 8(10): 4108-4116.
- Gregolin, C., E. Ryder, et al. (1966). "Molecular characteristics of liver acetyl CoA carboxylase." Proc Natl Acad Sci U S A 56(1): 148-155.
- Gulick, T., S. Cresci, et al. (1994). "The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A 91(23): 11012-11016.
- Gutgesell, A., G. Wen, et al. (2009). "Mouse carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) is transcriptionally regulated by PPAR α and PPAR δ in liver cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1790(10): 1206-1216.
- Guynn, R. W., D. Veloso, et al. (1972). "The concentration of malonyl-coenzyme A and the control of fatty acid synthesis in vivo." J Biol Chem 247(22): 7325-7331.
- Guzmán, M., G. Velasco, et al. (2000). "Do Cytoskeletal Components Control Fatty Acid Translocation into Liver Mitochondria?" Trends in Endocrinology & Metabolism 11(2): 49-53.
- Hall, A. M., A. J. Smith, et al. (2003). "Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1." J Biol Chem 278(44): 43008-43013.
- Harmon, C. M. and N. A. Abumrad (1993). "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 133(1): 43-49.
- Harner, M., C. Körner, et al. (2011). "The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture." EMBO J.
- Hashimoto, T., W. S. Cook, et al. (2000). "Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting." J Biol Chem 275(37): 28918-28928.
- He, W., T. K. Lam, et al. (2006). "Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity." Nat Neurosci 9(2): 227-233.
- Hegardt, F. G., M. Bach, et al. (2001). "Post-transcriptional regulation of rat carnitine octanoyltransferase." Biochem Soc Trans 29(Pt 2): 316-320.
- Heimberg, M., J. O. Olubadewo, et al. (1985). "Plasma lipoproteins and regulation of hepatic metabolism of fatty acids in altered thyroid states." Endocr Rev 6(4): 590-607.

BIBLIOGRAFIA

- Heinemann, U., G. Illing, et al. (2001). "High-throughput three-dimensional protein structure determination." Curr Opin Biotechnol 12(4): 348-354.
- Heo, K., X. Lin, et al. (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(10): 2467-2470.
- Herzig, S., F. Long, et al. (2001). "CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1." Nature 413(6852): 179-183.
- Hiatt, W. R., J. G. Regensteiner, et al. (1989). "Carnitine and acylcarnitine metabolism during exercise in humans. Dependence on skeletal muscle metabolic state." J Clin Invest 84(4): 1167-1173.
- Hillgartner, F. B., L. M. Salati, et al. (1995). "Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis." Physiol Rev 75(1): 47-76.
- Hirsch, D., A. Stahl, et al. (1998). "A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man." Proc Natl Acad Sci U S A 95(15): 8625-8629.
- Horie, C., H. Suzuki, et al. (2002). "Characterization of Signal That Directs C-Tail-anchored Proteins to Mammalian Mitochondrial Outer Membrane." Molecular Biology of the Cell 13(5): 1615-1625.
- Hsiao, Y.-S., G. Jogl, et al. (2006). "Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II)." Biochemical and Biophysical Research Communications 346(3): 974-980.
- Hsiao, Y. S., G. Jogl, et al. (2004). "Structural and biochemical studies of the substrate selectivity of carnitine acetyltransferase." J Biol Chem 279(30): 31584-31589.
- Hu, Z., S. H. Cha, et al. (2003). "Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior." Proc Natl Acad Sci U S A 100(22): 12624-12629.
- Hu, Z., Y. Dai, et al. (2005). "A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake." J Biol Chem 280(48): 39681-39683.
- Huizing, M., V. Iacobazzi, et al. (1997). "Cloning of the Human Carnitine-Acylcarnitine Carrier cDNA and Identification of the Molecular Defect in a Patient." The American Journal of Human Genetics 61(6): 1239-1245.
- IJlst, L., H. Mandel, et al. (1998). "Molecular basis of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency." J Clin Invest 102(3): 527-531.
- Indiveri, C., A. Tonazzi, et al. (1990). "Identification and purification of the carnitine carrier from rat liver mitochondria." Biochim Biophys Acta 1020(1): 81-86.
- Indiveri, C., A. Tonazzi, et al. (1994). "The reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria: evidence for a transport mechanism different from that of the other mitochondrial translocators." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1189(1): 65-73.
- Insel, P. A. and R. S. Ostrom (2003). "Forskolin as a Tool for Examining Adenylyl Cyclase Expression, Regulation, and G Protein Signaling." Cellular and Molecular Neurobiology 23(3): 305-314.
- Izai, K., Y. Uchida, et al. (1992). "Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase." Journal of Biological Chemistry 267(2): 1027-1033.

BIBLIOGRAFIA

- Jackson, V. N., J. M. Cameron, et al. (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(26): 19560-19566.
- Jackson, V. N., J. M. Cameron, et al. (1999). "Sequencing and functional expression of the malonyl-CoA-sensitive carnitine palmitoyltransferase from *Drosophila melanogaster*." Biochem J 341 (Pt 3): 483-489.
- Jackson, V. N., N. T. Price, et al. (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(48): 14629-14634.
- Jackson, V. N., V. A. Zammit, et al. (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(49): 38410-38416.
- Jansen, M. S., G. A. Cook, et al. (2000). "Thyroid hormone regulates carnitine palmitoyltransferase alpha gene expression through elements in the promoter and first intron." J Biol Chem 275(45): 34989-34997.
- Jenei, Z., K. Borthwick, et al. (2009). "Self-association of transmembrane domain 2 (TM2), but not TM1, in carnitine palmitoyltransferase 1A: role of GXXXG(A) motifs." J Biol Chem 284(11): 6988-6997.
- Jenei, Z. A., G. Z. L. Warren, et al. (2011). "Packing of transmembrane domain 2 of carnitine palmitoyltransferase-1A affects oligomerization and malonyl-CoA sensitivity of the mitochondrial outer membrane protein." The FASEB Journal.
- Jenkins, D. L. and O. W. Griffith (1986). "Antiketogenic and hypoglycemic effects of aminocarnitine and acylaminocarnitines." Proc Natl Acad Sci U S A 83(2): 290-294.
- Jogl, G., Y. S. Hsiao, et al. (2005). "Crystal structure of mouse carnitine octanoyltransferase and molecular determinants of substrate selectivity." J Biol Chem 280(1): 738-744.
- Jogl, G. and L. Tong (2003). "Crystal Structure of Carnitine Acetyltransferase and Implications for the Catalytic Mechanism and Fatty Acid Transport." Cell 112(1): 113-122.
- Johnstone, A. M., G. W. Horgan, et al. (2008). "Effects of a high-protein ketogenic diet on hunger, appetite, and weight loss in obese men feeding ad libitum." The American Journal of Clinical Nutrition 87(1): 44-55.
- Kalant, D. and K. Cianflone (2004). "Regulation of fatty acid transport." Curr Opin Lipidol 15(3): 309-314.
- Kamohara, S., R. Burcelin, et al. (1997). "Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment." Nature 389(6649): 374-377.
- Kantor, P. F., J. R. Dyck, et al. (1999). "Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart." Am J Med Sci 318(1): 3-14.
- Kashfi, K. and G. A. Cook (1999). "Topology of hepatic mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I." Adv Exp Med Biol 466: 27-42.
- Kashfi, K., R. L. Mynatt, et al. (1994). "Hepatic carnitine palmitoyltransferase-I has two independent inhibitory binding sites for regulation of fatty acid oxidation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1212(2): 245-252.
- Kashfi, K., R. L. Mynatt, et al. (2011). "Membrane microenvironment regulation of carnitine palmitoyltransferases I and II." Biochem Soc Trans 39(3): 833-837.

BIBLIOGRAFIA

- Kashiwaya, Y., R. Pawlosky, et al. (2010). "A Ketone Ester Diet Increases Brain Malonyl-CoA and Uncoupling Proteins 4 and 5 while Decreasing Food Intake in the Normal Wistar Rat." Journal of Biological Chemistry 285(34): 25950-25956.
- Keller, H., C. Dreyer, et al. (1993). "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 90(6): 2160-2164.
- Kendrew, J. C., G. Bodo, et al. (1958). "A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis." Nature 181(4610): 662-666.
- Kerner, J., A. M. Distler, et al. (2004). "Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I: effect on the kinetic properties of the enzyme." J Biol Chem 279(39): 41104-41113.
- Kerner, J. and C. Hoppel (2000). "Fatty acid import into mitochondria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1486(1): 1-17.
- Kerner, J., W. K. Parland, et al. (2008). "Rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I, hepatic carnitine, and malonyl-CoA: effect of starvation." Arch Physiol Biochem 114(3): 161-170.
- Kersten, S., J. Seydoux, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting." J Clin Invest 103(11): 1489-1498.
- Kim, E. K., I. Miller, et al. (2004). "C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase." J Biol Chem 279(19): 19970-19976.
- Kim, J. Y., T. R. Koves, et al. (2002). "Evidence of a malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase I activity in red skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab 282(5): E1014-1022.
- Kim, M. S., J. Y. Park, et al. (2004). "Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase." Nat Med 10(7): 727-733.
- Kiorpes, T. C., D. Hoerr, et al. (1984). "Identification of 2-tetradecylglycidyl coenzyme A as the active form of methyl 2-tetradecylglycidate (methyl palmoxirate) and its characterization as an irreversible, active site-directed inhibitor of carnitine palmitoyltransferase A in isolated rat liver mitochondria." J Biol Chem 259(15): 9750-9755.
- Kliwer, S. A., S. S. Sundseth, et al. (1997). "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 94(9): 4318-4323.
- Kolodziej, M. P., P. J. Crilly, et al. (1992). "Development and characterization of a polyclonal antibody against rat liver mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase (CPT I). Distinction of CPT I from CPT II and of isoforms of CPT I in different tissues." Biochem J 282 (Pt 2): 415-421.
- Kolodziej, M. P. and V. A. Zammit (1990). "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 272(2): 421-425.
- Kolodziej, M. P. and V. A. Zammit (1993). "Mature carnitine palmitoyltransferase I retains the N-terminus of the nascent protein in rat liver." FEBS Letters 327(3): 294-296.
- Kuhajda, F. P., E. S. Pizer, et al. (2000). "Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase." Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3450-3454.

BIBLIOGRAFIA

- König, B., C. Rauer, et al. (2009). "Fasting Upregulates PPAR α Target Genes in Brain and Influences Pituitary Hormone Expression in a PPAR α Dependent Manner." PPAR Research 2009.
- König, T., B. Kocsis, et al. (1977). "Interaction of a synthetic polyanion with rat liver mitochondria." Biochim Biophys Acta 462(2): 380-389.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lage, R., C. Diéguez, et al. (2008). "AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis." Trends Mol Med 14(12): 539-549.
- Lam, T. K., G. J. Schwartz, et al. (2005). "Hypothalamic sensing of fatty acids." Nat Neurosci 8(5): 579-584.
- Landree, L. E., A. L. Hanlon, et al. (2004). "C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism." J Biol Chem 279(5): 3817-3827.
- Lane, M., M. Wolfgang, et al. (2008). "Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA." Int J Obes (Lond) 32 Suppl 4: S49-54.
- Lapsys, N. M., A. D. Kriketos, et al. (2000). "Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle." J Clin Endocrinol Metab 85(11): 4293-4297.
- Latruffe, N. and J. Vamecq (1997). "Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism." Biochimie 79(2-3): 81-94.
- Le Foll, C., B. G. Irani, et al. (2009). "Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 297(3): R655-664.
- Le May, C., M. Caüzac, et al. (2005). "Fatty acids induce L-CPT I gene expression through a PPAR α -independent mechanism in rat hepatoma cells." J Nutr 135(10): 2313-2319.
- Lee, K., J. Kerner, et al. (2011). "Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) Is Part of an Outer Membrane Fatty Acid Transfer Complex." Journal of Biological Chemistry 286(29): 25655-25662.
- Lemmon, M. A., H. R. Treutlein, et al. (1994). "A dimerization motif for transmembrane alpha-helices." Nat Struct Biol 1(3): 157-163.
- Leone, T. C., C. J. Weinheimer, et al. (1999). "A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in the cellular fasting response: the PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders." Proc Natl Acad Sci U S A 96(13): 7473-7478.
- Leslie, A. G., P. C. Moody, et al. (1988). "Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A 85(12): 4133-4137.
- Lian, W., L. Govindasamy, et al. (2002). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on recombinant human carnitine acetyltransferase." Acta Crystallographica Section D 58(7): 1193-1194.
- Liu, H., G. Zheng, et al. (2005). "Cysteine-scanning mutagenesis of muscle carnitine palmitoyltransferase I reveals a single cysteine residue (Cys-305) is important for catalysis." J Biol Chem 280(6): 4524-4531.
- Loftus, T. M., D. E. Jaworsky, et al. (2000). "Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors." Science 288(5475): 2379-2381.

BIBLIOGRAFIA

- Lohse, I., P. Reilly, et al. (2011). "The CPT1C 5'UTR Contains a Repressing Upstream Open Reading Frame That Is Regulated by Cellular Energy Availability and AMPK." PLoS ONE 6(9): e21486.
- Lopaschuk, G. D., D. D. Belke, et al. (1994). "Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease." Biochim Biophys Acta 1213(3): 263-276.
- Lopaschuk, G. D., J. R. Ussher, et al. (2010). "Targeting Intermediary Metabolism in the Hypothalamus as a Mechanism to Regulate Appetite." Pharmacological Reviews: -.
- Lopez, M., L. Varela, et al. (2010). "Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance." Nat Med 16(9): 1001-1008.
- Louet, J. F., F. Chatelain, et al. (2001). "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 354(Pt 1): 189-197.
- Louet, J. F., G. Hayhurst, et al. (2002). "The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB)." J Biol Chem 277(41): 37991-38000.
- Louet, J. F., C. Le May, et al. (2001). "Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids." Biochem. Soc. Trans. 29(Pt 2): 310-316.
- Luquet, S. and C. Magnan (2009). "The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis." Front Biosci (Schol Ed) 1: 448-465.
- Lévy, D., G. Mosser, et al. (1999). "Two-dimensional crystallization on lipid layer: A successful approach for membrane proteins." J Struct Biol 127(1): 44-52.
- López, M., R. Lage, et al. (2008). "Hypothalamic Fatty Acid Metabolism Mediates the Orexigenic Action of Ghrelin." Cell Metabolism 7(5): 389-399.
- López, M., C. J. Lelliott, et al. (2006). "Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA." Diabetes 55(5): 1327-1336.
- López-Viñas, E., A. Bentebibel, et al. (2007). "Definition by Functional and Structural Analysis of Two Malonyl-CoA Sites in Carnitine Palmitoyltransferase 1A." Journal of Biological Chemistry 282(25): 18212-18224.
- Macfarlane, D. P., S. Forbes, et al. (2008). "Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome." J Endocrinol 197(2): 189-204.
- Magistretti, P. J. and L. Pellerin (1996). "Cellular Bases of Brain Energy Metabolism and Their Relevance to Functional Brain Imaging: Evidence for a Prominent Role of Astrocytes." Cerebral Cortex 6(1): 50-61.
- Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol 53(1): 159-162.
- Mascaró, C., E. Acosta, et al. (1998). "Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor." J Biol Chem 273(15): 8560-8563.
- Matejtschuk, P. (2007). "Lyophilization of proteins." Methods Mol Biol 368: 59-72.
- Mc Pherson, M. J., P. Quirke, et al. (1991). PCR: A Practical Approach. New York, Oxford University Press.

BIBLIOGRAFIA

- McCrimmon, R. J., X. Fan, et al. (2004). "Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus." Diabetes 53(8): 1953-1958.
- McGarry, J. D. and N. F. Brown (1997). "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis." Eur J Biochem 244(1): 1-14.
- McGarry, J. D. and D. W. Foster (1980). "Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production." Annu Rev Biochem 49: 395-420.
- McGarry, J. D., G. F. Leatherman, et al. (1978). "Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA." Journal of Biological Chemistry 253(12): 4128-4136.
- McGarry, J. D., G. P. Mannaerts, et al. (1977). "A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis." J Clin Invest 60(1): 265-270.
- McGarry, J. D., G. P. Mannaerts, et al. (1978). "Characteristics of fatty acid oxidation in rat liver homogenates and the inhibitory effect of malonyl-CoA." Biochim Biophys Acta 530(3): 305-313.
- McGarry, J. D., S. E. Mills, et al. (1983). "Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat." Biochem J 214(1): 21-28.
- McGarry, J. D., M. J. Stark, et al. (1978). "Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay." J Biol Chem 253(22): 8291-8293.
- McGarry, J. D., K. F. Woeltje, et al. (1989). "Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase." Diabetes Metab Rev 5(3): 271-284.
- Medina-Gomez, G. and A. Vidal-Puig (2005). "Gateway to the metabolic syndrome." Nat Med 11(6): 602-603.
- Mera, P., A. Bentebibel, et al. (2009). "C75 is converted to C75-CoA in the hypothalamus, where it inhibits carnitine palmitoyltransferase 1 and decreases food intake and body weight." Biochemical Pharmacology 77(6): 1084-1095.
- Migrenne, S., C. Le Foll, et al. (2011). "Brain lipid sensing and nervous control of energy balance." Diabetes Metab 37(2): 83-88.
- Mills, S. E., D. W. Foster, et al. (1983). "Interaction of malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase I." Biochem J 214(1): 83-91.
- Minokoshi, Y., T. Alquier, et al. (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." Nature 428(6982): 569-574.
- Mizuno, T. M., H. Makimura, et al. (1999). "Fasting Regulates Hypothalamic Neuropeptide Y, Agouti-Related Peptide, and Proopiomelanocortin in Diabetic Mice Independent of Changes in Leptin or Insulin." Endocrinology 140(10): 4551-4557.
- Montminy, M., S. H. Koo, et al. (2004). "The CREB family: key regulators of hepatic metabolism." Ann Endocrinol (Paris) 65(1): 73-75.
- Morillas, M., J. Clotet, et al. (2000). "Identification of the two histidine residues responsible for the inhibition by malonyl-CoA in peroxisomal carnitine octanoyltransferase from rat liver." FEBS Lett 466(1): 183-186.

BIBLIOGRAFIA

- Morillas, M., P. Gómez-Puertas, et al. (2003). "Identification of Conserved Amino Acid Residues in Rat Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Critical for Malonyl-CoA Inhibition." Journal of Biological Chemistry 278(11): 9058-9063.
- Morillas, M., P. Gómez-Puertas, et al. (2002). "Structural Model of a Malonyl-CoA-binding Site of Carnitine Octanoyltransferase and Carnitine Palmitoyltransferase I." Journal of Biological Chemistry 277(13): 11473-11480.
- Morillas, M., E. López-Viñas, et al. (2004). "Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal." Biochem J 379(Pt 3): 777-784.
- Morris, A. (2005). "Cerebral ketone body metabolism." Journal of Inherited Metabolic Disease 28(2): 109-121.
- Murthy, M. S. and S. V. Pande (1987). "Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane." Proc Natl Acad Sci U S A 84(2): 378-382.
- Murthy, M. S. and S. V. Pande (1987). "Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes." Biochem J 248(3): 727-733.
- Murthy, M. S. and S. V. Pande (1990). "Characterization of a solubilized malonyl-CoA-sensitive carnitine palmitoyltransferase from the mitochondrial outer membrane as a protein distinct from the malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase of the inner membrane." Biochem J 268(3): 599-604.
- Nagaraj, S. H., N. Deshpande, et al. (2007). "ESTExplorer: an expressed sequence tag (EST) assembly and annotation platform." Nucleic Acids Res 35(Web Server issue): W143-147.
- Namikawa, K., M. Honma, et al. (2000). "Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration." J Neurosci 20(8): 2875-2886.
- Napal, L. (2006). "Mecanismes de control de l'expressió gènica i de regulació de l'activitat enzimàtica de CPT1A", Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Napal, L., J. Dai, et al. (2003). "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." Journal of Biological Chemistry 278(36): 34084-34089.
- Napal, L., P. F. Marrero, et al. (2005). "An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A." J Mol Biol 354(4): 751-759.
- Nicot, C., F. G. Hegardt, et al. (2001). "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 40(7): 2260-2266.
- Nicot, C., L. Napal, et al. (2004). "C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system." Biochem Biophys Res Commun 325(3): 660-664.
- Nicot, C., J. Relat, et al. (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(12): 10044-10049.

BIBLIOGRAFIA

- Noël, H. and S. V. Pande (1986). "An essential requirement of cardiolipin for mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase activity. Lipid requirement of carnitine acylcarnitine translocase." Eur J Biochem 155(1): 99-102.
- Nugteren, D. H. (1965). "The enzymic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes." Biochim Biophys Acta 106(2): 280-290.
- Nyman, L. R., L. Tian, et al. (2011). "Long term effects of high fat or high carbohydrate diets on glucose tolerance in mice with heterozygous carnitine palmitoyltransferase-1a (CPT-1a) deficiency: Diet influences on CPT1a deficient mice." Nutr Diabetes 1: e14.
- O'Neill, J. W., D. E. Kim, et al. (2001). "Single-site mutations induce 3D domain swapping in the B1 domain of protein L from *Peptostreptococcus magnus*." Structure 9(11): 1017-1027.
- Obici, S., Z. Feng, et al. (2003). "Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production." Nat Med 9(6): 756-761.
- Obici, S., Z. Feng, et al. (2002). "Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats." Nat Neurosci 5(6): 566-572.
- Obici, S., Z. Feng, et al. (2002). "Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake." Diabetes 51(2): 271-275.
- Oishi, Y., I. Manabe, et al. (2008). "SUMOylation of Krüppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta." Nat Med 14(6): 656-666.
- Ontko, J. A. and M. L. Johns (1980). "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 192(3): 959-962.
- Overath, P., G. Pauli, et al. (1969). "Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants." Eur J Biochem 7(4): 559-574.
- Palsdottir, H. and C. Hunte (2004). "Lipids in membrane protein structures." Biochim Biophys Acta 1666(1-2): 2-18.
- Pan, Y., I. Cohen, et al. (2002). "The Extreme C Terminus of Rat Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Is Not Involved in Malonyl-CoA Sensitivity but in Initial Protein Folding." Journal of Biological Chemistry 277(49): 47184-47189.
- Park, E. A. and G. A. Cook (1998). "Differential regulation in the heart of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I muscle and liver isoforms." Molecular and Cellular Biochemistry 180(1): 27-32.
- Park, E. A., R. L. Mynatt, et al. (1995). "Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I." Biochem J 310 (Pt 3): 853-858.
- Park, H. R. and J. Lee (2011). "Neurogenic contributions made by dietary regulation to hippocampal neurogenesis." Ann N Y Acad Sci 1229: 23-28.
- Paulson, D. J., K. M. Ward, et al. (1984). "Malonyl CoA inhibition of carnitine palmitoyltransferase in rat heart mitochondria." FEBS Letters 176(2): 381-384.
- Pauly, D. F. and J. B. McMillin (1988). "Importance of acyl-CoA availability in interpretation of carnitine palmitoyltransferase I kinetics." J Biol Chem 263(34): 18160-18167.

BIBLIOGRAFIA

- Pazos, F., M. Helmer-Citterich, et al. (1997). "Correlated mutations contain information about protein-protein interaction." Journal of Molecular Biology 271(4): 511-523.
- Peluso, G., O. Petillo, et al. (2002). "Decreased mitochondrial carnitine translocase in skeletal muscles impairs utilization of fatty acids in insulin-resistant patients." Front Biosci 7: a109-116.
- Pender, C., A. R. Trentadue, et al. (2006). "Expression of genes regulating malonyl-CoA in human skeletal muscle." J Cell Biochem 99(3): 860-867.
- Pfanner, N., J. Rassow, et al. (1992). "A dynamic model of the mitochondrial protein import machinery." Cell 68(6): 999-1002.
- Plum, L., B. F. Belgardt, et al. (2006). "Central insulin action in energy and glucose homeostasis." Journal of Clinical Investigation 116(7): 1761-1766.
- Poplawski, M. M., J. W. Mastaitis, et al. (2010). "Hypothalamic Responses to Fasting Indicate Metabolic Reprogramming Away from Glycolysis Toward Lipid Oxidation." Endocrinology: en.2010-0702.
- Popot, J. L. and D. M. Engelman (2000). "Helical membrane protein folding, stability, and evolution." Annu Rev Biochem 69: 881-922.
- Pownall, H. J. and J. A. Hamilton (2003). "Energy translocation across cell membranes and membrane models." Acta Physiologica Scandinavica 178(4): 357-365.
- Prentki, M. and B. E. Corkey (1996). "Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?" Diabetes 45(3): 273-283.
- Price, N. T., V. N. Jackson, et al. (2003). "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. 372(3): 871-879.
- Price, N. T., F. R. van der Leij, et al. (2002). "A Novel Brain-Expressed Protein Related to Carnitine Palmitoyltransferase I." Genomics 80(4): 433-442.
- Prip-Buus, C., I. Cohen, et al. (1998). "Topological and functional analysis of the rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett 429(2): 173-178.
- Proulx, K., D. Cota, et al. (2008). "Fatty acid synthase inhibitors modulate energy balance via mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in the central nervous system." Diabetes 57(12): 3231-3238.
- Proulx, K. and R. J. Seeley (2005). "The regulation of energy balance by the central nervous system." Psychiatr Clin North Am 28(1): 25-38, vii.
- Ramsay, R. R., R. D. Gandour, et al. (2001). "Molecular enzymology of carnitine transfer and transport." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 1546(1): 21-43.
- Ramsay, R. R. and V. A. Zammit (2004). "Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease." Molecular Aspects of Medicine 25(5-6): 475-493.
- Rao, J. N., G. Z. L. Warren, et al. (2011). "An environment-dependent structural switch underlies the regulation of carnitine palmitoyltransferase 1A." Journal of Biological Chemistry.
- Rapoport, S. I., M. C. Chang, et al. (2001). "Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain." J Lipid Res 42(5): 678-685.

BIBLIOGRAFIA

- Rasmussen, B. B. and R. R. Wolfe (1999). "Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle." Annu Rev Nutr 19: 463-484.
- Reamy, A. A. and M. J. Wolfgang (2011). "Carnitine palmitoyltransferase-1c gain-of-function in the brain results in postnatal microencephaly." J Neurochem 118(3): 388-398.
- Relat, J., C. Nicot, et al. (2004). "Pig muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPTI beta), with low Km for carnitine and low sensitivity to malonyl-CoA inhibition, has kinetic characteristics similar to those of the rat liver (CPTI alpha) enzyme." Biochemistry 43(39): 12686-12691.
- Relat, J., M. Pujol-Vidal, et al. (2009). "A characteristic Glu17 residue of pig carnitine palmitoyltransferase 1 is responsible for the low Km for carnitine and the low sensitivity to malonyl-CoA inhibition of the enzyme." FEBS Journal 276(1): 210-218.
- Robitaille, J., A. Houde, et al. (2007). "Variants within the muscle and liver isoforms of the carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) gene interact with fat intake to modulate indices of obesity in French-Canadians." Journal of Molecular Medicine 85(2): 129-137.
- Rodbell, M., L. Birnbaumer, et al. (1971). "The Glucagon-sensitive Adenyl Cyclase System in Plasma Membranes of Rat Liver." Journal of Biological Chemistry 246(6): 1877-1882.
- Roesler, W. J. (2000). "At the Cutting Edge What is a cAMP response unit?" Molecular and Cellular Endocrinology 162(1-2): 1-7.
- Ronnett, G. V., E. K. Kim, et al. (2005). "Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment." Physiol Behav 85(1): 25-35.
- Ross, R. A., L. Rossetti, et al. (2010). "Differential effects of hypothalamic long-chain fatty acid infusions on suppression of hepatic glucose production." American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism 299(4): E633-E639.
- Rostovtseva, T. and M. Colombini (1996). "ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane." J Biol Chem 271(45): 28006-28008.
- Rubio-Gozalbo, M. E., J. A. Bakker, et al. (2004). "Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects." Mol Aspects Med 25(5-6): 521-532.
- Ruderman, N. and M. Prentki (2004). "AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome." Nat Rev Drug Discov 3(4): 340-351.
- Ruderman, N. B., A. K. Saha, et al. (1999). "Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance." Am J Physiol 276(1 Pt 1): E1-E18.
- Rufer, A., R. Thoma, et al. (2009). "Structural insight into function and regulation of carnitine palmitoyltransferase." Cellular and Molecular Life Sciences 66(15): 2489-2501.
- Rufer, A. C., A. Lomize, et al. (2007). "Carnitine palmitoyltransferase 2: Analysis of membrane association and complex structure with a substrate analog." FEBS Letters 581(17): 3247-3252.
- Rufer, A. C., R. Thoma, et al. (2006). "The Crystal Structure of Carnitine Palmitoyltransferase 2 and Implications for Diabetes Treatment." Structure 14(4): 713-723.
- Ruge, T., L. Hodson, et al. (2009). "Fasted to fed trafficking of Fatty acids in human adipose tissue reveals a novel regulatory step for enhanced fat storage." J Clin Endocrinol Metab 94(5): 1781-1788.

BIBLIOGRAFIA

- Sadana, P., Y. Zhang, et al. (2007). "Regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I α) gene expression by the peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator (PGC-1) isoforms." Mol Cell Endocrinol 267(1-2): 6-16.
- Saggerson, E. D. and C. A. Carpenter (1981). "Effects of fasting and malonyl CoA on the kinetics of carnitine palmitoyltransferase and carnitine octanoyltransferase in intact rat liver mitochondria." FEBS Letters 132(2): 166-168.
- Saha, A. K., D. R. Laybutt, et al. (1999). "Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo." Am J Physiol 276(6 Pt 1): E1030-1037.
- Sahlin, K. (1978). "Intracellular pH and energy metabolism in skeletal muscle of man. With special reference to exercise." Acta Physiol Scand Suppl 455: 1-56.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-491.
- Sasaki, K., T. P. Cripe, et al. (1984). "Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. The dominant role of insulin." Journal of Biological Chemistry 259(24): 15242-15251.
- Schaffer, J. E. and H. F. Lodish (1994). "Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein." Cell 79(3): 427-436.
- Schenk, S. and J. F. Horowitz (2006). "Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training." American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism 291(2): E254-E260.
- Schmidt, I. and P. Herpin (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." The Journal of Nutrition 128(5): 886-893.
- Schoonjans, K., B. Staels, et al. (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(5): 907-925.
- Schreurs, M., F. Kuipers, et al. (2010). "Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome." Obes Rev 11(5): 380-388.
- Schubert, D., S. Humphreys, et al. (1969). "In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A 64(1): 316-323.
- Schwartz, M. W., A. J. Sipols, et al. (1992). "Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin." Endocrinology 130(6): 3608-3616.
- Schwinkendorf, D. R., N. G. Tsatsos, et al. (2011). "Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism." Int J Obes (Lond) 35(3): 336-344.
- Schägger, H. (2001). "Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria." Methods Cell Biol 65: 231-244.
- Sebastián, D., M. Guitart, et al. (2009). "Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells." Journal of Lipid Research 50(9): 1789-1799.
- Seeds, N. W., A. G. Gilman, et al. (1970). "Regulation of axon formation by clonal lines of a neural tumor." Proc Natl Acad Sci U S A 66(1): 160-167.

BIBLIOGRAFIA

- Sekoguchi, E., N. Sato, et al. (2003). "A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting." J Biol Chem 278(40): 38796-38802.
- Selby, P. L. and H. S. Sherratt (1989). "Substituted 2-oxiranecarboxylic acids: a new group of candidate hypoglycaemic drugs." Trends Pharmacol Sci 10(12): 495-500.
- Sheppard, T. L. (2010). "Unlocking the lipid labyrinth." Nat Chem Biol 6(7): 471.
- Shi, J., H. Zhu, et al. (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(31): 11033-11038.
- Shi, J., H. Zhu, et al. (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(14): 9421-9426.
- Shi, J., H. Zhu, et al. (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(4): 712-717.
- Shimokawa, T., M. V. Kumar, et al. (2002). "Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides." Proc Natl Acad Sci U S A 99(1): 66-71.
- Sierra, A. Y., E. Gratacós, et al. (2008). "CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity." J Biol Chem 283(11): 6878-6885.
- Siggers, K., C. Soto, et al. (2007). "Conformational dynamics in loop swap mutants of homologous fibronectin type III domains." Biophys J 93(7): 2447-2456.
- Silva, J., F. von Meyenn, et al. (2009). "Regulation of adaptive behaviour during fasting by hypothalamic Foxa2." Nature 462(7273): 646-650.
- Skene, J. H. and M. Willard (1981). "Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells." The Journal of Cell Biology 89(1): 86-95.
- Slawik, M. and A. J. Vidal-Puig (2006). "Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging." Ageing Res Rev 5(2): 144-164.
- Smith, B. K., S. S. Jain, et al. (2011). "FAT/CD36 is located on the outer mitochondrial membrane, upstream of long-chain acyl-CoA synthetase, and regulates palmitate oxidation." Biochem J 437(1): 125-134.
- Snipes, G., S. Chan, et al. (1987). "Evidence for the coidentification of GAP-43, a growth-associated protein, and F1, a plasticity-associated protein." The Journal of Neuroscience 7(12): 4066-4075.
- Song, S., Y. Zhang, et al. (2004). "Peroxisomal proliferator activated receptor gamma coactivator (PGC-1alpha) stimulates carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1alpha) through the first intron." Biochim Biophys Acta 1679(2): 164-173.
- Spector, A. A. (1986). "Structure and lipid binding properties of serum albumin." Methods Enzymol 128: 320-339.
- Stamp, T. C. (1966). "Plasma non-esterified fatty acid levels in hypopituitary subjects." J Endocrinol 35(1): 107-115.

BIBLIOGRAFIA

- Stanley, W. C., G. D. Lopaschuk, et al. (1997). "Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions." Cardiovasc Res 33(2): 243-257.
- Starritt, E. C., R. A. Howlett, et al. (2000). "Sensitivity of CPT I to malonyl-CoA in trained and untrained human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab 278(3): E462-468.
- Staub, F., A. Winkler, et al. (1995). "Clearance and metabolism of arachidonic acid by C6 glioma cells and astrocytes." Neurochem Res 20(12): 1449-1456.
- Stoppa, G. R., M. Cesquini, et al. (2008). "Intracerebroventricular injection of citrate inhibits hypothalamic AMPK and modulates feeding behavior and peripheral insulin signaling." J Endocrinol 198(1): 157-168.
- Stremmel, W., G. Lotz, et al. (1985). "Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes." J Clin Invest 75(3): 1068-1076.
- Stremmel, W. and L. Theilmann (1986). "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 877(1): 191-197.
- Stryer, L. (1995). Biochemistry. W. H. Freeman. New York: 685-691.
- Stübner, D. and R. A. Johnson (1989). "Forskolin decreases sensitivity of brain adenylate cyclase to inhibition by 2',5'-dideoxyadenosine." FEBS Letters 248(1-2): 155-161.
- Swanson, S. T., D. W. Foster, et al. (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(3): 513-519.
- Takahashi, K. A. and R. D. Cone (2005). "Fasting Induces a Large, Leptin-Dependent Increase in the Intrinsic Action Potential Frequency of Orexigenic Arcuate Nucleus Neuropeptide Y/Agouti-Related Protein Neurons." Endocrinology 146(3): 1043-1047.
- Taroni, F., E. Verderio, et al. (1992). "Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A 89(18): 8429-8433.
- Thampy, K. G. (1989). "Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart." Journal of Biological Chemistry 264(30): 17631-17634.
- Thorpe, C. and J. Kim (1995). "Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases." The FASEB Journal 9(9): 718-725.
- Thumelin, S., V. Esser, et al. (1994). "Expression of liver carnitine palmitoyltransferase I and II genes during development in the rat." Biochem J 300 (Pt 2): 583-587.
- Thupari, J. N., E. K. Kim, et al. (2004). "Chronic C75 treatment of diet-induced obese mice increases fat oxidation and reduces food intake to reduce adipose mass." Am J Physiol Endocrinol Metab 287(1): E97-E104.
- Thupari, J. N., L. E. Landree, et al. (2002). "C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity." Proc Natl Acad Sci U S A 99(14): 9498-9502.
- Tonazzi, A., L. Console, et al. (2012). "Identification by site-directed mutagenesis of a hydrophobic binding site of the mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier involved in the interaction with acyl groups." Biochim Biophys Acta 1817(5): 697-704.

BIBLIOGRAFIA

- Tonazzi, A., N. Giangregorio, et al. (2009). "Site-directed mutagenesis of the His residues of the rat mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier: implications for the role of His-29 in the transport pathway." Biochim Biophys Acta 1787(8): 1009-1015.
- Traufeller, K., F. N. Gellerich, et al. (2004). "Different sensitivities of CPT I and CPT II for inhibition by l-aminocarnitine in human skeletal muscle." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1608(2-3): 149-154.
- Treber, M., J. Dai, et al. (2003). "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." Journal of Biological Chemistry 278(13): 11145-11149.
- Tu, Y., J. N. Thupari, et al. (2005). "C75 Alters Central and Peripheral Gene Expression to Reduce Food Intake and Increase Energy Expenditure." Endocrinology 146(1): 486-493.
- Turkaly, P., J. Kerner, et al. (1999). "A 22 kDa polyanion inhibits carnitine-dependent fatty acid oxidation in rat liver mitochondria." FEBS Lett 460(2): 241-245.
- Tuteja, G., S. T. Jensen, et al. (2008). "Cis-regulatory modules in the mammalian liver: composition depends on strength of Foxa2 consensus site." Nucleic Acids Res 36(12): 4149-4157.
- Tutwiler, G. F., T. Kirsch, et al. (1978). "Pharmacologic profile of methyl 2-tetradecylglycidate (McN-3716)-an orally effective hypoglycemic agent." Metabolism 27(10): 1539-1556.
- Umesono, K., K. K. Murakami, et al. (1991). "Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors." Cell 65(7): 1255-1266.
- Valentini, G., M. Bianchetti, et al. (2008). "Effect of a selective and reversible hepatic CPT1 inhibitor on HOMA index and fasting blood glucose in diabetic type 2 patients." Diabetologia 51(S23).
- van den Top, M., K. Lee, et al. (2004). "Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus." Nat Neurosci 7(5): 493-494.
- van der Leij, F. R., K. B. Cox, et al. (2002). "Structural and Functional Genomics of the CPT1B Gene for Muscle-type Carnitine Palmitoyltransferase I in Mammals." Journal of Biological Chemistry 277(30): 26994-27005.
- Vannucci, S. J., F. Maher, et al. (1997). "Glucose transporter proteins in brain: Delivery of glucose to neurons and glia." Glia 21(1): 2-21.
- Velasco, G., M. J. H. Geelen, et al. (1998). "Malonyl-CoA-independent Acute Control of Hepatic Carnitine Palmitoyltransferase I Activity." Journal of Biological Chemistry 273(34): 21497-21504.
- Vilà, A. (2011). "Anàlisi del fenotip resultant de la modificació de l'expressió del gen 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial", Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Vogelstein, B. and D. Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." Proc Natl Acad Sci U S A 76(2): 615-619.
- Volpe, J. J. and K. A. Obert (1981). "Coordinate regulation of cholesterol synthesis and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase but not 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in C-6 glia." Archives of Biochemistry and Biophysics 212(1): 88-97.
- von Heijne, G. (1992). "Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule." J Mol Biol 225(2): 487-494.

BIBLIOGRAFIA

- Wanders, R. J. (2004). "Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders." Mol Genet Metab 83(1-2): 16-27.
- Wanders, R. J., J. Komen, et al. (2011). "Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans." FEBS J 278(2): 182-194.
- Wang, Y., A. Ozawa, et al. (2011). "The tumor suppressor protein menin inhibits AKT activation by regulating its cellular localization." Cancer Res 71(2): 371-382.
- Waterham, H. R., M. E. Digan, et al. (1997). "Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter." Gene 186(1): 37-44.
- Watkins, P. A., J. A. Hamilton, et al. (2001). "Brain uptake and utilization of fatty acids: applications to peroxisomal biogenesis diseases." J Mol Neurosci 16(2-3): 87-92; discussion 151-157.
- Weis, B. C., V. Esser, et al. (1994). "Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. The minor component is identical to the liver enzyme." Journal of Biological Chemistry 269(29): 18712-18715.
- Whitmer, J. T., J. A. Idell-Wenger, et al. (1978). "Control of fatty acid metabolism in ischemic and hypoxic hearts." J Biol Chem 253(12): 4305-4309.
- Wittig, I., H.-P. Braun, et al. (2006). "Blue native PAGE." Nat. Protocols 1(1): 418-428.
- Wittig, I. and H. Schägger (2008). "Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis." PROTEOMICS 8(19): 3974-3990.
- Woeltje, K. F., V. Esser, et al. (1990). "Inter-tissue and inter-species characteristics of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system." J Biol Chem 265(18): 10714-10719.
- Woeltje, K. F., V. Esser, et al. (1990). "Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase II." Journal of Biological Chemistry 265(18): 10720-10725.
- Woeltje, K. F., M. Kuwajima, et al. (1987). "Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. II. Use of detergents and antibodies." J Biol Chem 262(20): 9822-9827.
- Wolf, H. P. and D. W. Engel (1985). "Decrease of fatty acid oxidation, ketogenesis and gluconeogenesis in isolated perfused rat liver by phenylalkyl oxirane carboxylate (B 807-27) due to inhibition of CPT I (EC 2.3.1.21)." Eur J Biochem 146(2): 359-363.
- Wolfgang, M., S. Cha, et al. (2008). "Brain-specific carnitine palmitoyl-transferase-1c: role in CNS fatty acid metabolism, food intake, and body weight." J Neurochem 105(4): 1550-1559.
- Wolfgang, M., T. Kurama, et al. (2006). "The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A 103(19): 7282-7287.
- Wolfgang, M. J., S. H. Cha, et al. (2007). "Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin." Proc Natl Acad Sci U S A 104(49): 19285-19290.
- Wolfgang, M. J. and M. D. Lane (2011). "Hypothalamic malonyl-CoA and CPT1c in the treatment of obesity." FEBS J 278(4): 552-558.
- Wolfrum, C., E. Asilmaz, et al. (2004). "Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes." Nature 432(7020): 1027-1032.

BIBLIOGRAFIA

- Wu, D., L. Govindasamy, et al. (2003). "Structure of Human Carnitine Acetyltransferase." Journal of Biological Chemistry 278(15): 13159-13165.
- Yamanaka, A., C. T. Beuckmann, et al. (2003). "Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice." Neuron 38(5): 701-713.
- Yamazaki, N., Y. Shinohara, et al. (1995). "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 363(1-2): 41-45.
- Yamazaki, N., Y. Shinohara, et al. (1996). "Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1307(2): 157-161.
- Yang, G., L. Badeanlou, et al. (2009). "Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome." Am J Physiol Endocrinol Metab 297(1): E211-224.
- Yang, N., J. S. Kays, et al. (2005). "C75 [4-methylene-2-octyl-5-oxo-tetrahydro-furan-3-carboxylic acid] activates carnitine palmitoyltransferase-1 in isolated mitochondria and intact cells without displacement of bound malonyl CoA." J Pharmacol Exp Ther 312(1): 127-133.
- Yu, G.-S., Y.-C. Lu, et al. (1998). "Co-regulation of Tissue-specific Alternative Human Carnitine Palmitoyltransferase β Gene Promoters by Fatty Acid Enzyme Substrate." Journal of Biological Chemistry 273(49): 32901-32909.
- Zammit, V. A. (1983). "Increased sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I activity to malonyl-CoA inhibition after preincubation of intact rat liver mitochondria with micromolar concentrations of malonyl-CoA in vitro." Biochem J 210(3): 953-956.
- Zammit, V. A. (1984). "Mechanisms of regulation of the partition of fatty acids between oxidation and esterification in the liver." Prog Lipid Res 23(1): 39-67.
- Zammit, V. A. (1984). "Time-dependence of inhibition of carnitine palmitoyltransferase I by malonyl-CoA in mitochondria isolated from livers of fed or starved rats. Evidence for transition of the enzyme between states of low and high affinity for malonyl-CoA." Biochem J 218(2): 379-386.
- Zammit, V. A. (1999). "Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology." Prog Lipid Res 38(3): 199-224.
- Zammit, V. A. (2008). "Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function." IUBMB Life 60(5): 347-354.
- Zammit, V. A., C. G. Corstorphine, et al. (1984). "Changes in the ability of malonyl-CoA to inhibit carnitine palmitoyltransferase I activity and to bind to rat liver mitochondria during incubation in vitro. Differences in binding at 0 degree C and 37 degrees C with a fixed concentration of malonyl-CoA." Biochem J 222(2): 335-342.
- Zammit, V. A., C. G. Corstorphine, et al. (1998). "Lipid molecular order in liver mitochondrial outer membranes, and sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA." Lipids 33(4): 371-376.
- Zaugg, K., Y. Yao, et al. (2011). "Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress." Genes & Development 25(10): 1041-1051.
- Zhang, Y., K. Ma, et al. (2004). "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 279(52): 53963-53971.

BIBLIOGRAFIA

Zhu, H., J. Shi, et al. (1997). "Reconstitution of highly expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I." Biochem Biophys Res Commun 239(2): 498-502.

Zhu, H., J. Shi, et al. (1997). "Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I." Arch Biochem Biophys 347(1): 53-61.

Zhu, H., J. Shi, et al. (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(1): 67-74.

Zimmerman, A. W. and J. H. Veerkamp (2002). "New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins." Cell Mol Life Sci 59(7): 1096-1116.

APÈNDIXS

I. ABREVIATURES

Aa	Aminoàcids
ACC	Acetil-CoA Carboxilasa
Ad	Adenovirus
AgRP	<i>Agouti-related peptide</i>
AMPc	Monofosfat d'adenosina cíclic
AMPK	Cinasa depenent d'AMP
AP	Fosfatasa alcalina
APS	Persulfat amònic
AOX1	Alcohol oxidasa 1
Arc	Nucli arcuat
atm	Atmosferes
ATP	Trifosfat d'adenosina
bp	Parells de bases
BSA	Albúmina bovina sèrica
Bsx	<i>Brain-specific homeobox factor</i>
CACT	Carnitina acilcarnitina translocasa
CART	<i>Cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>
cDNA	DNA còpia
CoA	Coenzim A
CMV	Citomegalovirus
COT	Carnitina octanoiltransferasa
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
CrAT	Carnitina acetiltransferasa
CRE	Element de resposta a AMPc
CREB	Element d'unió a l'element de resposta a AMPc
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNL	Lipogènesi <i>de novo</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
dNTP	Desoxiribonucleòtid trifosfat
FAS	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FFA	Àcids grassos lliures
g	Gravetats
HMGCS2	Hidroximetilglutaril-CoA Sintasa 2 (mitocondrial)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSL	Lipasa sensible a hormones
IC₅₀	Concentració Inhibitòria 50
IPTG	Isopropil- α -D-tiogalactosidasa
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
K_m	Constant de Michaelis-Menten
LB	Medi Luria-Bertrani
LPL	Lipoproteïna lipasa
MCH	<i>Melanin-concentrating hormone</i>
MME	Membrana mitocondrial externa
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	RNA missatger
NGF	Factor de creixement neuronal

APÈNDIXS

NPY	Neuropèptid Y
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvat carboxicinasasa
POMC	<i>Pro-opiomelanocortin</i>
qRT-PCR	PCR quantitativa en temps real
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	Revolucions per minut
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
SNC	Sistema Nerviós Central
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
TEMED	N,N,N'-tetrametiletilendiamina
TG	Triglicèrids
T_m	<i>Melting temperature</i>
TM	Transmembrana
uORF	<i>Untranslated Open Reading Frame</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat
wt	<i>Wild-type</i> ; salvatge
YND	Yeast-Non-Essential aminoacids-Dextrose
YPD	Yeast-Peptone-Dextrose
3-D	Tridimensional

II. CONSTRUCCIONS

1. Plasmidis d'expressió en procariotes

Human CPT1C-pGEX4T1: cDNA dels últims 135 aminoàcids de *Human CPT1C* amplificat partint del plàsmid *Human CPT1C-pCMVSPORT6*. S'utilitzaren els encebadors DH1085 i DH1053, que introdueixen les dianes de restricció SmaI i XhoI, eliminant el codó de parada de la seqüència. Construcció emprada per tal de validar l'anticòs encarregat a *GenScript* contra els últims 14 residus de la proteïna.

Human AK299866-pGEX4T2: cDNA de la isoforma AK299866, corresponent a la regió soluble de la *CPT1C* humana, amplificat d'un *pool* d'RNA de cervell humà, mitjançant els oligos DH1118 i DH1119. Posteriorment, s'eliminà el codó d'inici de traducció i es van introduir les dianes de restricció BamHI i EcoRI mitjançant els oligos DH1252 i DH1266, respectivament, per tal de subclonar el cDNA en el vector pGEX4T2 i crear així la proteïna de fusió GST-AK299866.

APÈNDIXS

Human AK299866-pET43a: Prové de la digestió del plàsmid anterior amb els enzims BamHI i NotI, i el subclonatge en el plàsmid pET43a, creant així la proteïna de fusió NusA-AK299866.

2. Plasmidis d'expressió en llevats

2.1. Construccions amb el cDNA de la CPT1A de rata

Δ18 Rat CPT1A-pHW010: construcció cedida pel grup del Dr. Gebre Woldegiorgis, generada segons s'explica a l'apartat Materials i Mètodes de la publicació (Shi, Zhu et al. 1998).

Δ18+M593A Rat CPT1A-pHW010: construcció generada per la Dra. Laura Napal, emprant els oligos DH632 i DH633 per tal de mutar la posició Met⁵⁹³ a alanina per mutagènesi dirigida, sobre la construcció Δ18 Rat CPT1A-pHW010.

Δ18+E590A Rat CPT1A-pHW010: construcció generada per la Dra. Laura Napal, emprant els oligos DH630 i DH631 per tal de mutar la posició Glu⁵⁹⁰ a alanina per mutagènesi dirigida, sobre la construcció Δ18 Rat CPT1A-pHW010, segons s'explica a l'apartat Materials i mètodes de la publicació (Napal, Dai et al. 2003)

2.2. Construccions amb el cDNA de la CPT1B de porc

Δ18 Pig CPT1B-pHW010: Construcció detallada en l'apartat Materials i Mètodes de l'article adjunt (Veure Apèndixs, apartat Publicacions).

Δ28 Pig CPT1B-pHW010: construcció detallada en l'apartat Materials i Mètodes de l'article adjunt (Veure Apèndixs, apartat Publicacions).

E17D Pig CPT1B-pHW010: construcció detallada en l'apartat Materials i Mètodes de l'article adjunt (Veure Apèndixs, apartat Publicacions).

2.2. Construccions amb el cDNA de la CPT1B humana

D17E Human CPT1B-pHW010: construcció detallada en l'apartat Materials i Mètodes de l'article adjunt (Veure Apèndixs, apartat Publicacions).

D17K Human CPT1B-pHW010: Residu Asp¹⁷ mutat a Lys¹⁷ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de Human CPT1B clonat en el plàsmid pBSSK+ com a mottle. Oligos: HCPT1B-D17KF i D17KR.

APÈNDIXS

R22E Human CPT1B-pHW010: Residu Arg²² mutat a Glu²² per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: HCPT1B-R22EF i R22ER.

R25E Human CPT1B-pHW010: Residu Arg²⁵ mutat a Glu²⁵ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: HCPT1B-R25EF i R25ER.

K40A Human CPT1B-pHW010: Residu Lys⁴⁰ mutat a Ala⁴⁰ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: DH1341 i DH1342.

K40E Human CPT1B-pHW010: Residu Lys⁴⁰ mutat a Glu⁴⁰ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: DH1349 i DH1350.

K41A Human CPT1B-pHW010: Residu Lys⁴¹ mutat a Ala⁴¹ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: DH1343 i DH1344.

K41E Human CPT1B-pHW010: Residu Lys⁴¹ mutat a Glu⁴¹ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: DH1351 i DH1352.

R45A Human CPT1B-pHW010: Residu Arg⁴⁵ mutat a Ala⁴⁵ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: DH1345 i DH1346.

R45E Human CPT1B-pHW010: Residu Arg⁴⁵ mutat a Glu⁴⁵ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: DH1353 i DH1354.

K47A Human CPT1B-pHW010: Residu Lys⁴⁷ mutat a Ala⁴⁷ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: DH1347 i DH1348.

K47E Human CPT1B-pHW010: Residu Lys⁴⁷ mutat a Glu⁴⁷ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: DH1355 i DH1356.

APÈNDIXS

E433R Human CPT1B-pHW010: Residu Glu⁴³³ mutat a Arg⁴³³ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: HCPT1B-E433RF i E433RR.

E500R Human CPT1B-pHW010: Residu Glu⁵⁰⁰ mutat a Arg⁵⁰⁰ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: HCPT1B-E500RF i E500RR.

K561D Human CPT1B-pHW010: Residu Lys⁵⁶¹ mutat a Asp⁵⁶¹ per mutagènesi dirigida partint del cDNA de *Human CPT1B* clonat en el plàsmid pBSSK+ com a motlle. Oligos: HCPT1B-K561DF i K561DR.

2.3. Construccions quimèriques entre els cDNAs de la CPT1B humana i de porc

P50H CPT1B-pHW010: Construcció detallada en l'apartat Materials i Mètodes de l'article adjunt (Veure Apèndixs, apartat Publicacions).

P128H CPT1B-pHW010: Construcció detallada en l'apartat Materials i Mètodes de l'article adjunt (Veure Apèndixs, apartat Publicacions).

H50P CPT1B-pHW010: Construcció detallada en l'apartat Materials i Mètodes de l'article adjunt (Veure Apèndixs, apartat Publicacions).

H128P CPT1B-pHW010: Construcció detallada en l'apartat Materials i Mètodes de l'article adjunt (Veure Apèndixs, apartat Publicacions).

2.4. Altres construccions

Human CPT1C-pGAPZB: Construcció cedida pel grup del Dr. Victor Zammit, de la Universitat de Warwick (Coventry, UK). Conté el cDNA de *Human CPT1C* (Acc. Number NM_152359) clonat amb les dianes de restricció BstBI i XhoI, i fusionat a l'extrem C-terminal amb les etiquetes myc i (His)₆.

Rat CPT1A/C-pHW010: Conté els últims 32 aminoàcids de la CPT1C de rata fusionats a l'extrem C-terminal de la seqüència de la CPT1A de rata. S'encarregà la síntesi (*GenScript*) dels últims 237bp de la CPT1A de rata fusionats (eliminant el codó de parada) als últims 96bp de la CPT1C de la mateixa espècie. Es dissenyà una estratègia de clonatge que permetés alliberar el fragment d'interès amb l'enzim de restricció SacI i substituir així la regió C-terminal de la construcció *Rat CPT1A-pBSSK+* anteriorment obtinguda al laboratori.

3. Plasmidis d'expressió en eucariotes

Human CPT1C-pCMVSPORT6: Construcció adquirida a Open Biosystems® que conté la seqüència del cDNA de la CPT1C humana (*Acc.Number* BC_029104) clonada amb les dianes de restricció NotI-Sall flanquejants, orientació SP6. Presenta una deleció d'11 aminoàcids respecte el clon de *Human CPT1C* que s'ha utilitzat en aquest treball (*Acc.Number* NM_152359).

Human CPT1C(myc)-pCDNA3: Conté el cDNA de *Human CPT1C* (*Acc.Number* NM_152359) etiquetat amb myc a l'extrem C-terminal. Es realitzà un subclonatge en el vector pCDNA3myc partint de les construccions *Human CPT1C-pGAPZB* i *Human CPT1C(myc)-pCDNA3* (*Acc.Number* BC_029104), ambdues digerides amb els enzims Agel i Sfi. Conté la seqüència KOZAK original del gen just abans de l'inici de traducció.

Rat CPT1A(flag)-pCDNA3: Construcció generada per la Dra. Núria Camarero. Conté el cDNA de la CPT1A de rata etiquetat amb flag a l'extrem C-terminal. Es realitzà un subclonatge en el vector pCDNA3 partint de la construcció *Rat CPT1A-pCDNA3*. Conté la seqüència KOZAK original del gen just abans de l'inici de traducció.

4. Plasmidis reporters de luciferasa

hpCPT1C-D *luc*: Conté 957pb de la regió promotora del gen *CPT1C* humà (coordenades -916/+41). Es considerarà l'inici de transcripció (coordenada +1) a 1145pb corrent amunt respecte l'inici de traducció descrit (Price, van der Leij et al. 2002). DNA amplificat partint de DNA genòmic de cèl·lules humanes HepG2, amb els oligos DH929 i DH1004, que introdueixen les dianes de restricció EcoRV i HindIII per al posterior subclonatge en el vector pGL3basic.

hpCPT1C-DA *luc*: Conté 515pb de la regió promotora del gen *CPT1C* humà (coordenades -401/+41). En aquest cas s'empraren els oligos DH1001 i DH1004, que introdueixen les mateixes dianes de restricció.

hpCPT1C-DB *luc*: Conté 320pb de la regió promotora del gen *CPT1C* humà (coordenades -279/+41). S'empraren els oligos DH1002 i DH1004, que introdueixen les mateixes dianes de restricció.

hpCPT1C-DC *luc*: Conté 78pb de la regió promotora del gen *CPT1C* humà (coordenades -37/+41). S'empraren els oligos DH1003 i DH1004, que introdueixen les mateixes dianes de restricció.

hpCPT1C-D (2xCREmut) *luc*: Conté 957pb de la regió promotora del gen *CPT1C* humà (coordenades -916/+41) amb els dos putatius elements de resposta a CRE identificats en

APÈNDIXS

aquesta tesi doctoral mutats per mutagènesi dirigida. Per mutar el primer element (CRE1, coordenades -755/-745) s'empraren els oligos DH1256 i DH1257 i per mutar el segon, (CRE2, coordenades -274/-267) els oligos DH1258 i DH1259.

hpCPT1A (p600) luc: Construcció generada per la Dra. Cristina Mascaró. Conté 600pb de la regió promotora del gen CPT1A humà (coordenades -528/+69), amplificada amb els oligos DH564 i DH565.

rpCPT1A (p4500) luc: Construcció generada per la Dra. M.José Barrero segons s'explica a l'apartat Materials i Mètodes de la publicació (Barrero, Marrero et al. 2000).

III. OLIGONUCLEÒTIDS

1. Oligonucleòtids de vectors

Nom	Vector	Seqüència
T7	pBSSK, pCDNA3, pGEMT	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	pBSSK, pCDNA3, pGEMT	ATTTAGGTGACACTATAG
COLIDOWN	pET43	TTCACCTTCTGAGTTCCGGCATG
NusTag	pET43	AAAGCCGGAGCACTGATTATG
Luc For	pGL3basic	CTTATCATGTCTGGATCCAAGCTTGCATG
Luc Rev	pGL3basic	GTTCCATCTTCCAGCGGATAGAATGGCG
CMV For	pCDNA3	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
pGEX For	pGEX	GCAGGGCTGGCAAGCCACG
pGEX Rev	pGEX	CTGACGATCTGCCTCGCGC
60	pHWO10	GGATGGAAAAGTCCC GGCCG

2. Oligonucleòtids que hibriden amb gens

2.1. Oligonucleòtids del gen *Cpt1a* de rata

Nom (Fwd/Rev)	Diana	Seqüència
DH630 (F)		GCCTCACATATGCGGCCTCCATGACC
DH631 (R)		GGTCATGGAGGCCGCATATGTGAGGC
DH632 (F)		TACGAGGCCTCCGCGACCCGGCTCTTC
DH633 (R)		GAAGAGCCGGTTCGCGGAGGCCTCGTA

2.2. Oligonucleòtids del gen *CPT1B* humà

Nom (Fwd/Rev)	Diana	Seqüència
D17K (F)		GTTACGGTGACCCAAAAGGGTTCGACTCCGG
D17K (R)		CCGGAAGTCGACCCCTTTTGGGGTCCACCGTGAAC
R22E (F)		CGGGTTCGACTTCGAGCTCAGTCGGGAGGC

APÈNDIXS

R22E (R)	GCCTCCGACTGAGCTCGAAGTCGACCCCG
R25E (F)	CGACTTCCGGCTCAGTGAGGAGGCCCTGAAACAC
R25E (R)	GTGTTTCAGGGCCTCCTCACTGAGCCGGAAGTCG
K40A (F)	GGATCAACTCCTGGGCGAAACGCCTGATCCG
K40A (R)	CGGATCAGGCGTTTCGCCAGGAGTTGATCC
K41A (F)	CAACTCCTGGAAGCGCGCCTGATCCGCATCAAG
K41A (R)	CTTGATGCGGATCAGGCGCGCTTCCAGGAGTTG
R45A (F)	GGAAGAAACGCCTGATCGCGATCAAGAATGGCATCC
R45A (R)	GGATGCCATTCTTGATCGCGATCAGGCGTTTCTTCC
K47A (F)	GCCTGATCCGCATCGGAATGGCATCCTCAG
K47A (R)	CTGAGGATGCCATTTCGCGATCGGATCAGGC
K40E (F)	GGATCAACTCCTGGGAGAAACGCCTGATCCG
K40E (R)	CGGATCAGGCGTTTCTCCCAGGAGTTGATCC
K41E (F)	CAACTCCTGGAAGGAGCGCCTGATCCGCATCAAG
K41E (R)	CTTGATGCGGATCAGGCGCTCCTTCCAGGAGTTG
R45E (F)	GGAAGAAACGCCTGATCGAGATCAAGAATGGCATCC
R45E (R)	GGATGCCATTCTTGATCTCGATCAGGCGTTTCTTCC
K47E (F)	GCCTGATCCGCATCGAGAATGGCATCCTCAG
K47E (R)	CTGAGGATGCCATTCTCGATGCGGATCAGGC
E433R (F)	CTATGACCCCGAAGATAGGGCCAGCCTCAGCCTC
E433R (R)	GAGGCTGAGGCTGGCCCTATCTTCGGGGTCATAG
E500R (F)	CACCTGGGCTACACGAGGACCGGGCACTGCCTG
E500R (R)	CAGGCAGTGCCCGTCTCGTGTAGCCAGGTG
K561D (F)	CAAAGGCCTCATCAAGGATTGCCGACCAGCCCTG
K561D (R)	CAGGGCTGGTCCGGCAATCCTTGATGAGGCCTTTG

2.3. Oligonucleòtids del gen *CPT1C* humà

Nom (<i>Fwd/rev</i>)	Diana	Seqüència
DH929 (F)	EcoRV	AGTCGATATCACTGGATTGCTGTCTCCAC
DH1001 (F)	EcoRV	AGCTGATATCGCCTTTCTTGCCAAC
DH1002 (F)	EcoRV	AGCTGATATCGCCTGACGTTATAATGCACC
DH1003 (F)	EcoRV	AGCTGATATCTAGAACCGGGGATTGGAAG
DH1004 (R)	HindIII	AGCTAAGCTTATTCTCTCTCTCGTGTCCCT
DH1256 (F)		GTGCCAGCTCGCTGGGTGTGTGCGGGCACGGCTCG
DH1257 (R)		CGAGCCGTGCCCGCACACACCAGCGAGCTGGGCAC
DH1258 (F)		C CGGCACCTACGCGCCTGTGTGTGTAATGCACCTGGGGTG
DH1259 (R)		CACCCAGGTGCATTACACACACAGGCGGTAGGGTGCCGG
DH1085 (F)	Smal	<u>CCCGGGGCCCTTCTGACCCAG</u>
DH1053 (R)	XhoI	<u>CTCGAGAAGCTTGAAGTCGGTGGATGTCATT</u>
DH1118 (F)		TCGCTGCTGCAGTGGTA
DH1119 (R)		TAGTGTGGGGTCCGGGT
DH1252 (F)	BamHI	<u>GGATCCCTGTTTCAGTTACCAGC</u>
DH1266 (R)	EcoRI	<u>GAATTC</u> CAAGATGGCCGACC

APÈNDIXS

2.4. Oligonucleòtids d'altres gens

S'empraren els encebadors anomenats β act1 (F) i β act2 (R) per a l'amplificació de les β -actines humanes per RT-PCR. Tot i correspondre a la seqüència del gen de ratolí, conserven un 100% i un 89% d'identitat de seqüència amb la seqüència del gen humà, respectivament. Es confirmà la correcta amplificació pel tamany de l'amplicó (600pb).

β act1 - ACCAACTGGGACGACATGGAG

β act2 - GGAATCCTGTGGCATCCATGA

IV. MUTANTS DESCRITS DE DIFERENTS CARNITINA ACILTRANSFERASES

Canvi seqüència	Sistema d'expressió	Enzim	Efecte	IC ₅₀ (μM)	K _m Carnitina (μM)	K _m Acil-CoA (μM)	Referència		
		CPT1A Rata		2,7	32		McGarry, 1983		
		CPT1A Humà		1,6	39				
		CPT1B Rata (cor)		0,1	197				
		CPT1A Porc		0,16	311				
		CPT1B Humà		0,025	480				
		CPT1B Rata		0,034	507				
		CPT1B Gos		0,017	627				
		CPT1B Gos (cor)		0,025	695				
wt	Rates alimentades	CPT1A Rata					Cook, 1980		
	Rates en dejú (48h)		Menys sensible						
	Rates alimentades			2,8			Kerner, 2008		
	Rates en dejú (48h)		Menys sensible	9,1					
wt	<i>S. cerevisiae</i>	CPT1A Rata		5			Brown, 1994		
Δ83 Δ30-149			Menys sensible Inactiu	>80					
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1A Rata		2	32		de Vries, 1997 Shi, 1998		
Δ18			Menys sensible	380					
Δ35				200					
Δ52				170					
Δ73				180					
Δ83			No uneix MCoA	300					
Δ129			Inactiu, no uneix MCoA						
H5A H133A H140A H5A/H140A Rat L-CPT1 Rat M-CPT1 Rat L/M-CPT1 Rat ML-CPT1	<i>COS cells</i>	CPT1A Rata	Menys sens No canvis sens Menys sens Menys sens				Swanson, 1998		
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1A Rata		2	45	104	Shi, 1999		
E3A			Menys sensible	200				74,5	69,4
H5A				25					
Q6A				2					
Δ6			Menys sensible	197					
Δ12			Menys sensible	210					

APÈNDIXS

Canvi seqüència	Sistema d'expressió	Enzim	Efecte	IC ₅₀ (µM)	K _m Carnitina (µM)	K _m Acil-CoA (µM)	Referència
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1A Rata			100	43,05	Dai, 2000
R388A			No sensible		79,5	22,9	
R451A			No sensible		121,3	20,7	
R601A			Gairebé inactiu				
R606A					114,1	3,74	
R655A			Gairebé inactiu				
W391A					235,8	29,53	
W452A			No sensible		419,4	11,58	
wt	<i>P. pastoris</i> X-33	CPT1A Rata		38	153	46	Jackson,2000
E3A			Menys sensible	199	211	78,6	Jackson,2000
Δ(3-18)			Menys sensible	176	227	81,5	
Δ(1-82)			p=0,05	69	483	35,2	
Δ(19-30)			Més sensible	1,1	259	74,2	
Δ(19-46)			Més sensible	3	232	99,2	
E3A-Δ(19-30)			Menys sensible	130	232	57,7	
E3A-Δ(19-46)			Menys sensible	180	215	86,9	
E3D	<i>P. pastoris</i> X-33	CPT1A Rata		79	ND	ND	Jackson, 2001
E3Q*			Menys sensible	205	ND	ND	
E3AS24AQ30A*			Menys sensible	172	ND	ND	
D20AE26A				15,8	ND	ND	
R22AH25AK29A				12,9	ND	ND	
S24A			Més sensible	1,9	158	86,9	
Q30A			Més sensible	2,8	162	87,9	
S24AQ30A			Més sensible	1,1	164	72,7	
wt	<i>S. cerevisiae</i>	CPT1A Rata		0,53	102	41,2	Pan, 2002
Δ772-773	<i>S. cerevisiae</i>			0,5	113	44,1	
Δ767-773	<i>S. cerevisiae</i>			0,55	111	53,9	
Δ743-773	<i>S. cerevisiae</i>		Inactiu	ND	ND	ND	
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1A Rata		2	46	97,5	Treber, 2003
E603D				30	73	31,9	
E603Q			Pèrdua ~90% activ	27,5	38,8	14	
E603H			Inactiu				
E603A			Inactiu				
R601A			Pèrdua ~90% activ	84			
R606A			Pèrdua ~90% activ	82			
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1A Rata		3,39	59,3	153,5	Napal, 2003
E590A			Més sensible	0,21			
E590Q			Més sensible	0,39	87,6	62,2	
E590D			Inactiu		74,8	74,4	
E590K			Més sensible	0,25			
wt	<i>S. cerevisiae</i>	CPT1A Rata		12,3	127,4	4,9	Morillas, 2003
M593A			Menys sensible	155	56,3	6,1	
M593S			Menys sensible	319	124	7,4	
M593E			Menys sensible	220	150	6,3	
T314S				15	88,2	1,7	
N464D				8,7	69,5	4,1	
A478G				39,5	327	15,1	
C608A				27,5	51,6	24,3	
T314S/N464D/A478G/ M593S/C608A			Menys sensible	258	95,7	4,6	
H473A			Inactiu				
A381D			No canvis	~wt	93	33	

APÈNDIXS

Canvi seqüència	Sistema d'expressió	Enzim	Efecte	IC ₅₀ (µM)	K _m Carnitina (µM)	K _m Acil-CoA (µM)	Referència			
wt	<i>P. pastoris</i> X-33	CPT1A Rata		38,4	153	46	Price, 2003			
wt		CPT1A Ovella		29,8	215,1	37,4				
wt		CPT1B Rata		3,3	779	57,4				
wt		CPT1B Ovella		10,1	560,4	67,6				
(1-79)Rat/(80-771)Sheep		CPT1B Rata/Ovella		19,5	785,1	30				
wt	<i>S. cerevisiae</i>	CPT1A Rata			101	5,7	Morillas, 2004			
D477A			Inactiu							
D567A			Inactiu							
S685A			Pèrdua 50% activ	262	8,7					
T686A			Inactiu							
S687A			Inactiu							
E590D			Pèrdua 60% activ	137	5,7					
K455A			Pèrdua 45% activ	147	6,1					
K505A			Pèrdua 30% activ	105	2,4					
K560A			Pèrdua 50% activ	110	6,3					
K561A			Pèrdua 15% activ	130	5,9					
wt	<i>P. pastoris</i> X-33	CPT1A Rata		16,2	184,2	46,5	Borthwick, 2006			
TEVsite adjacent to TM2			Més sensible	1	170,8	64,1				
rand.insert adjacent to TM2			Més sensible	1,6	142,6	80,3				
TEVsite adjacent to TM1			No canvis	14	187,8	41,5				
E3A+insert				92,5	153,7	58,3				
Δ(1-82)+insert				10,5	143,8	59,7				
S24A/Q30A+insert				0,36	181,9	96,4				
CPT1A (B-loop)			Més sensible	1,6	156,2	46,5				
CPT1A (B-TM2)			Més sensible	2,5	227,6	102,6				
Δ(77-84)			Més sensible	1,8	235,1	47,6				
Δ(85-93)			Més sensible	0,2	259,6	64,2				
Δ(94-101)			Més sensible	0,8	202,1	49,3				
P79I			No canvis		213,7	68,6				
wt			<i>S. cerevisiae</i>	CPT1A Rata		7,3		59,7	3,6	López-Viñas, 2007
E26K					Menys sensible	92,4				
K561E	Menys sensible	88,1								
E26K+K561E	Swap	9,8								
R45D	No canvis									
D698R	No canvis									
R45D+D698R	No canvis									
R243T		38,4			56,3	7				
R243T+A478G		>150								
wt	<i>S. cerevisiae</i>	CPT1A Humà					Ijst, 1998			
D454G			Inactiu							
P479L	Cèl·lules COS	CPT1A Humà	Menys actiu, menys sensible				Brown, 2001			
R357W			Menys estable							
L484P			Menys estable							
R123C			Mobilitat aberrant							
A275T			No canvis							
C304W			Inactiu, menys estable							
ΔR395			Inactiu, menys estable							
wt			<i>P. pastoris</i> X-33	CPT1A Rata		25				Rao, 2011
E3R	Menys sensible	56								
A9G	Més sensible	1,5								
G18A		8,1								

APÈNDIXS

Canvi seqüència	Sistema d'expressió	Enzim	Efecte	IC ₅₀ (µM)	K _m Carnitina (µM)	K _m Acil-CoA (µM)	Referència
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1A Porc		0,141	126	35	Nicot, 2001
Δ18	<i>P. pastoris</i> GS115			~0,15	83	63	
Δ28	<i>P. pastoris</i> GS115			~0,09	97	62	
	Quimeres:						
Pig/Rat	(1-128)Pig/Rat			~2	147	31	
Rat/Pig	(1-128)Rat/Pig			~0,11	104	52	
Rat/Pig-A				~0,11	107	60	
Rat/Pig-B				~0,15	111	43	
Rat/Pig-C				~0,2	111	45	
Δ18 Pig/Rat				~0,18	124	50	
Δ28 Pig/Rat				~0,11	102	48	
wt	Rates alimentades	CPT1B Rata	No canvis	0,8			Paulson, 1984
	Rates en dejú (48h)		No canvis	0,8			
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1B Humà		0,07	666	42	Zhu, 1997
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1A Rata		2			Shi, 2000
wt		CPT1B Humà		0,07	530	93,8	
Δ18			Menys sensible	0,3			
Δ28			Menys sensible	7,5	408	56,8	
Δ39			Menys sensible	7,5			
Δ51			Menys sensible	3,5			
Δ72			Menys sensible	7			
Δ83			Inactiu				
ML-41	CPT1A+(N-term CPT1B)		No canvis	1,5			
ML-79	CPT1A+(N-term CPT1B)		No canvis	9			
ML-130	CPT1A+(N-term CPT1B)		No canvis	2			
ML-197	CPT1A+(N-term CPT1B)		Inactiu				
wt	<i>P. pastoris</i> X-33	CPT1B Rata		3,3	779		Jackson, 2000
Δ3-18A			p=0,05	4,5	1710		
Δ19-30			no canvis				Jackson, 2000
Δ1-80			Menys sensible	11,1	641		
	Quimeres:	CPT1A/B Rata					
MLL	CPT1B fins aa81			58,6			
MML	CPT1B fins aa118			64,4			
LML	CPT1B del 81-118			35,1			
LMM	CPT1A fins aa81			4,3			
LLM	CPT1A fins aa118			4,4			
MLM	CPT1A del 81-118			3,9			
	81-118=loop+TM2						
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1B Humà		0,07	913	67,9	Zhu, 2003
V19A			no canvis				
L23A			no canvis				
S24A			no canvis				
L28A			no canvis				
V19AL28A			no canvis				
V19AL23AS24A			no canvis				
V19AL23AL28A			no canvis				
D18+V19AL23AS24A			menys sensible	10	630	273,1	
E3A			menys sensible	4	617	82,3	
H5A			no canvis	0,15	968	40,4	
E3AV19AL23A			menys sensible	4			
E3AS24A			menys sensible	4			
EVLS			menys sensible	10	706	7,8	
EHVLS			menys sensible	6,8	652	6,2	

APÈNDIXS

Canvi seqüència	Sistema d'expressió	Enzim	Efecte	IC ₅₀ (µM)	K _m Carnitina (µM)	K _m Acil-CoA (µM)	Referència
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1B Porc		0,906	197	82	Relat, 2004
wt		CPT1B Humà		0,09	683		Relat, 2009
Δ18		CPT1B Porc		35,56			
Δ28				39,19			
H50P	50 Porc + resta Humà			0,218			
H128P	128 Porc + resta Humà			0,322			
P50H	50 Humà + resta Porc			0,395			
P128H	128 Humà + resta Porc			0,358			
Pig E17D			Més sensible	0,297	605,95		
Human D17E				0,279	769,51		
E531K		CPT1B Humà	FENOTIP obesitat				Robitaille, 2007
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT1B Humà		0,096	666		Pujol, 2012, Tesi
D17K				0,057	600,43		
R25E				0,036	610,81		
E433R				0,081			
E500R				0,082	528,71		
K561D				0,084	688,82		
K40A				0,062			
K40E				0,125			
K41A				0,128			
K41E				0,087			
R45A				0,027			
R45E				0,054			
K47A				0,218			
K47E				0,144			
wt	<i>S. cerevisiae</i>	COT liver Rata		76	172	2	Morillas, 2002
A332G			Menys sensible	492			
A238D			No canvis	~wt	146	16,7	Morillas, 2001
H327A			Inactiu				
H131A+H340A			Insensible		106		Morillas, 2000
wt	<i>E. coli</i>	COT Liver Bovina			94,8		Cronin, 1997
R505N	<i>E. coli</i>				1650		
wt	<i>P. pastoris</i> GS115	CPT2 Rata			105		de Vries, 1997
wt	<i>S. cerevisiae</i>	CPT2 Rata			121	191	Brown, 1994
V605A					x4	no canvis	
G609A					x5	no canvis	
G611A					x4,5	no canvis	
D376A			Inactiu				
D464A			Inactiu				
H372A			Inactiu				
H372K			Inactiu				
D353A			Gairebé inactiu				
wt	<i>E. coli</i>	CPT2 liver Rata			63,7	81,9	Zheng, 2002
E487A			Inactiu				
E487D			Inactiu				
E487K			Inactiu				
E500A			Pèrdua 42% activ		105,6	19,9	
E500D			Pèrdua 75% activ		111,4	8,8	
wt		CrAT					Jogl G, 2003
H343							
S554							
M564	<i>E. coli</i>	CrAT Ratolí					Hsiao, 2004
M564G							
M564A							
F565A							
M564G	<i>E. coli</i>						Cordente, 2004

PUBLICACIONES

A characteristic Glu17 residue of pig carnitine palmitoyltransferase 1 is responsible for the low K_m for carnitine and the low sensitivity to malonyl-CoA inhibition of the enzyme

Joana Relat, Magdalena Pujol-Vidal, Diego Haro and Pedro F. Marrero

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy and Institute of Biomedicine of Barcelona University (IBUB), Spain

Keywords

carnitine affinity; fatty acid oxidation; human CPT1B; malonyl-CoA inhibition; pig CPT1B

Correspondence

P. F. Marrero, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Diagonal 643, 08028 E-08028 Barcelona, Spain
Fax: +34 93 402 45 20
Tel: +34 93 403 45 00
E-mail: pedromarrero@ub.edu

(Received 4 September 2008, revised 15 October 2008, accepted 31 October 2008)

doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06774.x

Human carnitine palmitoyltransferase 1B (CPT1B) is a highly malonyl-CoA-sensitive enzyme ($IC_{50} = 0.097 \mu M$) and has a positive determinant (residues 18–28) of malonyl-CoA inhibition. By contrast, rat carnitine palmitoyltransferase 1A is less sensitive to malonyl-CoA inhibition ($IC_{50} = 1.9 \mu M$), and has both a positive (residues 1–18) and a negative (residues 18–28) determinant of its inhibition. Interestingly, pig CPT1B shows a low degree of malonyl-CoA sensitivity ($IC_{50} = 0.804 \mu M$). Here, we examined whether any additional molecular determinants affect malonyl-CoA inhibition of CPT1B. We show that the malonyl-CoA sensitivity of CPT1B is determined by the length (either 50 or 128 residues) of the N-terminal region constructed by recombining pig and human enzymes. We also show that the N-terminal region of pig CPT1B carries a single positive determinant of malonyl-CoA sensitivity, but that this is located between residues 1 and 18 of the N-terminal segment. Importantly, we found a single amino acid variation (D17E) relevant to malonyl-CoA sensitivity. Thus, Asp17 is specifically involved, under certain assay conditions, in the high malonyl-CoA sensitivity of the human enzyme, whereas the naturally occurring variation, Glu17, is responsible for both the low malonyl-CoA sensitivity and high carnitine affinity characteristics of the pig enzyme. This is the first demonstration that a single naturally occurring amino acid variation can alter CPT1B enzymatic properties.

Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) catalyzes the conversion of long-chain fatty acyl-CoAs to acylcarnitines in the presence of L-carnitine. This is the first step in the transport of long-chain fatty acids from the cytoplasm to the mitochondrial matrix, where they undergo β -oxidation. CPT1 is tightly regulated by its physiological inhibitor malonyl-CoA, and this regulation allows CPT1 to signal the availability of lipid and carbohydrate fuels to the cell [1].

CPT1 is encoded by three paralogous genes referred to as *CPT1A*, *CPT1B*, and *CPT1C*. Whereas *CPT1A* is widely expressed in most tissues, CPT1B is only

expressed in muscle, adipose tissue, heart, and testis [1], and CPT1C expression seems to be restricted to the central nervous system [2,3].

Expression studies performed with cDNAs isolated from a variety of mammals [4–8] have shown that the kinetic characteristics of the recombinant CPT1A and CPT1B enzymes are similar to those of endogenous mitochondrial activities [1] and, therefore, both expressed enzymes differ markedly in their kinetic behavior – specifically, in their K_m for carnitine and their sensitivity to malonyl-CoA inhibition. Thus, rat CPT1A [4–6] exhibits a low K_m for carnitine and

Abbreviations

CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TM, transmembrane segment.

decreased sensitivity to malonyl-CoA inhibition (higher IC_{50}), whereas human CPT1B [7,8] exhibits a high K_m for carnitine and increased sensitivity to inhibition by malonyl-CoA (lower IC_{50}). However, this rule (i.e. high IC_{50} , low carnitine K_m , and vice versa) [9] does not apply to all kinetically characterized CPT1 enzymes [10]. The expression of CPT1C in yeast or mammalian cells has resulted in no enzyme activity in mitochondria [2,3] and low rates of activity in microsomes of neuronal cells [11].

CPT1A is a polytopic integral membrane protein, with two segments (N-terminus and C-terminus) exposed on the cytosolic side of the mitochondrial outer membrane, and two transmembrane segments (TM1 and TM2) linked by a loop that protrudes into the intermembrane space of the mitochondrion [12,13]. The C-terminal segment (residues 123–773 for rat CPT1A, or residues 123–772 for human CPT1B) contains the enzyme catalytic site. Switching between the N-terminal and C-terminal segments has little effect on malonyl-CoA sensitivity [14,15]. However, site-directed mutagenesis and deletion experiments have shown that both the cytosolic N-terminal segment (residues 1–48) and intermembrane segment (residues 76–104) of the N-terminal region play an important role in malonyl-CoA sensitivity [16–21]. This apparent discrepancy supports the idea that specific interactions between the N-terminal and C-terminal segments are relevant to malonyl-CoA sensitivity, which in turn may explain the differences observed in malonyl-CoA inhibition between CPT1A and CPT1B. Thus, for rat CPT1A, positive (residues 1–18) and negative (residues 19–30) domains for malonyl-CoA sensitivity have been clearly characterized [17,18,20]. However, the deletion of the first 28, but not 18, N-terminal residues of human CPT1B abolishes malonyl-CoA inhibition and high-affinity binding [20,22], indicating the presence of a different positive domain (residues 18–28) and the absence of a negative determinant, which correlates with the characteristic high malonyl-CoA sensitivity of human CPT1B [7,8].

The cloning and expression of pig CPT1A [10] and CPT1B [23] helped to explain the peculiar fatty acid metabolism of pigs [24,25], and also revealed the presence of orthologous genes with some kinetic characteristics of the paralogous genes. Thus, pig CPT1A is a natural chimera that has a low IC_{50} for malonyl-CoA (more sensitive) when compared to that of rat CPT1A, but still has the low carnitine K_m , characteristic of the CPT1A isotypes [10,23]. By contrast, pig CPT1B behaves kinetically as a CPT1A isotype [high IC_{50} for malonyl-CoA (less sensitive) and a low carnitine K_m when compared to that of human CPT1B] [23].

Pig CPT1A has been successfully used to perform chimera studies with rat CPT1A [16]. Therefore, to highlight the role of the CPT1B N-terminal segment, we took advantage of this naturally occurring pig CPT1B enzyme to generate N-terminal deletions of this CPT1B with low sensitivity, as well as N-terminal switching experiments with the human (highly sensitive) CPT1B enzyme. We show in this article that malonyl-CoA sensitivity is determined by the length (either 50 or 128 residues) of the N-terminal region constructed by recombining pig and human CPT1B. We next identified a conserved single residue, Asp17, as a positive determinant for malonyl-CoA sensitivity of the human enzyme, and showed that the variant, Glu17, in the pig enzyme is responsible for its peculiar kinetic characteristics (low carnitine K_m and high malonyl-CoA IC_{50}).

This is the first report of a natural single-residue variation (D17E) in the N-terminal region of a CPT1B enzyme altering its kinetic properties (carnitine K_m and malonyl-CoA IC_{50}). As the pig N-terminal fragment is able to change the malonyl-CoA sensitivity of the human enzyme, we propose that the pig enzyme can be used as a tool with which to investigate the molecular differences between CPT1A and CPT1B, which dictate differences in malonyl-CoA sensitivity.

Results

The N-terminal region (residues 1–18) of pig CPT1B behaves as a positive determinant for malonyl-CoA inhibition

Low-malonyl-CoA-sensitive rat CPT1A ($IC_{50} = 1.9\mu\text{M}$) has positive (residues 1–18) and negative (residues 19–28) determinants of malonyl-CoA inhibition in the N-terminal fragment of the enzyme [17,18,20]. Pig CPT1B also shows low sensitivity to malonyl-CoA inhibition ($IC_{50} = 0.80\mu\text{M}$) [23] when compared to the human enzyme ($IC_{50} = 0.097\mu\text{M}$) [7,8]. To ascertain whether the presence of a negative domain in the N-terminal region of the pig enzyme could be responsible for its low level of malonyl-CoA inhibition, we determined the IC_{50} of wild-type pig CPT1B and two deleted versions ($\Delta 18$ and $\Delta 28$). These deleted enzymes were active (Table 1) and expressed in *Pichia pastoris* (Fig. 1A) at the same levels as the corresponding wild-type enzyme. Figure 1B shows that the $\Delta 18$ deletion mutant had very low sensitivity to malonyl-CoA ($IC_{50} = 35.56\mu\text{M}$), suggesting that this N-terminal segment of pig CPT1B behaves as a positive determinant for malonyl-CoA sensitivity (as in rat CPT1A). Paradoxically, this determinant is stronger than that

Table 1. Activity and kinetic characteristics of yeast-expressed wild-type N-terminal deletion mutants and chimera CPT1B constructs. Mitochondria (100 μg) from the yeast strains expressing human or pig wild-type enzyme, pig CPT1B deletions and CPT1B chimeras were assayed for CPT1 activity and malonyl-CoA IC_{50} measured at 1 mM carnitine as described in Experimental procedures. H50P and H128P have, respectively, the first 50 or 128 N-terminal amino acids of the pig enzyme recombined with the human enzyme. P50H and P128H have the first 50 or 128 N-terminal amino acids of the human enzyme recombined with the pig enzyme. For all parameters, values are means \pm SD for three independent assays with at least two independent mitochondrial preparations. Values that are statistically significantly different from those of the parental construct are indicated.

Strain	Activity ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Malonyl-CoA IC_{50} (μM)
Wild-type		
Pig CPT1B	2.79 \pm 1.90	0.804 \pm 0.157
Human CPT1B	4.43 \pm 2.98	0.096 \pm 0.057
Deletion and chimeras		
Δ 18PigCPT1B	15.28 \pm 7.84	35.56 \pm 1.58 ^a
Δ 28PigCPT1B	9.42 \pm 6.31	39.19 \pm 15.57 ^b
H50P	9.43 \pm 2.71	0.190 \pm 0.078
H128P	10.59 \pm 5.36	0.325 \pm 0.110 ^b
P128H	4.16 \pm 2.86	0.359 \pm 0.167 ^b
P50H	4.49 \pm 1.70	0.457 \pm 0.181 ^b

^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.05$.

previously characterized for human CPT1B [20,22]. Figure 1B also shows that a Δ 28 N-terminal deletion created a similarly insensitive enzyme ($\text{IC}_{50} = 39.19\mu\text{M}$), indicating that the low sensitivity to malonyl-CoA of the pig enzyme is not related to the presence of a negative determinant between residues 19 and 28 in the N-terminal region of the enzyme.

Switching the N-terminal region between human and pig CPT1B affects malonyl-CoA inhibition

To study the role of the N-terminal fragment of CPT1B enzymes, four human–pig chimeras were constructed by recombining pig and human CPT1B sequences before (H50P and P50H) and after (H128P and P128H) TM1 and TM2 respectively (Fig. 2A). These chimeras had similar specific activities (Table 1) and were expressed in *P. pastoris* at the same level (data not shown) as wild-type human or pig CPT1B. This type of switching between pig and rat CPT1A [16], or even rat CPT1A and human CPT1B [14,15], does not affect malonyl-CoA sensitivity. However, Fig. 2B clearly shows that the N-terminal fragment of pig or human CPT1B enzymes determines the overall malonyl-CoA sensitivity of these enzymes. Thus, the N-terminal 50 amino acids of the human sequence

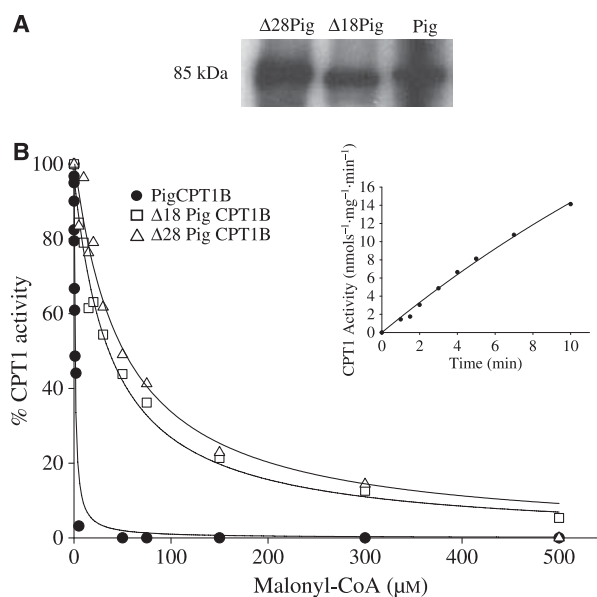


Fig. 1. Malonyl-CoA sensitivity of N-terminal deletion mutants. (A) Immunoblot showing expression of deleted and wild-type pig CPT1B enzymes in the yeast *P. pastoris*. Mitochondria (10 μg of protein) were separated by 8% SDS/PAGE. Lane 1: Δ 28Pig. Lane 2: Δ 18Pig. Lane 3: Pig wild-type. (B) Isolated mitochondria were assayed for CPT1 activity in the presence of increasing concentrations of malonyl-CoA. Each construct was assayed at least three times with at least two independent mitochondrial preparations. The insert shows kinetics of the pig CPT1B enzyme measured at 0.2 mM carnitine.

increased the malonyl-CoA sensitivity of the mostly pig P50H chimera, whereas the N-terminal 128 amino acids of the pig sequence decreased the malonyl-CoA sensitivity of the mostly human H128P chimera.

Single E17D substitution

The alignment of the first 50 residues of CPT1B enzymes from different species (Fig. 3A) shows two amino acid substitutions between pig and human CPT1B enzymes: glutamate by aspartate at position 17, and isoleucine by valine at position 31. However, the sole amino acid change between pig, human and rat CPT1B is the substitution of glutamate by aspartate at position 17. To show that this substitution might act as a negative determinant for the low malonyl-CoA sensitivity of pig CPT1B, we generated two new CPT1B mutants, pig E17D and human D17E, and analyzed the affinity for the substrate carnitine and malonyl-CoA sensitivity. These mutants were active (Table 2) and expressed in *P. pastoris* at the same level as wild-type human or pig CPT1B (data not shown). Figure 3B and Table 2 show that the single

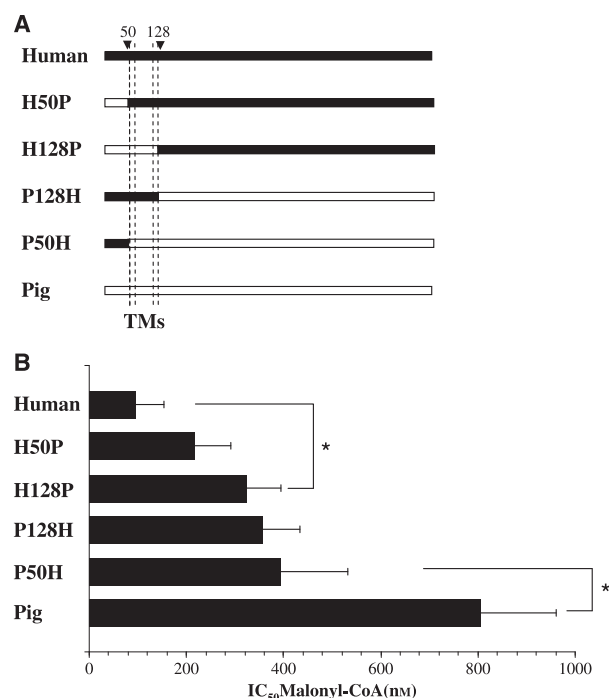


Fig. 2. Malonyl-CoA sensitivity of human and pig chimeric proteins. (A) Schema of human and pig CPT1B chimeras. The numbers over the vertical arrows indicate the amino acid number at which the proteins were recombined. (B) IC₅₀ for malonyl-CoA inhibition of the different human and pig CPT1B chimeras. Each construct was assayed at least three times with at least two independent mitochondrial preparations. Values statistically different from its parental construct are indicated. **P* < 0.05.

amino acid substitution (E17D) increased the carnitine K_m of the pig enzyme (605.9 versus 197.5 μM), whereas the same substitution in the human enzyme (D17E) did not significantly affect its carnitine affinity (769.5 versus 683.0 μM). Figure 3C and Table 2 show that the IC₅₀ values of these two single mutants were similar and that they lay between the IC₅₀ values of the human and pig CPT1B wild-type enzymes. These results indicate that a single amino acid variation (E17D) is responsible for the peculiar characteristics of the pig enzyme (low carnitine K_m and high malonyl-CoA IC₅₀) and, whereas Glu17 acts as a negative determinant for malonyl-CoA sensitivity in pig CPT1B, Asp17 is a positive determinant for human CPT1B.

Discussion

Understanding the regulation of CPT1 by malonyl-CoA is important in designing drugs to control excessive fatty acid oxidation in diabetes mellitus [26], and in myocardial ischemia, where accumulation of long-

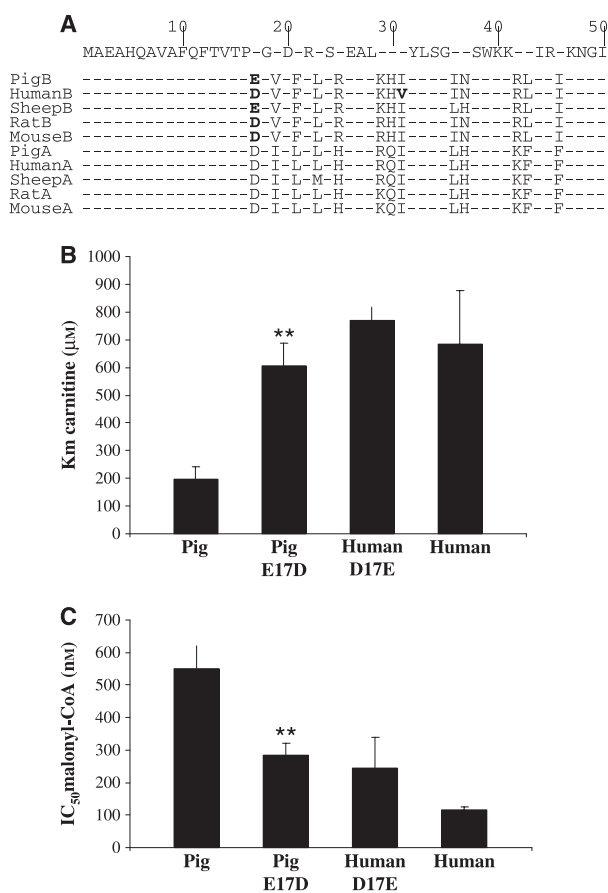


Fig. 3. Malonyl-CoA sensitivity of human D17E and pig E17D mutants. (A) CPT1 amino acid sequences alignment of the first 50 residues of CPT1B enzymes from different species. It shows two amino acid variations between pig and human CPT1B; glutamate by aspartate at position 17 (in bold), and isoleucine by valine at position 31. (B) Carnitine K_m values of wild-type CPT1B and mutants. (C) IC₅₀ for malonyl-CoA inhibition of wild-type CPT1B and mutants analyzed at carnitine concentrations equal to the K_m for each enzyme. Each construct was assayed at least three times with at least two independent mitochondrial preparations. Values statistically different from those of the parental construct are indicated. ***P* < 0.001.

chain acyl-carnitines has been associated with arrhythmias [27].

For the rat CPT1A enzyme, it has been clearly established that malonyl-CoA sensitivity is determined by the interaction between the N-terminal and C-terminal (residues 123–773) cytosolic segments of the enzyme [16,19,28]. In addition, positive (residues 1–18) and negative (residues 19–28) malonyl-CoA sensitivity determinants [17,18,20] have been dissected in the N-terminal region of this enzyme, which is less malonyl-CoA sensitive than human CPT1B. The IC₅₀ for malonyl-CoA inhibition of human CPT1B (IC₅₀ = 0.096 μM) [7,22,23] is ~10-fold lower than

Table 2. Activity and kinetic characteristics of yeast-expressed wild-type enzyme and mutant CPT1B constructs. Mitochondria (100 µg) from the yeast strains expressing human or pig wild-type enzyme and CPT1B mutants were assayed for CPT1 activity and kinetic parameters. Malonyl-CoA IC₅₀ was measured at carnitine concentrations equal to the *K_m* of each enzyme or 1 mM. The activities (nmol/min/mg) of pig E17D and human D17E mutants were 4.62 ± 1.46 and 4.13 ± 1.37 respectively. For all parameters, values are means ± SD for three independent mitochondrial preparations. Values that are statistically significantly different from those of the parental construct are indicated.

Strain	Carnitine <i>K_m</i> (µM)	Malonyl-CoA (carnitine = 1 mM) IC ₅₀ (µM)	Malonyl-CoA (carnitine = <i>K_m</i>) IC ₅₀ (µM)
Wild-type			
Pig CPT1B	197.58 ± 42.45	0.804 ± 0.157	0.550 ± 0.070
Human CPT1B	683.05 ± 195.64	0.096 ± 0.057	0.117 ± 0.009
Mutants			
Pig E17D	605.95 ± 82.67 ^b	0.297 ± 0.078 ^b	0.284 ± 0.037 ^b
Human D17E	769.51 ± 46.91	0.279 ± 0.055 ^a	0.246 ± 0.093

^a *P* < 0.05, ^b *P* < 0.001.

that of the orthologous encoded enzyme from pig (IC₅₀ = 0.80 µM) [23]. However, the IC₅₀ values of the Δ18 (IC₅₀ = 35.5 µM) and Δ28 (IC₅₀ = 39.2 µM) pig CPT1B deletion mutants (Fig. 1) indicate the presence of a single positive determinant (residues 1–18) and the absence of any negative determinant (between residues 19 and 28) that could account for the low degree of sensitivity of pig CPT1B. Interestingly, the same deletion experiment on human CPT1B (Δ18 CPT1B) creates a still-sensitive enzyme (IC₅₀ = 0.3 µM), when compared to the human Δ28 mutant (IC₅₀ = 7.5 µM) [17,22]. Thus, the positive determinants for malonyl-CoA sensitivity are located in different positions in the pig (residues 1–18) and human (residues 18–28) enzymes. The high degree of identity in the N-terminal sequences of these two proteins (Fig. 3A) suggests that the docking of the N-terminal fragment into the C-terminal region is different between the human and pig enzymes (see below).

Deletion experiments do not explain the difference in malonyl-CoA sensitivity between pig and human CPT1B. To determine whether the N-terminal region plays a role in this difference, a series of switching mutations were constructed from N-terminal residues 50 (H50P and P50H) to 128 (H128P and P128H). All of the recombinant enzymes were active, and they showed varying degrees of sensitivity to malonyl-CoA inhibition, depending on the size of the recombinant N-terminal region (Fig. 2B). This was in contrast to previous switching experiments with pig and rat CPT1A [16] or rat CPT1A and human CPT1B [14,15], in which malonyl-CoA sensitivity was attributable to the C-terminal fragment of the enzyme. Therefore, we demonstrate here that the N-terminal fragment of CPT1B plays a specific role in malonyl-CoA sensitivity. As the degree of identity is high, this specific role,

associated with strong sequence similarity, is probably related to a specific interaction with the human or pig C-terminal region of the enzymes.

Sequence alignment of the first 50 N-terminal amino acids of CPT1 shows the high degree of identity between these enzymes (Fig. 3A). In fact, the H50P mutant (the first 50 residues from human CPT1 and residues 51–773 from pig CPT1; see Fig. 2A) is a pig D17E/V31I double mutant. However, whereas Val31 is only characteristic of the human enzyme; Glu17 is only present in the pig, sheep (also a low-malonyl-CoA-sensitive enzyme) [29] and cow (not shown, not kinetically characterized) sequences. As pig lipid catabolism differs from that of other mammals [24,25], and the kinetic characteristics of recombinant pig CPT1A and CPT1B can explain these peculiarities [10,23], we speculate that the single amino acid variation observed between pig and human (Asp17 for human and Glu17 for pig) might be responsible for the kinetic characteristics of both CPT1B enzymes. Consequently, we generated two single mutant (pig E17D and human D17E) CPT1B enzymes and evaluated their malonyl-CoA IC₅₀ and carnitine *K_m* (pig CPT1B also differs from the human enzyme in carnitine *K_m* [23]). Owing to the putative relationship between malonyl-CoA and carnitine binding [9], malonyl-CoA inhibition (IC₅₀) was determined at two different substrate concentrations of carnitine: 1 mM (for standard comparison with other published data), and a concentration equal to the *K_m* for carnitine of each enzyme (for comparison between mutants). In this article, we show that Glu17 variation affects both the carnitine affinity and malonyl-CoA inhibition of the pig enzyme, whereas Asp17 only affects malonyl-CoA inhibition of the human enzyme (Fig. 3 and Table 2). Therefore, the E17D pig single mutant enzyme shows the typical kinetics

characteristics of a CPT1B isotype [high carnitine K_m (605 μM) and low malonyl-CoA IC_{50} (0.284 μM)], in contrast to the atypical ones of the pig CPT1B wild-type enzyme. In addition, we show that whereas the natural variation Glu17 behaves as a negative malonyl-CoA-sensitive determinant for the pig CPT1B enzyme; Asp17 seems to be a positive determinant for human CPT1B malonyl-CoA sensitivity (Table 2).

The relevance of Asp17 in malonyl-CoA sensitivity of the human CPT1B enzyme appears to be in conflict with the results of deletion experiments in which deletions in the first 28, but not 18, N-terminal residues of human CPT1B abolished malonyl-CoA inhibition and high-affinity binding [20,22]. However, other single amino acid substitutions in the first 18 N-terminal residues of the human enzyme, such as Glu3, also affected malonyl-CoA sensitivity [30]. These data suggest that N-terminal/C-terminal docking is differently affected by residue deletion and charge substitution. To fully elucidate the role of Asp17 in human CPT1B malonyl-CoA sensitivity, further studies must be performed.

The role of Val31 or of Ile31 appears to be limited in human and pig enzymes, as the sensitivities to malonyl-CoA of the human E17D ($\text{IC}_{50} = 0.279 \mu\text{M}$) and pig D17E ($\text{IC}_{50} = 0.297 \mu\text{M}$) single mutants are not statistically different from that of the human E17D/V31I [P50H ($\text{IC}_{50} = 0.48 \mu\text{M}$)] and pig D17E/I31V [H50P ($\text{IC}_{50} = 0.19 \mu\text{M}$)] double mutants. In addition, Val 31 is not present in the sheep CPT1B sequence, in which the N-terminal segment (residues 1–79) has been related to the low IC_{50} of this recombinant enzyme [26].

As the pig N-terminal fragment is able to change the malonyl-CoA sensitivity of the human enzyme (Fig. 2C), we propose that the pig enzyme can be used as a tool with which to investigate the molecular differences between CPT1A and CPT1B, which dictate variations in malonyl-CoA sensitivity, and which are probably related to the N-terminal/C-terminal fragment interaction. Recently, an *in silico* three-dimensional model showed the putative interaction between the N-terminal and C-terminal regions of CPT1A [9]. In this model, Asp17 does not face the C-terminal fragment. A possible explanation for this is that, in the case of CPT1B, the docking of the N-terminal fragment might differ from that of the established model. A further explanation for our data might be that Asp17 interacts within a quaternary structure of the CPT1 enzyme. Interestingly, it has recently been proposed that CPT1 forms a trimeric catalytic complex [31]. Therefore, the N-terminal segment might also interact with a C-terminal fragment from another monomer. Both possibilities are currently under investigation.

In conclusion, by using orthologous genes with kinetic characteristics of paralogous genes, we have performed a switching experiment that indicates a specific role for the N-terminal fragment of CPT1B in determining malonyl-CoA sensitivity.

Furthermore, we identified a D17E variation in the pig CPT1B sequence as being responsible for the peculiar kinetic characteristics of this enzyme, acting as a negative determinant for malonyl-CoA sensitivity. Asp17 may account, at least in part, for the high degree of inhibition of the human enzyme.

Experimental procedures

Construction of deletions $\Delta 18\text{PigCPT1B}$ and $\Delta 28\text{PigCPT1B}$ for CPT1B expression in *P. pastoris*

The deletions $\Delta 18\text{PigCPT1B}$ and $\Delta 28\text{PigCPT1B}$ were generated from the construct PMCPT1STOP/pBSSK⁺ [23]. To obtain $\Delta 18\text{PigCPT1B}$ and $\Delta 28\text{PigCPT1B}$, deletion primers DH671 (5'-AGCTGAATTCATGGTCGACTTCAGGCTCAGC-3') and DH762 (5'-AGCTGAATTCATGAAACATA TCTACCTGTCCGGG-3') were used in combination with the reverse primer PCPT1B-R1 (5'-GTATTCCTCGTCATCCAG-3'). The PCR reactions yielded a 558- and 528-bp product, respectively, in which an *EcoRI* site (in bold in the forward primer sequences) was introduced just before the ATG codon (underlined in the forward primer sequences).

These PCR products were cloned in pGEMT and sequenced. The plasmids generated were digested with *ApaI* and *HindIII*, taking advantage of the presence of the *ApaI* restriction site in the pGEMT polylinker and the *HindIII* site at position +523 of pig CPT1B cDNA. The inserts (548 and 518 bp, respectively) were liberated and ligated in the digested *ApaI* and *HindIII* PMCPT1STOP-BSSK⁺ (*ApaI* is also included in the BSSK⁺ polylinker), resulting in constructs $\Delta 18\text{PigCPT1B-BSSK}^+$ and $\Delta 28\text{PigCPT1B-BSSK}^+$, respectively.

Construction of chimeras P50H, P128H, H50P, H128P for CPT1B expression in *P. pastoris*

The constructs described in this article were generated from constructs PMCPT1STOP-pBSSK⁺ [23] and HMCPT1-pHWO10 (kindly provided by G. Woldegiorgis, Oregon Health and Science University). Initially, one point mutation was introduced in the construct HMCPT1-pHWO10 to eliminate an *EcoRI* restriction site located in human CPT1B cDNA (position +628). This construct was used as a template to introduce a mutation using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The primers were DH869 (5'-GGAGTTGCTGGCCAAAGAGTTCAGGACAAGACTGCC-3') and DH870

(5'-GGGCAGTCTTGTCTGGAACTCTTTGGCCAGCAACTCC-3') (mutated *EcoRI* site is in bold in the primer sequences, and the point mutation is underlined). Using this procedure, we generated the construct HumanCPT1Bmut-pHW010.

At the same time, an *EcoRI* restriction site was introduced just before the ATG of human CPT1B. The construct HMCPT1-pHW010 was used as a template in a PCR reaction with primers DH673 (5'-AGCTGAATTCATGGCGGAAGCTCACCAG-3') and DH677 (5'-TTCCTCATCATCCAACAAGGG-3'). The PCR reaction yielded a 610-bp product in which an *EcoRI* site (in bold in the forward primer sequence) was introduced just before the ATG codon (underlined in the forward primer sequence). This PCR product was cloned in pGEMT, generating the construct pGEMT-5'HumanCPT1B.

In order to generate the chimeras P128H and H128P, we introduced a mutation in constructs PMCPT1STOP-pBSSK+ and pGEMT-5'HumanCPT1B at position +384 of the cDNAs (amino acid 128), so as to generate a *BspTI* restriction site. To mutate human CPT1B cDNA, we used the construct pGEMT-5'HumanCPT1B as a template in a PCR reaction with primers DH673 (5'-AGCTGAATTCATGGCGGAAGCTCACCAG-3') and DH803 (5'-TCCACCCATGGTAGCAGAGAAGCAGCTTAAGGGTTTGGCGGA-3'). The PCR reaction yielded a 422-bp product, in which an *EcoRI* site (in bold in the forward primer sequence) was introduced just before the ATG codon (underlined in the forward primer sequence), and a point mutation was introduced at position +422 of the human CPT1B cDNA (underlined in the reverse primer sequence). This PCR product was cloned in pGEMT, generating the construct pGEMT-5'HumanCPT1B-BspTI. This construct was digested with *EcoRI* and *NcoI*, and ligated into the *EcoRI*-*NcoI*-digested construct pGEMT-5'HumanCPT1B, taking advantage of the *EcoRI* restriction site located just before the ATG and *NcoI* restriction site at position +402 of human CPT1B cDNA. This procedure results in the construct pGEMT-5'HumanCPT1B-BspTIbis.

The constructs pGEMT-5'HumanCPT1B and pGEMT-5'HumanCPT1B-BspTIbis were then digested with *HindIII* (located at position +523 of human CPT1B cDNA) and *ApaI* (included in the pGEMT polylinker), resulting in 5'-inserts of the human CPT1B cDNA (529 bp). In parallel, the construct HumanCPT1Bmut-pHW010 was digested with *EcoRI* (located just after the stop codon in human CPT1B cDNA), filled and digested with *HindIII*, generating the 3'-insert of human CPT1B cDNA (1834 bp). The 5'-inserts and the 3'-insert were ligated in BSSK+ digested with *ApaI* and *EcoRV*, taking advantage of two restriction sites located in the BSSK+ polylinker. The constructs generated were HumanCPT1Bmut-pBSSK+ and HumanCPT1Bmut-BspTI-pBSSK+.

To mutate pig CPT1B cDNA, we used the construct PMCPT1STOP-pBSSK+ as a template for a reaction with

the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). The primers used were DH801 (5'-TTCTTCCGCCAAACCTTAAGCTGCTGCTTTCCTAC-3') and DH802 (5'-GTAGGAAAGCAGCAGCTTAAGGGTTTGGCGGAAGAA-3'). Using this procedure, we generated the construct PigCPT1BSTOP-BspTI-pBSSK+.

The chimeras P50H and H50P were generated by digestion of constructs PMCPT1STOP-pBSSK+ and HumanCPT1Bmut-pBSSK+ with *ApaI* and *XcmI*, taking advantage of an *ApaI* restriction site located in the BSSK+ polylinker and a *XcmI* restriction site in pig CPT1B cDNA and human CPT1B cDNA (position +183). The fragments obtained were cross-ligated, resulting in constructs P50H-pBSSK+ and H50P-pBSSK+, respectively.

The chimeras P128H and H128P were generated by digestion of constructs PigCPT1BSTOP-BspTI-pBSSK+ and HumanCPT1Bmut-BspTI-pBSSK+ with *ApaI* and *BspTI*, taking advantage of an *ApaI* restriction site located in the BSSK+ polylinker and a *BspTI* restriction site in pig CPT1B and human CPT1B cDNAs (position +382). The fragments obtained were cross-ligated, resulting in constructs P128H-pBSSK+ and H128P-pBSSK+, respectively.

The mutants PigE17D-pBSSK+ and HumanD17E-pBSSK+ were generated using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit. The constructs PMCPT1STOP-pBSSK+ and HumanCPT1Bmut-pBSSK+ were used as templates. The primers used were DH973 (5'-CAGTGACCCCAGACGGGTCGACTTC-3') and DH974 (5'-GGCTGGTCGTCGCCTCGGCAACAGCGGGTTCCTCCTTC-3') for pig CPT1B, and DH977 (5'-CGGTGACCCCAGAAGGGGTGACTTC-3') and DH978 (5'-GAAGTCGACCCCTTCTGGGTCACCG-3') for human CPT1B.

All constructs were sequenced. DNA sequencing was performed using the Big Dye™ kit (Applied Biosystems, PerkinElmer Life Sciences, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

***P. pastoris* transformation**

All constructs were cloned into the unique *EcoRI* site, located 3' of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene promoter (*GAPp*), in the pHW010 plasmid [6,32], to produce P50H-pHW010, P128H-pHW010, H50P-pHW010, H128P-pHW010, PigE17D-pHW010, and HumanD17E-pHW010. These constructs were linearized in the GAPDH gene promoter by digestion with *AvrII* (constructs P50H, P128H and PigE17D) or *BspMI* (constructs H50P, H128P and HumanD17E), and integrated into the GAPDH gene promoter locus of *P. pastoris* GS115 by electroporation [32]. Histidine prototrophic transformants were selected on YND (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate) plates, and grown on YND medium. Mitochondria were isolated by disrupting the yeast cells with glass beads as previously described [6,10].

CPT1 assay

CPT1 activity was assayed by the forward exchange method using L-[³H]carnitine as previously described [6]. The standard assay reaction mixture contained, in a total volume of 0.5 mL, 1 mM L-[³H]carnitine ($\sim 10\,000$ dpm·nmol⁻¹), 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, and the reactions were stopped with perchloric acid. The palmitoylcarnitine produced was extracted with butanol and quantified by liquid scintillation.

IC₅₀ for malonyl-CoA and carnitine K_m

The IC₅₀ value was obtained by assaying mitochondria in the presence of increasing malonyl-CoA concentrations (from 0 to 15 μ M for P50H, H50P, P128H, H128P, PigE17DCPT1B and HumanD17ECPT1B, and from 0 to 500 μ M for Δ 18PigCPT1B and Δ 28PigCPT1B). The assay was performed at 1 mM carnitine as standard. To analyze PigE17DCPT1B and HumanD17ECPT1B mutants, the assay was performed at carnitine concentrations equal to the K_m. The percentage of activity was plotted against the malonyl-CoA concentration, considering the assay points without malonyl-CoA as representing 100% of CPT1 activity. Data were fitted to exponential decay curves (linear scale) or to competition curves (logarithmic scale) for IC₅₀ calculation. The K_m for carnitine was obtained by assaying mitochondria in the presence of increasing carnitine concentrations: 50–1500 μ M for pig CPT1B, and 50–2000 μ M for human CPT1B.

Western blot analysis and DNA sequencing

Proteins were separated by SDS/PAGE in an 8% gel and transferred onto poly(vinylidene difluoride) membranes. Pig CPT1A-specific antibody was obtained as previously described [10], and used at a 1 : 1000 dilution. This antibody also recognizes other CPT1 proteins [16,23]. Proteins were detected using the ECL chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Acknowledgements

This project was supported by grants BFU2007-67322/BMC (to P. F. Marrero) from the Ministerio de Educación y Ciencia, RCMNC03/08 (to D. Haro) from Red de Centros (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad), and from the Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya 2005SGR00857. We are grateful to G. Woldegiorgis (Oregon Health and Science University) for providing the expression plasmid HMCPT1/pHW010.

References

- McGarry JD & Brown NF (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 & Zammit V (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* **80**, 433–442.
- Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, Suwa A, Asaumi M, Matsumoto S, Cha SH, Shimokawa T & Lane MD (2006) The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7282–7287.
- Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW & McGarry JD (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.
- Brown NF, Esser V, Foster DW & McGarry JD (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.
- de Vries Y, Arvidson DN, Waterham HR, Cregg JM & Woldegiorgis G (1997) Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* **36**, 5285–5292.
- Zhu H, Shi J, de Vries Y, Arvidson DN, Cregg JM & 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 JM & Woldegiorgis G (1997) Reconstitution of highly expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 498–502.
- López-Viñas E, Bentebibel A, Gurunathan C, Morillas M, de Arriaga D, Serra D, Asins G, Hegardt FG & Gómez-Puertas P (2007) Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Biol Chem* **282**, 18212–18224.
- Nicot C, Hegardt FG, Woldegiorgis G, Haro D & Marrero PF (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.
- Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Ureña J, Serra D, Asins G, Hegardt FG & Casals N (2008) CPT1C is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem* **283**, 6878–6885.

- 12 Kolodziej MP & Zammit VA (1993) Mature carnitine palmitoyltransferase I retains the N-terminus of the nascent protein in rat liver. *FEBS Lett* **327**, 294–296.
- 13 Fraser F, Corstorphine CG & Zammit VA (1997) Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem J* **323**, 711–718.
- 14 Swanson ST, Foster DW, McGarry JD & Brown NF (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.
- 15 Jackson VN, Cameron JM, Fraser F, Zammit VA & Price NT (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.
- 16 Nicot C, Relat J, Woldegiorgis G, Haro D & Marrero PF (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.
- 17 Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Cregg JM & 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.
- 18 Shi J, Zhu H, Arvidson DN & 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.
- 19 Jackson VN, Price NT & Zammit VA (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.
- 20 Jackson VN, Zammit VA & Price NT (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.
- 21 Borthwick K, Jackson VN, Price NT & Zammit VA (2006) The mitochondrial intermembrane loop region of rat carnitine palmitoyltransferase 1A is a major determinant of its malonyl-CoA sensitivity. *J Biol Chem* **281**, 32946–32952.
- 22 Shi J, Zhu H, Arvidson DN & 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.
- 23 Relat J, Nicot C, Gacias M, Woldegiorgis G, Marrero PF & Haro D (2004) Pig muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPTI beta) with low K_M for carnitine and low sensitivity to malonyl-CoA inhibition has kinetic characteristics similar to those of the rat liver (CPTI alpha) enzyme. *Biochemistry* **43**, 12686–12689.
- 24 Duee PH, Pegorier JP, Quant PA, Herbin C, Kohl C & Girard J (1994) Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity. *Biochemistry J* **298**, 207–212.
- 25 Schmidt I & Herpin P (1998) Carnitine palmitoyltransferase I (CPTI) 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.
- 26 Prentki M & Corkey BE (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.
- 27 Corr PB & Yamada KA (1995) Selected metabolic alterations in the ischemic heart and their contributions to arrhythmogenesis. *Herz* **20**, 156–168.
- 28 Faye A, Borthwick K, Esnous C, Price NT, Gobin S, Jackson VN, Zammit VA, Girard J & Prip-Buus C (2005) Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular interactions in rat liver carnitine palmitoyltransferase I that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity. *Biochem J* **387**, 67–76.
- 29 Price NT, Jackson VN, van der Leij FR, Cameron JM, Travers MT, Bartelds B, Huijkman NC & Zammit VA (2003) 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* **372**, 871–879.
- 30 Zhu H, Shi J, Treber M, Dai J, Arvidson DN & 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.
- 31 Faye A, Esnous C, Price NT, Onfray MA, Girard J & Prip-Buus C (2007) Rat liver carnitine palmitoyltransferase I forms an oligomeric complex within the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **282**, 26908–26916.
- 32 Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV & Cregg JM (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**, 37–44.



Buff, espero que
els meus futurs
embarassos no
siguin tan difícils
de portar!!