

Anàlisi del fenotip resultant de la modificació de l'expressió del gen 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial

Anna Vilà Brau

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.



Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**ANÀLISI DEL FENOTIP RESULTANT DE LA
MODIFICACIÓ DE L'EXPRESSION DEL GEN
3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL-CoA SINTASA
MITOCONDRIAL**

Anna Vilà Brau
2011



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

**ANÀLISI DEL FENOTIP RESULTANT DE LA
MODIFICACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN
3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL-CoA SINTASA
MITOCONDRIAL**

Memòria presentada per Anna Vilà Brau per optar al títol de doctor de la Universitat de Barcelona

Dr. Diego Haro Bautista
Director

Anna Vilà Brau
La doctoranda

Aquesta tesi ha estat realitzada gràcies a la concessió d'una beca de recerca i docència de la Universitat de Barcelona (BRD 2006-2007) i de l'Ajut per la Contractació de Personal Investigador Novell de la Generalitat de Catalunya (FI 2008-2011).

ÍNDEX

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS	1
INTRODUCCIÓ	3
I. HOMEÒSTASI ENERGÈTICA I ELS COSSOS CETÒNICS	5
1. CETOGÈNESI	6
2. UTILITZACIÓ COSSOS CETÒNICS	7
3. COSSOS CETÒNICS COM A MOLÈCULES SENYALITZADORES	8
II. HMG-CoA SINTASA MITOCONDRIAL	9
1. ENZIM CLAU DE LA REGULACIÓ DE COSSOS CETÒNICS	9
2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSION DEL GEN <i>HMGCS2</i>	10
2.1. Regulació transcripcional	10
2.1.1. Resposta als àcids grassos	11
2.1.2. Resposta a AMPc	12
2.1.3. Resposta a insulina	12
2.1.4. Resposta a glucocorticoids	13
2.1.5. Resposta a inhibidors d'histona desacetilases	13
2.1.6. Resposta a senyals de proliferació	13
2.2. Control de la traducció	15
2.3. Regulació post-traducciona	15
2.3.1. Control de l'activitat <i>HMGCS2</i> per succinilació	15
2.3.2. Regulació per palmitoilació	16
2.3.3. Regulació per acetilació/desacetilació	16
3. PATRÓ D'EXPRESSION DEL GEN <i>HMGCS2</i>	17
3.1. Expressió en fetge	17
3.2. Expressió en intestí	17
3.3. Expressió en ronyó	18
3.4. Expressió en gònades	18
3.5. Expressió en cervell	19
3.6. Expressió en cèl·lules del sistema immune	19
3.7. Expressió en pròstata	20
3.8. Expressió en múscul esquelètic i cor	20
3.9. Expressió en teixit adipós	20
III. RECEPTORS NUCLEARS	21
1. CLASSIFICACIÓ	21
2. ESTRUCTURA	22

ÍNDIX

3. MECANISME D'ACCIÓ	23
4. RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS DE PEROXISOMES (PPARS)	23
4.1. PPAR α	24
IV. FIBROBLAST GROWTH FACTOR 21 (FGF21)	26
1. FGF21 COM A HORMONA	27
2. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL	28
2.1. Receptors nuclears	28
2.2. Ritmes circadianis	28
2.3. Carbohidrats	29
3. PAPER EN METABOLISME GLUCÍDIC I LIPÍDIC	29
3.1. Acció sistèmica	29
3.2. Múscul esquelètic	30
3.3. Teixit adipós	30
3.5. Fetge	31
V. SIRTUINES	32
1. SIRT1	32
2. SIRT3	33
VI. FAT SPECIFIC PROTEIN 27 (FSP27) O CIDEC	33
MATERIALS I MÈTODES	37
<hr/>	
MATERIALS	
1. SOQUES BACTERIANES	39
2. LÍNIES CEL·LULARS ESTABLERTES	39
3. ANIMALS	40
4. VECTORS	
4.1. Vectors de clonatge	40
4.2. Vectors d'expressió procariota	41
4.3. Vectors d'expressió eucariota	41
4.4. Vectors reporters	42
5. OLIGONUCLEÒTIDS	42
6. ANTICOSSOS	
6.1. Anticossos primaris	42
6.2. Anticossos secundaris	42
7. REACTIUS	

7.1. Material radioactiu	43
7.2. Reactius utilitzats en cultius cel·lulars	43
7.3. Marcadors de pes molecular de DNA i proteïna	44
7.4. Altres reactius	44
8. EINES INFORMÀTIQUES	46
MÈTODES	
I. OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ DEL DNA	
1. OBTENCIÓ DE DNA	46
1.1. Preparació de DNA plasmídic	46
1.2. Obtenció de DNA genòmic	47
1.2.1. De teixits	47
1.2.2. De cèl·lules mare embrionàries	47
1.3. Precipitació de DNA	48
1.4. Quantificació del DNA	48
1.5. Ressolució, identificació i purificació de fragments de DNA	48
1.5.1. Separació de fragments de DNA en gels d'agarosa	48
1.5.2. Purificació de fragments de DNA de gels d'agarosa	49
2. MODIFICACIÓ ENZIMÀTICA DEL DNA	50
2.1. Digestió de DNA	50
2.2. Desfosforil·lació de DNA	50
2.3. Lligació de DNA	51
3. CONSTRUCCIÓ DE MOLÈCULES DE DNA RECOMBINANT	51
3.1. Clonatge de fragments de DNA	52
3.2. Subclonatge de fragments de DNA	52
3.3. Transformació de cèl·lules de E. Coli	53
3.3.1. Preparació de cèl·lules competents: mètode del clorur càlcic	52
3.3.2. Transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic	53
3.4. Selecció de colònies transformades	53
4. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	53
4.1. Amplificació de DNA	54
4.2. PCR-PREPS	55
5. SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA DEL DNA	56
II. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE L'RNA	
1. OBTENCIÓ DE L'RNA TOTAL	56
2. QUANTIFICACIÓ DE L'RNA TOTAL	57

ÍNDIX

3. RT-PCR QUANTITATIVA	57
3.1. Síntesi del cDNA a partir de l'RNA	57
3.2. Eliminació del DNA genòmic	58
3.3. PCR quantitativa (Real Time PCR)	58
III. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES	
1. OBTENCIÓ D'EXTRACTE CRU DE PROTEÏNES	59
2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES: MÈTODE DE BRADFORD	60
3. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)	61
4. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER IMMUNOTRANSFERÈNCIA: <i>WESTERN BLOT</i>	62
5. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER TINCIÓ AMB <i>COMASSIE BRILLIANT BLUE</i>	63
6. IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTE EN CULTIUS CEL·LULARS	64
6.1. Fixació de cèl·lules sobre cobreobjectes de vidre	64
6.2. Permeabilització	65
6.3. Bloqueig	65
6.4. Incubació amb els anticossos	66
6.5. Muntatge i anàlisi al microscopi confocal	66
7. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ	66
8. ASSAIG D'UNIÓ DE PROTEÏNES (<i>GST-PULLDOWN</i>)	
8.1. Reacció d'unió	68
8.2. Recuperació de complexos proteics	69
IV. CULTIUS CEL·LULARS	
1. CONDICIONS DE CULTIU	69
2. CONGELACIÓ DE CÈL·LULES	69
3. DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES	70
4. TRANSFECCIONS DE CÈL·LULES EUCARIOTES	70
4.1. Transfecció transitòria per assajos d'activitat luciferasa	70
4.2. Transfecció transitòria per assajar l'eficiència dels shRNA	71
5. TECNOLOGIA DE L'RNA D'INTERFERÈNCIA	72
5.1. Transfecció de cèl·lules empaquetadores per l'obtenció de retrovirus	73
5.2. Infecció de cèl·lules amb retrovirus	74
5.3. Generació de línies estables	74
5.4. Transfecció de molècules siRNA	75

6. INFECCIÓ DE CÈL·LULES AMB ADENOVIRUS	75
6.1. Adenovirus utilitzats i protocol d'infecció	76
6.2. Amplificació d'adenovirus	76
6.3. Titulació d'adenovirus	77
V. ASSAJOS RADIOQUÍMICS	
1. MESURA D'OXIDACIÓ DE PALMITAT	78
2. ASSAIG RADIOQUÍMIC PER MESURAR ACTIVITAT HMGCS2	79
2.1. Obtenció de mitocondris i diàlisi	79
2.1. Assaig radioquímic d'HMGCS2	80
3. MESURA D'ACTIVITAT CPT TOTAL	80
VI. EXPERIMENTACIÓ ANIMAL	
1. INJECCIÓ D'ADENOVIRUS PER LA VENA CAUDAL	81
2. CINÈTICA DEL DEJUNI	81
3. OBTENCIÓ DEL SÈRUM	82
4. DETERMINACIÓ DE LA GLICÈMIA	82
5. DETERMINACIÓ DE NEFAs EN SÈRUM	82
6. DETERMINACIÓ DE COSSOS CETÒNICS EN SÈRUM	83
RESULTATS	85
<hr/>	
I. EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN <i>HMGCS2</i> SOBRE L'OXIDACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS I L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN CÈL·LULES HEPG2	87
1. L'expressió del gen <i>HMGCS2</i> és necessària per a la inducció de l'oxidació de palmitat mitjançada per PPAR α	87
2. L'HMGCS2 no actua com a coactivador de PPAR α	89
3. L'HMGCS2 modula l'expressió del gen diana de PPAR α <i>FGF21</i>	92
4. L'HMGCS2, a través de la producció d'acetoacetat, modula l'expressió d'FGF21 per un mecanisme que depèn de SIRT1	94
II. GENERACIÓ D'UN KNOCKOUT TEIXIT ESPECÍFIC DEL GEN <i>Hmgcs2</i>	96
1. Generació de la construcció pFLOX-5'ARM-EXON2-3'ARM	98
2. Anàlisi dels clons de cèl·lules mare embrionàries	99
III. REGULACIÓ A LA BAIXA DEL GEN <i>Hmgcs2</i> DE FORMA AGUDA EN FETGE	100
1. Generació d'un adenovirus que codifica per un shRNA específic d'HMGCS2 de ratolí	100
2. La injecció d'un adenovirus que codifica per un shRNA específic disminueix els nivells hepàtics de proteïna i d'activitat HMGCS2	101

ÍNDEX

3. La regulació a la baixa d'HMGCS2 en fetge provoca una disminució dels cossos cetònics circulants del 25%	102
4. Existeix una correlació negativa entre els nivells de cossos cetònics circulants i la pèrdua de pes corporal durant el dejuni	103
5. La reducció dels cossos cetònics circulants d'un 25% no té efectes en el teixit adipós blanc	104
6. Efecte de la disminució dels cossos circulants sobre l'expressió de gens implicats en el metabolisme energètic	106
6.1. <i>Fgf21</i>	106
6.2. <i>Cpt1a</i>	106
6.3. <i>Pck1</i>	107
6.4. Anàlisi massiu d'expressió gènica	108
7. Identificació del gen <i>Fsp27</i> com a possible gen diana d'HMGCS2	110
IV. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DEL GEN <i>Fsp27/CIDEC</i>	112
1. CIDEC és regulat transcripcionalment per PPAR α	112
2. CIDEC és altament regulat transcripcionalment pel dejuni	113
3. Regulació transcripcional de CIDEC per FOXO1	114
DISCUSSIÓ	115
I. EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN <i>HMGCS2</i> SOBRE L'OXIDACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS I L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN CÈL·LULES HEPG2	117
1. L'expressió del gen <i>HMGCS2</i> és necessària per a la inducció de l'oxidació de palmitat mitjançada per PPAR α	117
2. L'HMGCS2 no actua com a coactivador de PPAR α	118
3. L'HMGCS2 modula l'expressió del gen diana de PPAR α FGF21	120
4. L'HMGCS2, a través de la producció d'acetoacetat, modula l'expressió d'FGF21 per un mecanisme que depèn de SIRT1	121
5. Elucidació del mecanisme de regulació de l'oxidació dels àcids grassos per HMGCS2	124
5.1. SIRT1-FGF21-PGC1 α	124
5.2. Efecte metabòlic	125
6. L'HMGCS2 i la proliferació cel·lular	126
II. GENERACIÓ D'UN KNOCKOUT TEIXIT ESPECÍFIC DEL GEN <i>Hmgcs2</i>	127
III. REGULACIÓ A LA BAIXA DEL GEN <i>Hmgcs2</i> DE FORMA AGUDA EN FETGE	133

1. La injecció d'un adenovirus que codifica per un shRNA específic	
disminueix els nivells hepàtics de proteïna i de l'activitat HMGCS2	133
2. Els nivells circulants de cossos cetònics circulants disminueixen un 25%	133
3. Existeix una correlació negativa entre els nivells de cossos cetònics circulants i la pèrdua de pes corporal durant el dejuni	134
4. La reducció dels cossos cetònics circulants d'un 25% no té efectes en el teixit adipós blanc	135
5. Efecte de la disminució dels cossos circulants sobre l'expressió de gens implicats en el metabolisme energètic	136
5.1. <i>Fgf21</i>	136
5.2. <i>Cpt1a</i>	138
5.3. <i>Pck1</i>	139
5.4. Anàlisi massiu d'expressió gènica	140
IV. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DEL GEN <i>Fsp27/CIDEA</i>	141
CONCLUSIONS	145
<hr/>	
BIBLIOGRAFIA	149
<hr/>	
APÈNDIX	167
<hr/>	
1. MISCEL·LANI D'ABREVITURES	169
2. OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS	172
3. CONSTRUCCIONS GENERADES	173
4. PLASMIDIS UTILITZATS	175
PUBLICACIONS	177
<hr/>	

PRESENTACIÓ I OBJECTIUS

La síntesi de cossos cetònics ha estat àmpliament estudiada des de fa més d'un segle. Durant tots aquests anys d'investigació s'ha establert que la cetogènesi i l'enzim clau de la via, l'HMGCS2, són regulats per diverses situacions fisiològiques (dejú, exercici prolongat, dietes riques en greixos) i patològiques (diabetis, obesitat). Així, la cetogènesi s'ha considerat tradicionalment com un procés essencialment hepàtic i destinat a subministrar energia en forma de cossos cetònics (acetoacetat i β -hidroxibutirat) als teixits perifèrics en situacions de manca d'energia, essent essencial per la supervivència de la majoria de mamífers en aquestes condicions.

En el nostre laboratori, l'any 1995, es va clonar el cDNA del gen humà i se'n va detectar l'expressió en diversos teixits. Altres publicacions demostren que el gen *HMGCS2*, tot i que s'expressa majoritàriament en fetge, també s'expressa en d'altres teixits (múscul esquelètic, cor, ronyó, etc.). Tanmateix, el significat fisiològic i els mecanismes de control d'aquesta expressió extra-hepàtica es desconeix. Per això en el nostre grup estem interessats en l'estudi del paper de l'expressió de l'*HMGCS2* en la regulació de l'homeòstasi energètica. A més a més, durant els darrers anys van apareixent treballs que atribueixen als cossos cetònics un paper en el manteniment de l'homeòstasi energètica que va més enllà de proporcionar energia als teixits perifèrics: per exemple a nivell de sistema nerviós central alterant la ingesta o el pes corporal.

Així, en el present treball ens hem plantejat estudiar les conseqüències de la modificació de l'expressió del gen *HMGCS2* per aprofundir en l'estudi d'aquest paper senyalitzador dels cossos cetònics.

En aquest treball ens hem proposat els següents objectius principals:

1. Estudiar el paper de l'HMGCS2 sobre l'oxidació dels àcids grassos i sobre l'expressió gènica en cèl·lules HepG2.
2. Estudiar el fenotip resultant de la regulació a la baixa del gen *HMGCS2* en un model *in vivo*.

INTRODUCCIÓ

I. HOMEÒSTASI ENERGÈTICA I ELS COSSOS CETÒNICS

L'homeòstasi energètica es basa en un equilibri entre la ingesta calòrica, l'emmagatzematge d'energia i el seu consum per part de l'organisme. Aquest equilibri s'assoleix mitjançant un control estricte de la producció i la utilització de l'energia en diferents situacions.

Així, en un organisme sa en condicions d'alimentació es troben activades la síntesi i l'emmagatzematge de triacilglicerols (TG) en el teixit adipós així com l'oxidació completa d'àcids grassos a CO_2 a nivell hepàtic, per generar energia. En aquesta situació existeix un equilibri entre la degradació d'hidrats de carboni i de lípids en el fetge que permet la generació d'acetil-CoA que és incorporat al cicle de Krebs. En canvi, en situacions de manca d'energia, com el dejuni o l'exercici, augmenten els nivells de glucagó i disminueix la secreció d'insulina. Aquest canvi hormonal provoca l'activació de la lipòlisi en el teixit adipós, i com a conseqüència un augment dels nivells d'àcids grassos no esterificats (NEFAs) en plasma. Aquests NEFAs són utilitzats per teixits (com el múscul) per obtenir energia, però són majoritàriament destinats al fetge on són β -oxidats. En aquestes situacions, quan els nivells de glucosa són baixos, al fetge, l'oxalacetat és reconduït cap a la gluconeogènesi i l'acetil-CoA provinent de la degradació dels àcids grassos és incorporat a la síntesi de cossos cetònics (cetogènesi), que són alliberats al torrent sanguini per ser utilitzats pels teixits perifèrics com a font d'energia (Figura I1).

És important tenir en compte que l'adaptació de l'organisme al dejuni consta d'una etapa primerenca, on s'obté glucosa gràcies a l'activació de la glucogenolisi pels alts nivells de glucagó i de la gluconeogènesi a partir de glicerol i aminoàcids, i d'una fase tardana que es posa en funcionament quan l'escassetat de nutrients és sostinguda en el temps, en la qual s'activa la cetogènesi per garantir la supervivència (Cahill, 2006; McCue, 2010).

INTRODUCCIÓ

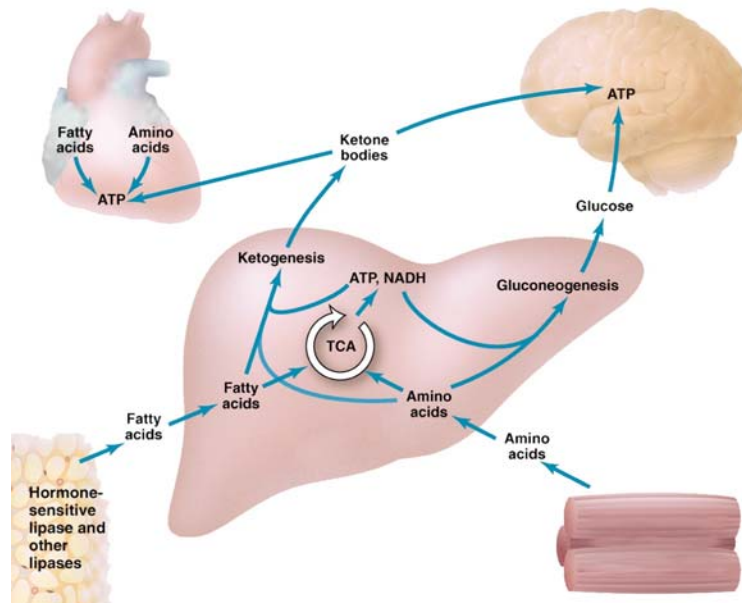


Figura I1. Homeòstasi energètica durant el dejuni. Durant el dejuni augmenten els nivells de glucagó secretats pel pàncrees, això provoca una inducció de la lipòlisi en el teixit adipós, que dóna substrats cetogènics i gluconeogènics. La glucosa i els cossos cetònics produïts són transportats via torrent sanguini als teixits perifèrics com múscul esquelètic, cor o cervell. Modificat de (Rabinowitz i White, 2010).

1. CETOGÈNESI

La cetogènesi, també coneguda com la via del 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), és el procés mitocondrial a partir del qual es sintetitzen els cossos cetònics (acetoacetat, β -hidroxibutirat i acetona), que constitueixen una forma eficient de transport de grups acetil a través del torrent sanguini i que poden ser utilitzats per determinats teixits (cervell, ronyó, múscul esquelètic) com a font d'energia. És d'un procés principalment hepàtic, encara que també es dóna en l'intestí de mamífers durant la lactància (Hahn i Taller, 1987), al ronyó (Thumelin *et al.*, 1993), als astròcits corticals neonatals (Cullingford *et al.*, 1998) i al còlon (Henning i Hird, 1972).

La síntesi de cossos cetònics a partir de l'acetil-CoA mitocondrial implica quatre activitats enzimàtiques (Figura I2) (McGarry i Foster, 1980) i constitueix tant un mecanisme d'estalvi de glucosa com una via de síntesi de substrats lipogènics. Degut a la finalitat del producte final es tracta d'un procés que té lloc en situacions fisiològiques, com ara el dejuni, l'exercici perllongat, una dieta rica en greixos o la lactància o bé en estats patològics, com per exemple la diabetis.

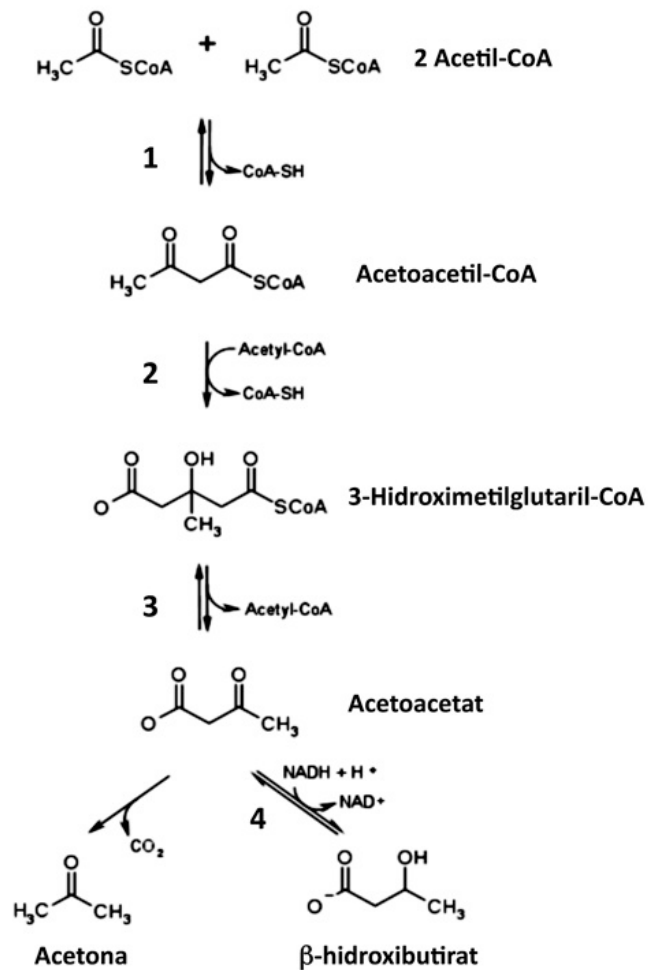


Figura I 2. Síntesi dels cossos cetònics. 1: Acetoacetyl-CoA tiolasa (E.C. 2.3.1.9); 2: HMG-CoA sintasa (E.C. 4.1.3.5); 3: HMG-CoA liasa (E.C. 4.1.3.4); 4: β-Hidroxibutirat deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.30).

2. UTILITZACIÓ COSSOS CETÒNICS

Els cossos cetònics sintetitzats al fetge són transportats via torrent sanguini als teixits perifèrics (Figura I1) on la seva utilització implica l'acció de tres activitats enzimàtiques consecutives: la β-hidroxibutirat deshidrogenasa, la succinil-CoA:3 oxoacid CoA transferasa (SCOT; EC 2.8.3.5) i l'acetoacetyl-CoA tiolasa. L'acetoacetyl-CoA tiolasa i la β-hidroxibutirat deshidrogenasa catalitzen les reaccions reversibles 1 i 4 de la síntesi de cossos cetònics. L'activitat enzimàtica limitant d'aquesta via és la catalitzada per la SCOT, que transforma l'acetoacetat en acetoacetyl-CoA (McGarry i Foster, 1980). L'activitat d'aquests enzims es troba present sobretot en cor i en còrtex de ronyó, però també en glàndules adrenals i submaxilars, en cervell i en múscul esquelètic, òrgans principals consumidors de cossos cetònics (Williamson *et al.*, 1971).

INTRODUCCIÓ

Alternativament, en el citosol dels teixits lipogènics, l'acetoacetat pot ser activat a acetoacetyl-CoA, a través de l'enzim acetoacetyl-CoA sintetasa (AACs; EC 6.2.1.16). Es proposa que l'AACs podria tenir un paper important en la provisió de molècules d'acetyl-CoA per la síntesi de lípids (Aguiló *et al.*, 2010; Buckley i Williamson, 1975).

3. COSSOS CETÒNICS COM A MOLÈCULES SENYALITZADORES

En la darrera dècada, a part de ser utilitzats com a substrat energètic per teixits perifèrics, s'atribueixen altres implicacions als cossos cetònics que es descriuen a continuació.

D'una banda, Taggart *et al* van demostrar que el β -hidroxibutirat és un lligand endogen específic del receptor acoblat a proteïna G_i GPR109A. La interacció del β -hidroxibutirat amb el receptor GPR109A present en els adipòcits, provoca una disminució de la lipòlisi induïda per la via β -adrenèrgica (Taggart *et al.*, 2005). Així, es postula un mecanisme fisiològic de retroalimentació per prevenir una lipòlisi excessiva en l'organisme en situacions com ara un dejuni perllongat (Ahmed *et al.*, 2009; Laegera *et al.*, 2010). En aquest sentit, s'ha demostrat que el β -hidroxibutirat i la niacina (un lligand exogen del receptor GPR109A que s'utilitza en el tractament de dislipidèmies) incrementen la secreció d'adiponectina, a més a més de disminuir la lipòlisi. El tractament de ratolins amb niacina provoca un augment de la secreció d'adiponectina que es correlaciona amb una disminució dels NEFAs (Plaisance *et al.*, 2009).

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 provocant una disminució de la ingesta (Kashiwaya *et al.*, 2010).

D'altra banda, en cardiomiòcits de rata, una exposició crònica al β -hidroxibutirat disminueix l'activació de la *protein kinase B* (AKT/PKB) per insulina i en conseqüència redueix la transducció de senyal a través de la via *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/AKT i la captació de glucosa. Aquestes dades otorguen un paper dels

cossos cetònics en el desenvolupament de la resistència a insulina a nivell cardíac (Pelletier *et al.*, 2007; Tardif *et al.*, 2001).

En el mateix sentit, s'ha demostrat que l'acumulació d'àcids grassos al fetge o al múscul interfereixen en la via de senyalització de la insulina (Muoio i Newgard, 2006). L'any 2004, es va implicar la producció de cossos cetònics en múscul amb la resistència a insulina observada en aquest teixit en la diabetis tipus 2 (An *et al.*, 2004). En aquest article, es mostra com la sobreexpressió hepàtica de l'enzim malonil-CoA decarboxilasa (MCD), enzim responsable de la degradació de malonil-CoA a acetil-CoA, en animals alimentats amb una dieta rica en greixos, reverteix la resistència a insulina en múscul, fetge i animal sencer. La sobreexpressió hepàtica de MCD provoca una disminució dels nivells d'àcids grassos circulants que es tradueix en una disminució de la síntesi de β -hidroxibutirat en múscul. Amb aquestes dades es proposa que els cossos cetònics podrien tenir un paper vehiculador de l'excés d'acetil-CoA degut al desequilibri entre l'oxidació d'àcids grassos i el cicle de Krebs en situacions on l'aport d'àcids grassos és molt elevat (An *et al.*, 2004; Muoio i Newgard, 2006).

II. HMG-COA SINTASA MITOCONDRIAL

1. ENZIM CLAU DE LA REGULACIÓ DE COSSOS CETÒNICS

Ayté *et al* van demostrar que existeixen dues HMG-CoA sintases, citosòlica i mitocondrial, codificades per dos gens independents i són regulades diferentment. Així, per exemple, el gen *HMG-CoA sintasa* citosòlic (*HMGCS1*) és reprimit durant el dejuni i la dieta rica en greixos, mentre que el gen *HMG-CoA sintasa* mitocondrial (*HMGCS2*) és activat en les mateixes condicions. D'altra banda, mentre que el gen *HMGCS1* presenta una expressió ubíqua, el gen *HMGCS2* té un patró d'expressió teixit específic (Ayté *et al.*, 1990). L'HMG-CoA produït per l'*HMGCS1* és transformat en mevalonat per acció de l'HMG-CoA reductasa, iniciant-se la via de síntesi d'isoprenoides, la qual generarà principalment colesterol; en canvi, l'HMG-CoA produït en l'interior del mitocondri serà transformat en acetoacetat per acció de l'HMG-CoA liasa (Figura I2).

INTRODUCCIÓ

L'enzim HMGCS2 (E.C. 4.1.3.5) és una proteïna de 56kDa que catalitza la condensació d'acetoacetyl-CoA i acetyl-CoA per formar HMG-CoA i CoA lliure, l'única reacció irreversible de la cetogènesi (Figura 12). Estudis recents de cristal·lització de la HMGCS1 i 2 humanes (primera HMG-CoA sintasa de mamífers cristal·litzada) confirmen que l'HMGCS2 conté un pèptid líder d'uns 40 aminoàcids que la dirigeix al mitocondri, que és una proteïna homodimèrica, que la reacció té lloc en tres etapes i que la cisteïna 166 forma part del centre catalític (Shafqat *et al.*, 2010). Actualment, es considera que l'enzim HMGCS2 és l'enzim clau de la producció de cossos cetònics (Ayté *et al.*, 1990; Casals *et al.*, 1992; Gil-Gómez *et al.*, 1993).

Existeixen variants naturals de la seqüència d'aminoàcids que donen lloc a un desordre metabòlic hereditari autosòmic recessiu conegut com deficiència d'HMG-CoA sintasa mitocondrial. Els pacients són asimptomàtics fins que es produeix una descompensació de l'organisme que pot ser deguda a una infecció o al dejuni perllongat. Per tant, tot i que és un desordre que cursa amb hipoglucèmia hipocetòtica que podria arribar a ser letal, els pacients, un cop diagnosticats, presenten un desenvolupament normal si es controlen els desencadenants de la descompensació metabòlica (Aledo *et al.*, 2006; Aledo *et al.*, 2001).

2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *HMGCS2*

2.1. Regulació transcripcional

Diferents hormones (glucagó, insulina, dexametasona), situacions metabòliques (dieta grassa, dejuni, realimentació, lactància, exercici) i estats patològics (diabetis) regulen l'activitat transcripcional del gen *HMGCS2* així com la síntesi hepàtica de cossos cetònics.

El clonatge de la regió promotora del gen *HMGCS2* de rata va permetre demostrar els mecanismes moleculars implicats en la regulació transcripcional del gen (Gil-Gómez *et al.*, 1993). Des d'aleshores, s'han caracteritzat seqüències *cis*, presents en el promotor del gen, responsables de mitjançar algunes d'aquestes respostes, així com factors de transcripció implicats en elles.

A continuació es detalla la regulació transcripcional del gen en resposta a diferents estímuls.

2.1.1. Resposta als àcids grassos

L'administració d'una dieta rica en greixos produeix una estimulació de la cetogènesi que es correlaciona amb una inducció dels nivells d'mRNA, de proteïna i d'activitat HMGCS2 (Casals *et al.*, 1992; Quant, 1990).

Estudis del nostre grup van demostrar que la regulació del gen *HMGCS2* per àcids grassos és mitjançada pel receptor nuclear activat per proliferadors de peroxisomes (PPAR) α a través d'un element de resposta a receptors nuclears (NRRE) localitzat en el promotor del gen entre les posicions -91 i -85 relatiu a l'inici de transcripció. Aquest element consisteix en dues repeticions directes de la seqüència AGGTCA separades per un nucleòtid (DR1) i flanquejades per una regió 5' rica en A/T (Rodríguez *et al.*, 1994). En treballs posteriors es va demostrar que en aquest mateix element de resposta també es poden unir els factors de transcripció *Hepatocyte nuclear factor* (HNF) 4 i *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor* (COUP-TF), provocant una repressió de la transactivació mitjançada per PPAR α en competir per la unió al NRRE (Rodríguez *et al.*, 1997, 1998).

El NRRE localitzat en el promotor de l'*HMGCS2* és fonamental per la resposta a àcids grassos i és essencial pel manteniment de l'expressió basal del gen, ja que la seva mutació anul·la l'expressió d'una construcció reportera en ratolins transgènics (Nadal, Tesi Doctoral 2001). La sobreexpressió de PPAR α en la línia cel·lular d'hepatoma humà HepG2 provoca un augment de l'mRNA i de l'activitat d'HMGCS2, en absència i presència de lligand específic (Hsu *et al.*, 2001). Aquest NRRE s'ha descrit com un element d'alta afinitat per la unió de l'heterodímer PPAR α /RXR α (Juge-Aubry *et al.*, 1997).

En un estudi massiu d'expressió gènica, mitjançant una aproximació proteòmica, es mostra que els nivells hepàtics de proteïna HMGCS2 es troben induïts en ratolins genèticament obesos *ob/ob* respecte els ratolins primis control, fet que

INTRODUCCIÓ

aporta una evidència més, que aquest gen es regula per àcids grassos (Edvardsson *et al.*, 2003).

2.1.2. Resposta a AMPc

El dejuni provoca un increment important dels nivells d'mRNA del gen *HMGCS2* en fetge. Quan un organisme està en dejú, els nivells circulants de glucagó s'eleven i provoquen l'activació de l'adenilat ciclasa incrementant els nivells intracel·lulars del missatger secundari AMPc. Un augment dels nivells intracel·lulars d'AMPc activen la proteïna quinasa A (PKA) que provocarà la fosforil·lació de diversos factors de transcripció crítics en la regulació de la transcripció de diversos gens, entre els quals es troba el gen *HMGCS2* (Gil-Gómez *et al.*, 1993).

Els estudis de promotor del gen *HMGCS2* han permès localitzar en el promotor del gen dos elements capaços de mitjançar aquesta resposta a l'AMPc. D'una banda, el factor de transcripció *cAMP responsive element binding protein* (CREB), a través de la unió al factor de transcripció Sp1 que s'uneix a una caixa GC situada entre les posicions -56 i -47 respecte l'inici de transcripció del gen, activa la transcripció de l'*HMGCS2* (Nadal, Tesi Doctoral 2001). D'altra banda, s'ha descrit un element de resposta a l'AMPc (CRE), situat a -546 pb de l'inici de transcripció del gen que és capaç d'unir CREB *in vitro* (Eggers *et al.*, 2000).

2.1.3. Resposta a insulina

En situacions d'alimentació, s'eleven les concentracions d'insulina circulants i la síntesi de cossos cetònics es troba reduïda. El gen *HMGCS2* és reprimat per acció de la insulina a través d'un element de resposta a la insulina (IRE) situat entre les coordenades -211 a -205 en el promotor del gen de rata (Nadal *et al.*, 2002). En aquest element, s'hi uneix el factor de transcripció FOXO3A que activa la transcripció del gen. FOXO3A és un factor de transcripció de la família dels *Forkheads* que participa en la regulació transcripcional mitjançada per la insulina a través de la via de transducció de senyals PI3K/AKT. Durant el període d'alimentació, l'activació de la via de la PI3K per

insulina provoca la fosforil·lació de FOXO3A i la seva exclusió nuclear, fet que es tradueix en una disminució de l'activitat transcripcional del gen *HMGCS2*.

2.1.4. Resposta a glucocorticoids

S'ha descrit que l'administració de dexametasona a rates adultes dejunades, indueix l'expressió del gen *HMGCS2*, efecte que no s'observa en rates alimentades (Casals *et al.*, 1992). A més a més, experiments de transfecció transitòria en la línia cel·lular HepG2 van demostrar que el tractament amb dexametasona provoca un augment de l'activitat transcripcional del promotor de rata (Gil-Gómez *et al.*, 1993). Tanmateix, en intestí de rates lactants, l'administració de dexametasona disminueix l'expressió del gen *HMGCS2* així com la cetogènesi (Arias *et al.*, 1998). L'administració de dexametasona en ratolins C57BL6 indueix significativament l'expressió del gen *HMGCS2* en cardiomiòcits (Wentz *et al.*, 2010).

2.1.5. Resposta a inhibidors d'histona desacetilases

L'activitat transcripcional del gen *HMGCS2* es regula per mecanismes que involucren l'acetilació i desacetilació de les histones (H4) associades al promotor. Així, s'ha demostrat que la histona desacetilasa (HDAC) 1 és reclutada al promotor del gen *HMGCS2* i que inhibidors d'HDAC com el butirac i la tricostatina A (TSA) provoquen l'activació transcripcional del gen *HMGCS2* *in vitro* i *in vivo* a través de la unió del factor Sp1 a la caixa GC del promotor situada entre -57 i -48 respecte l'inici de transcripció del gen. A més a més, el tractament de línies cel·lulars d'hepatoma i de còlon amb aquests inhibidors d'HDAC incrementa l'expressió del gen *HMGCS2* (Camarero *et al.*, 2003).

2.1.6. Resposta a senyals de proliferació

Resultats previs del nostre grup mostren que l'expressió del gen *HMGCS2* es troba disminuïda en un gran nombre de tumors humans i que aquesta expressió està lligada amb el fenotip tumoral de manera clara i independent de teixit (Camarero *et al.*, 2006; Mayordomo, Tesi doctoral 2007).

INTRODUCCIÓ

c-Myc

c-Myc és un factor de transcripció que actua com un oncogen. Animals diabètics i transgènics que sobreexpressen c-Myc presenten una clara disminució de l'expressió del gen *HMGCS2* (Riu *et al.*, 1996). Posteriorment, s'ha demostrat que c-Myc reprimeix l'expressió del gen *HMGCS2* mitjançant la interacció amb els factors Miz-1 i Sp1 sobre el promotor del gen i bloquejant la capacitat transactivadora de Miz-1 (Camarero *et al.*, 2006).

PTEN i p53

El gen *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) és un gen supressor de tumors que actua desfosforilant proteïnes implicades en el cicle cel·lular i evitant la proliferació cel·lular. FOXO3A quan és desfosforilat per PTEN transloca al nucli (Modur *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2000). Estudis de transfecció transitòria en cèl·lules HepG2 demostren que el gen *HMGCS2* es troba sota el control del gen supressor de tumors PTEN i de FOXO3A (Mayordomo, Tesi Doctoral 2007).

D'altra banda, estudis de transfecció transitòria demostren que el gen supressor de tumors p53 augmenta l'activitat transcripcional del promotor humà del gen *HMGCS2*. A més a més, tractaments amb l'agent quimioteràpic doxorubicina (activador de p53) incrementen l'expressió del gen *HMGCS2* en cèl·lules de còlon (Mayordomo, Tesi Doctoral 2007).

mTORC1

Mammalian Target of Rapamycin complex 1 (mTORC1) té un paper central en mamífers coordinant el creixement cel·lular en resposta a la disponibilitat de nutrients, estat energètic i factors de creixement. Mutacions de reguladors negatius de mTORC1 (TSC1-2, LKB1, PTEN) són presents en un elevat nombre de casos de síndrome de càncer familiar (Revisat per (Zoncu *et al.*, 2011).

Recentment, s'ha descrit que mTORC1 regula la cetogènesi hepàtica en ratolins en resposta al dejuni. Així, Sengupta *et al* demostren que l'activació de mTORC1 mitjançant la pèrdua hepàtica del seu inhibidor *Tuberous sclerosis protein* (TSC1)

provoca una disminució de la producció de cossos cetònics, acompanyada d'una disminució de l'expressió del gen *HMGCS2* i d'altres gens diana de PPAR α (carnitina palmitoiltransferasa 1A, acil-CoA oxidasa, HMG-CoA liasa o ell mateix). A més a més, en aquest treball, situen mTORC1 per sobre del factor de transcripció PPAR α en el control de la resposta al dejú, suggerint un mecanisme dependent del corepressor *Nuclear Receptor Corepressor* (NcoR) 1. Així, en fetge de ratolins control, el dejuni provoca un increment de l'acetilació d'histones en els elements de resposta a PPAR (PPREs) dels promotors estudiats, i aquest increment es correlaciona amb un increment del coactivador p300 i una disminució del corepressor NCoR1 en l'ocupació dels promotors (Sengupta *et al.*, 2010).

2.2. Control de la traducció

El control a nivell de síntesi proteica és un mecanisme de regulació de l'expressió gènica en eucariotes que permet a les cèl·lules respondre ràpidament a canvis fisiològics.

L'expressió del gen *HMGCS2* es troba sotmesa a un control post-transcripcional capaç d'afectar els nivells de proteïna total. En rata, tant el dejuni com la diabetis provoquen un augment dels nivells d'mRNA molt majors que els de proteïna (Serra *et al.*, 1993). En porcs nous, el dejuni eleva 800 vegades els nivells d'mRNA del gen *HMGCS2* mentre que l'activitat enzimàtica només augmenta 27 vegades, correlacionant-se amb uns nivells de proteïna més baixos dels esperats (Barrero *et al.*, 2001). Les seqüències 5'-UTRs presents en els mRNAs de les *HMGCS2* de rata i porc estan altament conservades i la seva modificació produeix un augment de la traducibilitat dels missatgers, indicant el paper d'aquestes seqüències en el control traduccional (Barrero, Tesi Doctoral 2001).

2.3. Regulació post-traduccional

2.3.1. Control de l'activitat *HMGCS2* per succinilació

L'activitat enzimàtica de l'*HMGCS2* és modulada per succinilació (inactivació) i desuccinilació (activació) de la proteïna. El succinil-CoA s'uneix covalentment a l'enzim

INTRODUCCIÓ

HMGCS2 inactivant-lo (Reed *et al.*, 1975). S'ha comprovat que el tractament amb glucagó de fetges perfundits o hepatòcits aïllats produeix una disminució del contingut mitocondrial de succinil-CoA (Siess *et al.*, 1980), que es correlaciona amb un augment de l'activitat HMGCS2 (Quant *et al.*, 1989).

La regulació de l'HMGCS2 per succinilació, i la consegüent inactivació de l'enzim es produeix en situacions fisiològiques com la transició dejuni-realimentació en rates durant l'estat fetal i durant la transició cap a una dieta rica en carbohidrats en rates lactants en el deslletament (Quant, 1990). En canvi, l'HMGCS2 es troba lleugerament succinilada i, per tant, activa en el fetge de rates alimentades amb una dieta rica en greixos després de la lactància (Quant *et al.*, 1991).

2.3.2. Regulació per palmitoilació

L'activitat HMGCS2 és troba inhibida per palmitoil-CoA (Reed *et al.*, 1975). Recentment, hi ha evidències que suggereixen que el palmitoil-CoA s'uneix al centre catalític de la proteïna HMGCS2 (cisteïna 166) i això afavoreix la seva interacció proteïna-proteïna amb el factor de transcripció PPAR α , augmentant l'activitat transcripcional del seu propi promotor (Kostiuk *et al.*, 2010).

2.3.3. Regulació per acetilació/desacetilació

Recentment, s'ha identificat la proteïna HMGCS2 entre un grup de proteïnes que es troben hiperacetilades en fetges de ratolins sotmesos a una dieta rica en greixos. En aquesta situació, hi ha una disminució dels nivells de NAD⁺ que es correlacionen amb una disminució de l'activitat de SIRT3, una desacetilasa dependent de NAD⁺ de localització mitocondrial, sense alterar els nivells de proteïna (Kendrick *et al.*, 2010).

Posteriorment, s'ha descrit que SIRT3 desacetila la proteïna HMGCS2 (Shimazu *et al.*, 2010). Concretament, s'ha demostrat que el dejuni provoca una disminució dels nivells d'acetilació de l'HMGCS2 que es correlaciona amb un augment dels nivells plasmàtics de β -hidroxibutirat, que no es produeix en ratolins *knockout* de SIRT3. La

desacetilació d'HMGCS2 per SIRT3 augmenta la velocitat màxima de l'enzim (V_{\max}) sense alterar la seva constant d'afinitat (K_m).

3. PATRÓ D'EXPRESSIONI DEL GEN *HMGCS2*

El gen *HMGCS2* s'expressa fonamentalment en fetge, principal òrgan cetogènic, però també se'n detecten nivells en altres teixits com intestí de rates lactants, ronyó, còlon i cec, múscul esquelètic, cor, pròstata, determinades cèl·lules de gònades, cervell i sistema immune.

3.1. Expressió en fetge

L'expressió del gen *HMGCS2* en fetge ha estat àmpliament estudiada i actualment es coneixen tant les situacions fisiopatològiques (dejuni, exercici perllongat, dieta rica en greixos, lactància i diabetis) en les quals es modifica la seva expressió, com els mecanismes moleculars implicats en aquesta regulació que han estat detallats en l'apartat anterior.

3.2. Expressió en intestí

Durant el període de lactància la cetogènesi a l'intestí prim i al ronyó són similars als del fetge (Thumelin *et al.*, 1993), desapareixent en el moment del deslletament dels animals (Hahn i Teller, 1987).

En canvi, en el còlon i el cec es mantenen elevats els nivells d'expressió del gen *HMGCS2* durant tota la vida adulta. Aquests teixits són capaços de produir cossos cetònics utilitzant com a precursor el butirat procedent de la fermentació bacteriana de la fibra (Cherbuy *et al.*, 1995). Els nivells d'expressió del gen *HMGCS2* en aquests teixits està regulada per la presència de butirat, tant *in vitro* com *in vivo*, però està limitada a les cèl·lules diferenciades de la cripta (Camarero *et al.*, 2006; Cherbuy *et al.*, 2004).

3.3. Expressió en ronyó

Tot i que en uns nivells inferiors als del fetge, el gen *HMGCS2* també s'expressa en ronyó d'humans adults (Mascaro *et al.*, 1995). En aquest sentit, s'ha descrit que l'expressió del gen *HMGCS2* es troba augmentada en el ronyó de ratolins diabètics db/db, així com la seva activitat cetogènica. Zhang *et al* suggereixen que un increment en la producció de cossos cetònics en ronyó pot representar un nou mecanisme de la patogènesi de la nefropatia diabètica, constituint el gen *HMGCS2* una possible diana terapèutica per a les complicacions renals de la diabetis (Zhang *et al.*, 2010).

Recentment, s'ha relacionat l'expressió renal del gen *HMGCS2* amb la hipertensió. Així, s'ha vist que rates amb hipertensió resistent a patir accidents vasculars cerebrals (*stroke spontaneous resistant hypertensive rats*; SHR) presenten una expressió major del gen *HMGCS2* en ronyó que rates hipertensives susceptibles de patir accidents vaculars cerebrals (*stroke-prone spontaneously hypertensive rat*; SHRSP) i uns nivells renals de fosforil·lació de la proteïna AKT inferiors que les SHRSP, suggerint una regulació a la baixa del gen *HMGCS2* per AKT a nivell renal. A més a més, l'expressió del gen *HMGCS2* en ronyó de rates SHRSP s'indueix pel tractament amb l'agonista de PPAR α clofibrat i es correlaciona amb una disminució significativa de les activats catalasa i superòxid dismutasa, apuntant que l'expressió renal d'*HMGCS2* podria protegir de l'estrés oxidatiu associat a l'hipertensió (Yi *et al.*, 2010).

3.4. Expressió en gònades

S'ha detectat expressió d'*HMGCS2* en cèl·lules de Leydig del testicle i en alguns tipus cel·lulars de l'ovari de rata adulta. L'expressió d'*HMGCS2* en aquest teixit no sembla relacionada amb els cossos cetònics, ja que no està regulada per el dejuni i els cossos cetònics són gairebé indetectables; en canvi, la seva expressió sí que disminueix quan la hipòfisi és extirpada (Royo *et al.*, 1993).

En aquests òrgans, l'expressió d'*HMGCS2* es correlaciona amb el desenvolupament de les funcions gonadals, suggerint la participació d'*HMGCS2* en la

síntesi mitocondrial de colesterol, assumint la mateixa funció que l'HMGCS1 té en altres teixits (Pignataro *et al.*, 1983).

3.5. Expressió en cervell

Durant la lactància, els cossos cetònics travessen la barrera hematoencefàlica i poden actuar com a combustible alternatiu a la glucosa, cobrint fins a un 75% de les necessitats del cervell. A més a més, en períodes d'intensa mielinització que tenen lloc en el cervell post-natal, els cossos cetònics són el substrat principal per la producció de mielina.

Tradicionalment s'havia considerat el cervell com un òrgan consumidor de cossos cetònics i no productor. Tanmateix, malgrat que la majoria d'àcids grassos no poden travessar la barrera hematoencefàlica, Anderson i Connor van detectar la presència d'àcids grassos amb capacitat cetogènica al cervell (Anderson i Connor, 1988). Deu anys més tard, Cullingford *et al.* van demostrar l'expressió d'enzims implicats en la via de l'HMG-CoA mitocondrial (acetoacetil-CoA tiolasa, HMGCS2 i HMG-CoA liasa) en determinats tipus de cèl·lules neuronals. Concretament, l'expressió d'HMGCS2 és especialment abundant en astròcits corticals de rates nounates i es correlaciona amb una notable capacitat cetogènica (Auestad *et al.*, 1991; Cullingford *et al.*, 1998). Inicialment, es va pensar que aquesta activitat era deguda a la reversibilitat de les reaccions catalitzades pels enzims de la via d'utilització de cossos cetònics, però actualment hi ha evidències que els cossos cetònics produïts pels astròcits poden ser utilitzats *in situ* per les neurones adjacents i s'estudia la possibilitat que la cetogènesi astrocítica pugui tenir efectes neuroprotectors (Guzman i Blazquez, 2004).

3.6. Expressió en cèl·lules del sistema immune

En limfòcits de rata s'han detectat les activitats HMGCS2 i HMG-CoA liasa que correlacionen amb nivells de cossos cetònics similars als observats en el feto (Curi *et al.*, 1989). S'ha proposat que la gran quantitat d'acetoacetat produït per aquestes cèl·lules constitueix una forma d'emmagatzemar acetil-CoA, la qual permet a la cèl·lula disposar-ne per la posterior síntesi de colesterol, àcids grassos o per l'acetilació de

INTRODUCCIÓ

proteïnes en diferents etapes del cicle cel·lular. Aquestes cèl·lules són també capaces de consumir cossos cetònics com a combustible energètic, reduint el consum de glucosa (O'Rourke i Rider, 1989).

3.7. Expressió en pròstata

Anàlisis massius d'expressió gènica mostren que nivells d'mRNA d'*HMGCS2* són detectables en pròstata i que la seva expressió es troba disminuïda en mostres tumorals d'aquest teixit (William B. Isaacs, Brady Urological Institute, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore; comunicació personal).

3.8. Expressió en múscul esquelètic i cor

El gen *HMGCS2* s'expressa en múscul esquelètic humà (Mascaro *et al.*, 1995). L'any 2004, es va descriure la possible implicació de la producció de cossos cetònics en múscul amb la resistència a insulina observada en aquest teixit en la diabetis tipus 2 (An *et al.*, 2004). En aquest treball mostren que l'expressió del gen *HMGCS2* en miotubs de rata és induïda pel tractament amb oleat.

D'altra banda, el gen *HMGCS2* també s'expressa en cor (Mascaro *et al.*, 1995). Recentment, s'ha publicat la regulació de l'expressió del gen *HMGCS2* en cardiomiòcits per àcids grassos (a través de l'activació de PPAR α), per dexametasona i per una dieta cetogènica (Wentz *et al.*, 2010).

3.9. Expressió en teixit adipós

Un estudi massiu d'expressió gènica de teixit adipós de biòpsies de pacients sotmesos a cirurgia en la regió tiroïdal, revela l'expressió del gen *HMGCS2* en teixit adipós marró humà (Svensson *et al.*, 2011). S'observa un diferent patró d'expressió entre humans i ratolins: mentre que en humans el gen *HMGCS2* es troba induït en teixit adipós marró en comparació amb teixit adipós blanc, en ratolins ocorre el contrari, trobant-se induïda l'expressió del gen en teixit adipós blanc respecte el marró.

III. RECEPTORS NUCLEARS

En aquest capítol es pretén fer una introducció dels receptors nuclears, ja que tenen un paper clau en la regulació del metabolisme i seran mencionats al llarg del present treball. A més a més, concretament PPAR α , té una importància crucial en la regulació del gen *HMGCS2* i se'n farà constant referència en els resultats i la discussió de la present tesi doctoral.

Els receptors nuclears (NR) constitueixen una superfamília de proteïnes que funcionen com a factors de transcripció activats per lligand regulant l'expressió de gens específics relacionats amb el desenvolupament, la reproducció, l'homeòstasi cel·lular, la diferenciació i el metabolisme. Els NR reconeixen i s'uneixen a seqüències específiques del DNA presents en les regions promotores dels seus gens diana exercint un control transcripcional sobre aquests (Desvergne *et al.*, 2006).

Els elements de resposta als receptors nuclears (HRE: *hormone responsive element* o NRRE: *nuclear receptor response element*) deriven tots d'un hexàmer consens AGGTCA, on poden unir-se com a monòmers, homodímers o heterodímers amb *Retinoic-X-receptor* (RXR) a través d'una estructura de dits de zinc. En el cas d'unir-se com a dímers la seqüència consens es troba repetida, configurant-se en diferents motius estructurals segons si la repetició és directa (DR: *direct repeat*), inversa (IR: *inverse repeat*) o eversa (ER: *everse repeat*). Aquestes repeticions poden estar alhora separades entre si per un determinat nombre de nucleòtids, formant diferents NRRE, cadascun d'ells específic per a cada receptor nuclear. Els NRREs s'identifiquen per les lletres DR, IR o ER seguides d'un número que correspon al nombre de nucleòtids que separen els dos hexàmers. Així, per exemple, en el cas de PPAR l'element de resposta és un DR1 (Desvergne i Wahli, 1999).

1. CLASSIFICACIÓ

La superfamília de receptors nuclears es pot dividir en tres grups (Revisat per (Desvergne *et al.*, 2006):

INTRODUCCIÓ

1. **Receptors d'hormones clàssics:** uneixen molècules com glucocorticoides, hormona tiroidea, àcid retinoïc i estrogen amb gran afinitat. La seva activació s'associa a ajustos metabòlics. Es troben localitzats constitutivament en el citosol i transloquen al nucli quan s'uneixen a la hormona. S'uneixen al DNA en forma d'homodímer.
2. **Receptors orfes:** posseeixen les característiques estructurals dels receptors nuclears però no se n'han identificat els lligands fisiològics.
3. **Sensors metabòlics:** Uneixen un gran ventall de molècules, generalment amb poca afinitat. Es consideren sensors de l'estat metabòlic perquè són capaços de respondre tant a senyals sintetitzats per la pròpia cèl·lula com provinents de l'entorn cel·lular (dieta, metabòlits secundaris). En aquest grup es troben els receptors nuclears implicats en el metabolisme energètic com els receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR), *Liver-X-receptor* (LXR) i *Farnesoid-X-receptor* (FXR), entre d'altres, implicats en el metabolisme energètic. La majoria de sensors metabòlics heterodimeritzen amb RXR per unir-se al DNA.

Receptors Clàssics	Receptors Orfes	Sensors Metabòlics
AR ER α,β GR MR PR RAR α,β,γ TR α,β VDR	ARP-1 COUP-TF EAR2 NURR1 REVERB α,β ERR α,β ROR α Etc.	PPAR α,β,γ LXR α,β FXR PXR CAR HNF-4* RXR α,β,γ **

Figura 13: Classificació dels receptors nuclears. *HNF-4: la seva unió a lligand es troba en discussió. **RXRs: és l'heterodímer comú de tots ells, encara que funciona com un receptor clàssic pel que fa al seu lligand àcid 9-cis-retinoïc.

2. ESTRUCTURA

Amb poques excepcions, els receptors nuclears presenten una estructura altament conservada formada per: una regió aminoterminal que inclou un domini de

transactivació independent de lligand (AF-1), un domini d'unió al DNA (DBD), una regió que permet l'articulació del receptor (*hinge region*) i una regió carboxiterminal que inclou el domini d'unió al lligand (LBD), un lloc de dimerització i un domini de transactivació dependent de lligand AF-2 (Figura I4) (Chawla *et al.*, 2001).



Figura I4. Estructura dels receptors nuclears. AF1/AF2: dominis de transactivació; DNA: domini d'unió al DNA; Ligand: domini d'unió al lligand (Chawla *et al.*, 2001).

3. MECANISME D'ACCIÓ

En condicions basals (absència de lligand) molts dels receptors nuclears es troben units al DNA i a proteïnes corepressores, inhibint l'expressió dels seus gens diana. Aquestes proteïnes corepressores, com NcoR1 o 2, atrauen proteïnes que mantenen l'expressió del gen apagada. En presència de lligands, en canvi, es produeixen una sèrie de canvis estructurals que provoquen la desestabilització dels complexos corepressors i s'afavoreix la interacció dels receptors nuclears amb proteïnes coactivadores com *Steroid Receptor coactivator (SRC) 1*, *cAMP responsive element binding protein (CREB)-binding protein (CBP)* p300 i *CBP/p300 associated factor (P/CAF)* que presenten activitat histona acetil transferasa (HAT) i permeten el reclutament de la maquinària basal de transcripció, formant així complexos proteics activadors que remodelen la cromatina i promouen l'expressió del gen diana (Desvergne *et al.*, 2006).

4. RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS DE PEROXISOMES (PPAR)

Com ja s'ha mencionat en l'apartat anterior, els PPARs (o NRC1) són factors de transcripció pertanyents a la superfamília de NR, concretament, a la classe sensors metabòlics. Els PPARs participen en el control i el manteniment del metabolisme lipídic i glucídic, actuant com a sensors d'àcids grassos i dels seus metabòlits intermediaris. A més de les seves funcions metabòliques, els PPARs participen en el control de la

INTRODUCCIÓ

inflamació, l'aterosclerosi (Lee *et al.*, 2003), la diferenciació cel·lular (Grimaldi, 2001) i en carcinogènesi (Lu i Cheng, 2010).

El seu nom es deu a què inicialment van ser descrits com a mediadors de l'efecte de compostos sintètics, com ara fàrmacs hipolipemians o pesticides, que provocaven un increment de la proliferació dels peroxisomes en ser administrats a ratolins. En mamífers, aquesta subfamília consta de tres membres codificats per gens diferents: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) i PPAR γ (NR1C3).

Els PPARs presenten una organització gènica similar (Desvergne i Wahli, 1999). A nivell de proteïna, presenten l'estructura pròpia dels NR amb els diferents dominis estructurals i funcionals prèviament descrits.

Els tres isotips de PPARs presenten diferents patrons d'expressió tissular d'acord amb les funcions que realitzen:

- PPAR α : s'expressa majoritàriament en aquells teixits amb una elevada capacitat oxidativa, com el fetge, el ronyó, el cor, el múscul esquelètic, l'intestí prim i el teixit adipós marró (Desvergne *et al.*, 2006)
- PPAR δ : presenta un patró d'expressió ubíqua. És l'isotip més abundant en múscul esquelètic on exerceix un paper fonamental en el manteniment de l'homeòstasi energètica regulant gens importants pel catabolisme lipídic com ara la malonil-CoA carboxilasa (MCD), la carnitina palmitoil transferasa 1b (CPT1B) o l' *Uncoupling protein 3* (UCP3) (Muio *et al.*, 2002).
- PPAR γ : s'expressa majoritàriament en teixit adipós on es considera el principal regulador de l'adipogènesi. La seva expressió està augmentada en fetges esteatòtics de ratolins genèticament obesos ob/ob (Lee *et al.*, 2003).

4.1. PPAR α

Va ser el primer membre descrit de la família. L'any 1990, es va observar que PPAR α podia induir la proliferació i l'oxidació peroxisomal (Issemann i Green, 1990). Actualment es considera que PPAR α té un paper clau en el metabolisme lipídic hepàtic, però també del metabolisme glucídic, de lipoproteïnes i d'aminoàcids; també

té un paper en la inflamació i en la proliferació cel·lular en hepatòcits murins (Rakhshandehroo *et al.*, 2010).

Actualment, es coneix que, a nivell hepàtic, PPAR α és un dels reguladors principals de l'expressió de gens implicats en diferents etapes de la utilització d'àcids grassos (Desvergne *et al.*, 2006):

- regula el transport i esterificació d'àcids grassos: *Fatty acid translocase 36 (CD36)*, *Fatty acid binding protein (FABP)* i acetil-CoA sintetasa (ACS) (Martin *et al.*, 1997; Motojima *et al.*, 1998; Schoonjans *et al.*, 1995; Van der Lee *et al.*, 2000)
- l'import mitocondrial: gens del sistema carnitina palmitoiltransferasa CPT1 (Mascaro *et al.*, 1998; Napal *et al.*, 2005), CPT2 (Barrero *et al.*, 2003) i acilcarnitina translocasa (CACT) (Gutgesell *et al.*, 2009)
- la β -oxidació mitocondrial i peroxisomal (Van der Lee *et al.*, 2000)

PPAR α , com s'ha vist en l'apartat II.2.1.1, també regula la producció de cossos cetònics mitjançant la regulació del gen *HMGCS2* (Hsu *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 1994). Alhora, PPAR α regula el desacoblament mitocondrial i la termogènesi controlant l'expressió de les tres isoformes de les *UCPs* (Barbera, 2001; Cabrero *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 1998) i la síntesi de glucosa mitjançant la transactivació dels gens gluconeogènics fosfoenolpiruvat carboxiquinasa citosòlica (*PCK1*) (Cassuto *et al.*, 2005; Juge-Aubry, 1997) i Glucosa 6-fosfatasa (*G6Pasa*) (Im *et al.*, 2011). PPAR α també ha estat identificat com un factor de transcripció que indueix la seva pròpia expressió (Rakhshandehroo *et al.*, 2007).

L'estudi del fenotip del ratolí *knockout* de PPAR α (Lee *et al.*, 1995) ha permès la comprensió de les seves funcions biològiques. Així, s'ha vist que PPAR α juga un paper clau en l'adaptació al dejuni. Ratolins *knockout* de PPAR α no presenten alteracions evidents en condicions basals; tanmateix, quan són sotmesos a un dejuni de 24h desenvolupen (Djouadi *et al.*, 1998; Le May *et al.*, 2000; Leone *et al.*, 1999):

- hipoglicèmia (una reducció del 60%), en part deguda a una reducció de la gluconeogènesi que no va associada a una disminució de l'expressió dels gens

INTRODUCCIÓ

claus de la via *G6Pasa* i *PCK1*. La reducció de la gluconeogènesi observada podria ser secundària a la reducció de la β -oxidació dels àcids grassos, ja que per mantenir la síntesi de glucosa es necessiten nivells suficients d'acetil-coA i de NADH, que es produeixen en gran quantitat durant l'oxidació dels àcids grassos (Le May *et al.*, 2000)

- hipocetonèmia severa que es correlaciona amb una reducció de l'expressió del gen clau de la cetogènesi *HMGCS2*
- una reducció de la β -oxidació tant d'oleat com d'octanoat del 70% que no es correlaciona amb una reducció de l'expressió de *CPT1A*, però sí dels nivells d'altres gens relacionats amb l'oxidació d'àcids grassos com l'acil-CoA deshidrogenasa de cadena mitjana (*MCAD*) o l'acil-CoA oxidasa (*ACO*); la disminució de la β -oxidació en aquests ratolins deficients dejunats provoca l'aparició d'esteatosi hepàtica deguda a l'acumulació hepàtica d'àcids grassos. A nivell cardíac, aquesta deficiència provoca una acumulació de lípids i una disminució de gens implicats en l'oxidació dels àcids grassos. En el múscul esquelètic, un teixit amb elevada capacitat oxidativa, els nivells de β -oxidació en els ratolins *knockout* per PPAR α es troben disminuïts, tot i que en menor proporció que al fetge. En aquest cas, l'expressió de gens diana de PPAR α en múscul esquelètic no es troba modificada, fet que s'explica per una compensació de l'isotip PPAR δ (Muoio *et al.*, 2002)
- els NEFAs circulants es troben augmentats respecte els ratolins *wild type*, tant pel dejuni com per dues hores d'exercici (Muoio *et al.*, 2002).

IV. FIBROBLAST GROWTH FACTOR 21 (FGF21)

FGF21 és un membre atípic de la superfamília FGF descobert l'any 2000 (Nishimura *et al.*, 2000). Des de llavors i, sobretot durant els anys de realització de la present tesi doctoral, s'han estudiat extensament la seva funció i els seus mecanismes de regulació.

1. FGF21 COM A HORMONA

La proteïna FGF21, tot i que no té activitat sobre fibroblasts i no s'ha pogut demostrar que tingui capacitat per promoure el creixement *in vivo*, s'ha classificat dins la superfamília d'FGFs, ja que conté un domini *FGF-like* i comparteix entre un 10 i un 30% d'identitat de seqüència amb altres FGFs. Concretament, pertany a la subfamília "*hormone-like*" juntament amb FGF15/19 i FGF23.

FGF21 és una proteïna de 208 aminoàcids que és secretada i exerceix la seva acció a través de l'activació de receptors específics (FGFRs) en la superfície cel·lular, interaccionant amb una proteïna transmembrana adaptadora anomenada β Klotho (Fon Tacer *et al.*, 2010; Kharitononkov i Larsen, 2010). Per tant, l'acció d'FGF21 depèn en gran part de la co-expressió d'FGFRs i β Klotho en els diferents òrgans diana.

A continuació es mostra un esquema per resumir les accions principals d'FGF21 descrites fins al moment en ratolins i humans en els dos òrgans diana principals (fetge i teixit adipós).

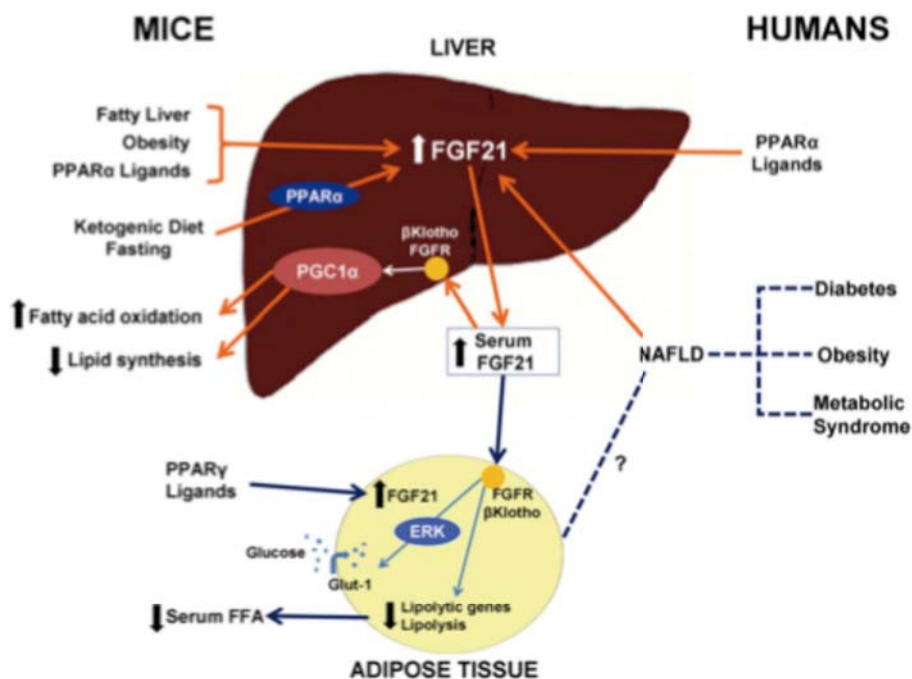


Figura 15. Resum de la fisiologia d'FGF21. Els nivells d'FGF21 augmenten en fetge per situacions en les quals es produeix un augment d'àcids grassos (dejuni, obesitat, dietes riques en greixos, etc.). Aquest augment de l'expressió provoca un augment dels nivells sèrics d'FGF21 que actuen a nivell de teixit adipós augmentant la captació de glucosa i encara està en discussió com altera la lipòlisi en aquest teixit en ratolins. Domouzoglou i Maratos-Flier, 2011

INTRODUCCIÓ

La fisiologia d'FGF21 entre ambdues espècies és lleugerament diferent, per exemple en humans no s'ha observat un increment dels nivells sèrics d'FGF21 en resposta al dejuni o a les dietes cetogèniques tal com sí que s'observa en ratolins (Domouzoglou i Maratos-Flier, 2011).

2. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL

2.1. Receptors nuclears

PPAR α

L'any 2007, es van publicar dos treballs que demostren que el gen *FGF21* és un gen diana del receptor nuclear PPAR α (Badman *et al.*, 2007; Inagaki *et al.*, 2007). En el treball de Inagaki *et al.* descriuen la presència de dos PPREs funcionals en el promotor d'FGF21 de ratolí. Els mateixos autors també demostren que aquest gen s'indueix per dejuni i que la sobreexpressió d'FGF21 en ratolins provoca un augment dels cossos cetònics i dels àcids grassos circulants. D'altra banda, en el treball de Badman *et al.*, identifiquen el gen en un estudi massiu d'expressió gènica en ratolins tractats amb una dieta cetogènica (rica en greixos i baixa en carbohidrats). Ambdós treballs situen a FGF21 sota el control de PPAR α , com un element clau en l'adaptació al dejuni.

PPAR γ

L'expressió d'*FGF21* en el teixit adipós s'indueix per PPAR γ (Moyers *et al.*, 2007; Muise *et al.*, 2008). S'ha descrit que l'administració de rosiglitazona, un lligand de PPAR γ , provoca un increment dels nivells sèrics d'FGF21 que s'atribueix a la secreció de la proteïna per part del teixit adipós (Wang *et al.*, 2008).

2.2. Ritmes circadianis

S'ha descrit que l'expressió d'FGF21 és induïda per dos factors de transcripció que tenen un paper clau en la regulació del ritme circadiani en mamífers: *retinoic acid receptor-related orphan receptor α* (ROR α) i *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1* (Rev-Erb α), a través de dos elements de resposta a *retinoic acid-related*

orphan receptor (ROREs) independents localitzats en el seu promotor (Estall *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

D'altra banda, l'expressió del gen *FGF21* al llarg del cicle circadiari està regulada pel factor de transcripció *E4-binding protein 4* (E4BP4), presentant un pic d'expressió a l'inici de la fase nocturna en ratolins (Tong *et al.*, 2010). En humans, en canvi, els nivells màxims d'expressió s'assoleixen a l'inici de la fase diürna (Yu *et al.*, 2011).

2.3. Carbohidrats

Iizuka *et al.* van demostrar que l'expressió d'*FGF21* s'indueix per glucosa en hepatòcits de rata a través del receptor nuclear *Carbohydrate response element binding protein* (ChREBP), un factor de transcripció implicat en la lipogènesi i el desenvolupament de la síndrome metabòlica (Iizuka *et al.*, 2009).

3. PAPER EN METABOLISME GLUCÍDIC I LIPÍDIC

El gen *FGF21* s'expressa fonamentalment en fetge, i en menor quantitat en el timus (Nishimura *et al.*, 2000). Posteriorment, s'ha detectat expressió en teixit adipós (Wang *et al.*, 2008) i en múscul esquelètic (Izumiya *et al.*, 2008), en pàncrees i testicles (Fon Tacer *et al.*, 2010). La proteïna adaptadora β Klotho, important per la transducció del senyal d'*FGF21*, s'expressa en pàncrees, teixit adipós i fetge, suggerint els possibles òrgans diana de la proteïna (Ito *et al.*, 2000).

3.1. Acció sistèmica

Diferents estudis han demostrat que l'administració sistèmica d'*FGF21* en diferents models (Revisat per Kharitonov i Larsen (2010)):

- produeix una disminució dels nivells plasmàtics de glucosa i de triglicèrids
- millora la sensibilitat a la insulina
- constitueix un enriquiment en adipòcits marrons
- contribueix a la preservació de la funció i la massa de cèl·lules β pancreàtiques
- millora l'obesitat i l'esteatosi hepàtica

INTRODUCCIÓ

- millora la resistència a la leptina mitjançant la disminució de les LDL i un augment de les HDL
- té efectes beneficiosos sobre diversos factors de risc cardiovascular

Tots aquests efectes només s'observen en un estat de desequilibri metabòlic i no en condicions basals, fet que suggereix un paper de l'hormona en situacions de gran estrès metabòlic. De fet, s'ha proposat que l'obesitat és un estat de resistència a FGF21 (Fisher *et al.*, 2010).

3.2. Múscul esquelètic

L'expressió d'FGF21 s'ha detectat en múscul esquelètic. La seva expressió en aquest teixit és regulada per insulina a través de l'activació d'AKT (Izumiya *et al.*, 2008). En humans, s'ha detectat expressió en aquest teixit en pacients hiperinsulinèmics (Hojman *et al.*, 2009). També s'ha detectat l'expressió d'FGF21 en múscul en miopaties mitocondrials (Tynismaa *et al.*, 2010). D'altra banda, s'ha descrit que, en aquest teixit, FGF21 indueix la captació de glucosa mitjançada per insulina, suggerint un paper d'FGF21 en la sensibilització a la insulina (Mashili *et al.*, 2011).

3.3. Teixit adipós

Kharitononkov *et al* (2005) van demostrar que FGF21 indueix la captació de glucosa en adipòcits 3T3L1 incrementant específicament l'expressió dels receptors GLUT1. Aquest efecte es produeix a través de la fosforilació dels receptors FGFR-1 i 2, desencadenant la fosforilació de les MAP quinases ERK1 i ERK2. A més a més, en estudis *in vivo* demostren que la inducció de GLUT1 és específica de teixit adipós, ja que no s'observa en múscul, ronyó, fetge o cervell (Kharitononkov *et al.*, 2005). Aquest efecte d'FGF21 sobre el transport de glucosa dependent de GLUT1 es relaciona amb un possible paper d'FGF21 com a mediador de l'efecte sensibilitzador a la insulina que exerceixen els lligands específics de PPAR γ (Moyers *et al.*, 2007; Muise *et al.*, 2008).

També s'ha proposat un paper d'FGF21 en la regulació de l'activitat lipolítica dels adipòcits. Les dades sobre aquesta regulació són controvertides. D'una banda, el treball d'Hotta *et al* demostra que ratolins *knockout* d'FGF21 presenten un increment de la

mida dels adipòcits i una disminució de l'activitat lipolítica en condicions d'alimentació (Hotta *et al.*, 2009). Consistent amb aquests resultats, animals transgènics que sobreexpressen FGF21 presenten adipòcits de mida reduïda i el tractament d'adipòcits 3T3-L1 amb FGF21 estimula la lipòlisi (Inagaki *et al.*, 2007).

En canvi, els ratolins *knockout* del treball d'Hotta *et al* dejunats, presenten adipòcits amb la mateixa mida que els corresponents controls, una activitat lipolítica augmentada i uns nivells de NEFAs circulants també incrementats (Hotta *et al.*, 2009), suggerint aquí una funció anti-lipolítica d'FGF21. Aquests resultats són consistents amb altres estudis que adjudiquen també un paper anti-lipolític a FGF21 (Arner *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

D'altra banda, s'ha demostrat que FGF21 activa la termogènesi en teixit adipós marró en ratolins nounats (Hondares *et al.*, 2010) i adults (Kharitononkov *et al.*, 2005). En aquest sentit, s'ha descrit que el propi teixit adipós marró respon a la termogènesi produint FGF21 a través d'un mecanisme dependent d'AMPc (Hondares *et al.*, 2011).

3.5. Fetge

FGF21 juga un paper crucial en la resposta adaptativa del fetge a la manca de nutrients. Aquesta hormona té un paper en la fase tardana del dejuni, ja que s'indueix en dejunis perllongats (Badman *et al.*, 2007; Estall *et al.*, 2009; Gälman *et al.*, 2008; Inagaki *et al.*, 2007).

Mitjançant estratègies complementàries de sobreexpressió i regulació a la baixa d'FGF21 en animals, s'ha demostrat que FGF21 indueix el flux del cicle de Krebs, l'oxidació d'àcids grassos, la cetogènesi, del consum d'oxigen i la gluconeogènesi (Potthoff *et al.*, 2009). Els autors suggereixen que la inducció d'aquests processos pot estar mitjançada pel coactivador *Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ Coactivator-1* (PGC1) α , que és induït per FGF21, tot i que no en demostren el mecanisme molecular.

INTRODUCCIÓ

V. SIRTUINES

Les sirtuines pertanyen a la família d'histones desacetilases de classe III. El seu nom es deu la identificació inicial del gen *silent information regulator 2 (Sir2)* en *S. Cerevisiae* implicat en la regulació de la longevitat d'aquests organismes mitjançada per restricció calòrica (Imai *et al.*, 2000; Kaeberlein *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000).

S'ha descrit que les sirtuines poden desacetilar nombroses proteïnes a part d'histones i la seva activitat depèn del cofactor NAD^+ , fet que relaciona directament la seva activitat amb l'estat metabòlic de la cèl·lula (Imai *et al.*, 2000).

Es troben altament conservades des de bacteris fins a humans. En mamífers, existeixen 7 sirtuines (SIRT1-7) que presenten un domini catalític comú i difereixen en els dominis amino i carboxi terminal, alhora presenten localitzacions subcel·lulars diferents (Frye, 2000).

1. SIRT1

SIRT1 es localitza principalment al nucli, però també s'ha descrit la seva presència en el citoplasma on desacetila l'acetil-CoA sintasa 1 (Hallows *et al.*, 2006). SIRT1 desacetila diversos factors de transcripció regulant així diferents processos metabòlics i d'estrès (Guarente, 2006). Concretament, s'ha descrit que SIRT1 desacetila i regula l'activitat de proteïnes implicades en la resistència a l'estrès com el gen supressor de tumors p53 (Cheng *et al.*, 2003; Langley *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2001), el factor de reparació Ku70 (Cohen *et al.*, 2004) o proteïnes de la família *Forkhead*, també implicades en el metabolisme cel·lular (Brunet *et al.*, 2004; Motta *et al.*, 2004).

D'altra banda, SIRT1 regula diversos processos metabòlics que permeten l'adaptació de la cèl·lula a la deprivació de nutrients en els diferents teixits on s'expressa (teixit adipós, pàncrees, fetge, múscul esquelètic o en neurones). Així, en dejuni, quan la relació $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ intracel·lular augmenta, SIRT1 s'activa i desacetila els coactivadors PGC1 α (Rodgers *et al.*, 2005), *cAMP response element*

binding protein coactivator (CRTC) 2 (Liu *et al.*, 2008) i el factor de transcripció FOXO1 promovent la gluconeogènesi hepàtica. La desacetilació de PGC1 α per SIRT1 augmenta la seva activitat coactivadora, incrementant, entre d'altres, l'activitat transcripcional de PPAR α que es tradueix en un increment de l'oxidació hepàtica d'àcids grassos (Purushotham *et al.*, 2009).

2. SIRT3

SIRT3 es localitza a la matriu mitocondrial on té un paper clau en la regulació la funció mitocondrial. S'ha descrit que SIRT3 està implicada en la inducció de l'oxidació dels àcids grassos, ja que promou la desacetilació i l'activació de la deshidrogenasa d'àcils-CoA de cadena llarga (LCAD)(Hirschey *et al.*, 2010). També s'ha demostrat que SIRT3 desacetila l'isocitrat deshidrogenasa 2 (ICDH2), un enzim important del cicle de Krebs (Schlicker *et al.*, 2008).

D'altra banda, com ja s'ha comentat anteriorment, SIRT3 desacetila l'enzim clau de síntesi de cossos cetònics, HMGCS2 incrementant la seva activitat (Shimazu *et al.*, 2010). SIRT3 també desacetila l'acetil-CoA sintetasa 2, enzim que converteix l'acetat en acetil-CoA facilitant així la utilització de l'acetat de la dieta com a font d'energia (Hallows *et al.*, 2006).

VI. FAT SPECIFIC PROTEIN 27 (FSP27) O CIDEC

Finalment, en aquest treball s'ha estudiat la possible regulació del gen *Fsp27* (en ratolí) o *Cidec* (humans) per HMGCS2 i a continuació es detallen els antecedents sobre aquest gen.

El gen *Fsp27* va ser inicialment aïllat en un estudi de gens específicament expressats en adipòcits de ratolí diferenciats TA1 (Danesch *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1992). En humans, el seu homòleg va ser aïllat d'una llibreria de cDNA de fetge i reb el nom *Cell death-inducing DNA fragmentation factor-45-like effector* (CIDE) C (Liang *et al.*, 2003).

INTRODUCCIÓ

CIDEC/FSP27 és un membre de la família CIDE que està formada per tres membres (CIDEA, CIDEB i CIDEC) que presenten un domini aminoterminal (CIDE-N) i un domini carboxiterminal (CIDE-C) comú. Aquesta família va ser originalment identificada per la seva elevada identitat de seqüència amb el domini aminoterminal del factor de fragmentació de DNA (DFF) 40/45, factor regulador de l'apoptosi (Inohara *et al.*, 1998). Així, s'ha demostrat que l'expressió ectòpica dels tres membres de la família induïx apoptosi en cèl·lules de mamífer (Inohara *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2003). Tot i que inicialment es va determinar que les proteïnes CIDEA i CIDEB presentaven una localització subcel·lular mitocondrial (Liang *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003), diferents estudis han demostrat que els tres membres de la família formen part de les gotes lipídiques (Puri *et al.*, 2007; Puri *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2009). Les gotes lipídiques són orgànuls esfèrics formats per lípids neutres envoltats per una monocapa de fosfolípids, colesterol lliure i proteïnes específiques.

Fsp27 s'expressa sobretot en teixit adipós blanc (Matsusue *et al.*, 2008). En humans, CIDEC s'expressa principalment en teixit adipós subcutani de pacients obesos, però també en cor, còlon, intestí prim, estómac i es detecten baixos nivells en cervell (Liang *et al.*, 2003).

CIDEC/FSP27 està implicat en la formació de gotes lipídiques uniloculars i contribueix a l'emmagatzematge eficient de greixos en el teixit adipós (Li *et al.*, 2010; Nishino *et al.*, 2008). Així, ratolins *knockout* d'*Fsp27* presenten una disminució del pes del teixit adipós blanc i gotes lipídiques multiloculars i més petites que els ratolins control. A més a més, aquests animals presenten un augment de l'expressió en aquest teixit dels gens *Nuclear Respiratory Factor 1* (NRF1), *PGC1 α* o la subunitat I de la citocrom c oxidasa (COXI) en aquest teixit, suggerint que FSP27 també regula la funció mitocondrial. Consistent amb aquest increment de la funció mitocondrial els ratolins *knockout* d'*Fsp27* presenten un increment del consum d'oxigen i estan protegits de l'aparició d'obesitat i resistència a insulina degudes a una dieta rica en greixos (Nishino *et al.*, 2008).

D'altra banda, FSP27 és regulat per molècules que promouen la lipòlisi en els adipòcits. Així, la proteïna FSP27, que presenta una vida mitjana molt curta (~15min), és degradada per la via del proteasoma després de ser ubiquitinitzada. La seva degradació és inhibida a través de receptors β -adrenèrgics del teixit adipós pel tractament amb isoproterenol, un activador de la lipòlisi. Aquesta estabilització de la proteïna per isoproterenol es correlaciona amb un increment de la síntesi de triacilglicerols i del contingut de gotes lipídiques. A més a més, altres tractaments que incrementen els nivells d'AMPc intracel·lulars també estabilitzen la proteïna FSP27. Tanmateix, el tractament d'adipòcits amb la citocina pro-lipolítica *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) disminueix l'expressió d'*Fsp27* i la mida de les gotes lipídiques (Nian *et al.*, 2010; Ranjit *et al.*, 2010).

Finalment, s'ha proposat que FSP27 en fetge té el mateix paper que en el teixit adipós, ja que la sobreexpressió hepàtica de PPAR γ en fetge provoca una inducció dels nivells d'mRNA d'*Fsp27* acompanyada d'un increment de gotes lipídiques i de l'acumulació de triacilglicerols en aquest teixit (Yu *et al.*, 2003). A més a més, l'expressió d'*Fsp27* s'indueix en fetge de ratolins obesos ob/ob o sotmesos a una dieta rica en greixos (Matsusue *et al.*, 2003). En el mateix sentit, ratolins obesos ob/ob on es regula a la baixa el gen *Fsp27* presenten una millora de l'esteatosi hepàtica (Matsusue *et al.*, 2008).

MATERIALS I MÈTODES

En el capítol que aquí s'inicia s'expliquen les característiques dels materials i els mètodes emprats en la realització d'aquest treball. Oligonucleòtids i construccions generades es descriuen en l'apèndix.

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

Les tècniques i preparacions de reactius bàsics en biologia molecular que no es detallen en aquest capítol van realitzar-se segons Sambrook *et al* (1989) o Ausubel *et al* (1987) o bé seguint les instruccions de la casa comercial.

MATERIALS

1. SOQUES BACTERIANES

S'ha utilitzat la soca bacterina d'*Escherichia coli* DH5α (GibcoBRL) per la propagació, selecció de plasmidis i l'expressió de proteïnes.

DH5α (GibcoBRL) *sup E44, ΔlacU169 (∅80 lac Z ΔM15), hsd R17, recA1, gyr A96, thi-1, rel A1.*

2. LÍNIES CEL·LULARS ESTABLERTES

A continuació es mostra una relació de les línies cel·lulars de mamífers emprades en aquesta tesi doctoral.

<u>Línia cel·lular</u>	<u>Descripció (teixit i organisme)</u>	<u>Referència</u>
HepG2	Hepatoma humà	Eucellbank 0023-HLCL
<i>PoenixTM amphi packaging cells</i>	Ronyó d'embrió humà	Orbigen (Ref. RVK-10001)
HeLa	Adenocarcinoma de cèrvix humà	ATCC nº: CCL-2
HEK293	Ronyó d'embrió humà	ATCC nº: CRL-1573

3. ANIMALS

Per a la realització dels experiments *in vivo* s'empraren ratolins mascle C57BL6/J o 129SvEv 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, alimentades 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.

4. VECTORS

En aquests apartat es descriuen els vectors emprats per la present tesi doctoral.

4.1. Vectors de clonatge

pGEM[®]-T (Promega, Ref. A3600): vector linealitzat per digestió amb l'enzim EcoRV que presenta una timidina afegida als extrems 3', facilitant el clonatge de productes de PCR als quals la *Taq* polimerasa ha afegit una adenina en finalitzar la síntesi de la cadena naixent. Conté els promotors T7 i SP6, i una zona de clonatge amb diferents dianes de restricció úniques. A més a més, confereix resistència a ampicil·lina i inclou en la seva seqüència el gen *lacZ*, permetent la selecció per color de les colònies recombinants (blau/blanc). Així, en un medi suplementat amb ampicil·lina (100 mg/L), IPTG (0.5mM) i X-Gal (80 mg/L) les colònies recombinants apareixen de color blanc.

pFLOX (Facilitat per Dr. Marth, Howard Hughes Medical Institut, CA, (Chui *et al.*, 1997): Vector que confereix resistència a ampicil·lina (procariotes) i a neomicina (eucariotes). A més a més, conté 3 llocs de clonatge i tres seqüències loxP (veure apèndix pel mapa del vector).

pBASIC DUAL EGFP (Facilitat per *Vector Biolabs*): Vector inicial per construir un adenovirus. Presenta resistència a kanamicina (veure apèndix pel mapa del vector).

4.2. Vectors d'expressió procariota

pGEX-4T (Amersham Biosciences): Vector utilitzat per la producció de proteïnes de fusió amb la Glutatió-S-Transferasa (GST) en *Escherichia coli*. Conté una zona de dianes de clonatge úniques, confereix resistència a ampicil·lina i el seu promotor (Tac) és induïble per IPTG.

4.3. Vectors d'expressió eucariota

pCDNA3 (Umesono *et al.*, 1991): conté el promotor CMV, resistència a ampicil·lina i a neomicina. Conté també els promotors T7/SP6 per l'expressió *in vitro* de proteïnes.

pRS (Origene, Ref. TR20003): conté els *Long terminal Repeats* (LTR) 5' i 3' del virus *Moloney murine leukemia* (MMLV) que permetran la producció de retrovirus que podran inserir-se en el genoma de les cèl·lules diana. Conté un gen de selecció a ampicil·lina (procariotes) i un gen de selecció a puromicina (eucariota) (Veure Mètodes IV. 5. per mapa).

pGFP-V-RS (Origene, Ref. TR30007): igual que l'anterior però presenta resistència a kanamicina en procariotes i té el gen de fluorescència verda (tGFP) sota el promotor constitutiu CMV per tal de seguir l'eficiència de transfecció (Veure Mètodes IV. 5. per mapa).

4.4. Vectors reporters

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

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

5. OLIGONUCLEÒTIDS

Tots els oligonucleòtids utilitzats en aquests treball van ser sintetitzats per *Sigma-Genosys* amb un grau de puresa de HPLC. A l'apèndix es detalla la seqüència dels oligonucleòtids utilitzats.

6. ANTICOSSOS

6.1. Anticossos primaris

<u>Anticòs</u>	<u>Referència</u>
PPAR α	Santa Cruz Biotechnologies, Ref. sc-1985
HMGCS2 (1)	Santa Cruz Biotechnologies, Ref. sc-33828
HMGCS2 (2)	Camarero <i>et al.</i> , 2006
RXR α	Santa Cruz Biotechnologies, Ref. sc-553
SIRT1	Santa Cruz Biotechnologies, Ref. sc-15404
GFP	Roche, Ref. 11 814 460 001
Ser660 HSL P	Cell Signalling, Ref. 4126S
Actines	Sigma, Ref. A2066
Tubulines	Calbiochem, Ref. CP06
VDAC	Santa Cruz Biotechnologies, Ref. sc-32063
FOXO1	Cell signalling, Ref. 9454

6.2. Anticossos secundaris

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

Anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked (Amersham Biosciences, Ref. NA931V): Anticòs conjugat a l'enzim peroxidasa que reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari (ratolí), permetent la localització dels punts de la membrana on aquest s'ha unit.

Donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnologies, Ref. cs-2020): Anticòs conjugat a l'enzim peroxidasa que reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari (cabra), permetent la localització dels punts de la membrana on aquest s'ha unit.

Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L) *2mg/mL (Invitrogen, Ref. A11055): anticòs conjugat a la proteïna verd-fluorescent Alexa Fluor 488 que reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari (cabra), permetent la visualització de la localització subcel·lular on aquest s'ha unit. Alexa Fluor 488 presenta una fluorescència d'excitació i emissió màximes de 495 nm i 519 nm respectivament.

Alexa Fluor® 647 chicken anti-rabbit IgG (H+L) *2mg/mL (Invitrogen, Ref. A21443): anticòs conjugat a la proteïna vermell llunyà-fluorescent Alexa Fluor 647 que reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari (conill), permetent la visualització de la localització subcel·lular on aquest s'ha unit. Alexa Fluor 647 presenta una fluorescència d'excitació i emissió màximes de 650 nm i 668 nm respectivament.

7. REACTIUS

7.1. Material radioactiu

[¹⁴C] **Palmitic acid** (56mCi/mmol) (Amersham Biosciences, Ref. CFA23)

L-[methyl-³H] **Carnitine Hydrochloride** (82Ci/mmol) (Amersham Biosciences, Ref. TRK762)

[1-¹⁴C] **Acetyl-CoA** (4mCi/mmol) (Perkin Elmer, Ref. NEC313I050UC)

7.2. Reactius utilitzats en cultius cel·lulars

Per al manteniment i propagació dels cultius cel·lulars:

<u>Reactiu</u>	<u>Referència</u>
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen Ref. 52100-039
Sèrum boví fetal (Foetal Bovine Serum Heat inactivated)	Invitrogen Ref. 10270-106
Penicil·lina- Estreptomicina 10.000 U.I./mL	Invitrogen Ref. 15140-122
L-glutamina 200 mM	Invitrogen Ref. 25030-024
Bicarbonat sòdic en solució al 7,5 %	Sigma Ref. S-8761
Tripsina EDTA	Invitrogen Ref. 15400-054
Modified Eagle medium (MEM)	Invitrogen, Ref. 61100-087
OPTI-MEM	Invitrogen, Ref.
DMEM sense glucosa ni piruvat	Invitrogen, Ref. 11966

Reactius utilitzats per a tractaments puntuals. Si no s'indica el contrari, van ser ressuspesos en aigua i guardats en alíquotes a -20°C:

MATERIALS I MÈTODES

Puromicina	Sigma, Ref. P8833
Hexadimethrine bromide (Polybrene®)	Sigma, Ref. H9268
Acetoacetate, lithium salt	Sigma, Ref. A8509
(±)-Sodium 3-hydroxybutyrate	Sigma, Ref. 54965
WY14645 (resuspès en DMSO)	Sigma, Ref. C7081

Reactius de transfecció utilitzats:

Lipofectamina LTX	Invitrogen, Ref. 15338-100
FuGene 6	Roche, Ref. 11814443001
DharmaFECT 4	Thermo Fisher Dharmacon, Ref. T-2004-02

Tot el material fungible, estèril, per treballar amb cultius cel·lulars es va adquirir a la casa comercial Corning®.

7.3. Marcadors de pes molecular de DNA i proteïna

Marcador DNA 1Kb	Biotools, Ref. 31005
Marcador DNA 100pb	Biotools, Ref. 31006
<i>GelPilot DNA High Range</i>	Qiagen, Ref. 239145
<i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i>	Fermentas, Ref. SM0441

7.4. Altres reactius

Acetil-CoA	Sigma, Ref. A2181
Acetoacetyl-CoA	Sigma, Ref. A1625
Acetophenone Reagent Plus	Sigma, Ref. A1070-1
Acrilamida 30% (29:1)	Protea Biosciences, Ref. PG-420-500mL
Agarosa	Sigma, Ref. A5093
Albúmina sèrica bovina (BSA)	Sigma, Ref. A7906
<i>Bio-Rad Protein Assay</i>	Bio-Rad, Ref. 500-0006
<i>BioTherm™ Taq Polymerase</i>	Attend Bio, Ref. GC-002-0500
Bromur d'etidi	Sigma, Ref. E4134
<i>BSA fatty acid free</i>	Roche, Ref. 775827
<i>Comassie® Brilliant Blue R-250</i>	Bio-Rad, Ref. 161-0400

DAPI	Sigma, Ref. D8413
Dialysis sacks, avg flat width 25mm	Sigma, Ref. D61991-25EA
dNTPs 100mM EACH	Attend Bio, Ref. GC-013-001
<i>Expand High Fidelity</i>	Roche, Ref. 11 732641001
Fosfatasa alcalina	Roche, Ref. 713023
Glucosa	Sigma, ref. G7528
Glutatió-Sefarosa	Amersham, Ref. 17075601
Inhibidors de fosfatases	Sigma, Ref. P2850
Inhibidors de proteases	Sigma, Ref. 8340
IPTG	Applichem, Ref. A10080025
<i>L-Carnitine hydrochloride</i>	Sigma, Ref. C0283
<i>LA Taq™</i>	TaKaRa, Ref. RR002A
Líquid de centilleig EcoLite(+)	ICN Biolink 2000, Ref. 882475
Membrana de PVDF (<i>Immobilon-P, 0,45µm</i>)	Millipore, Ref. IPVH00010
NP 40 alternative	Calbiochem, Ref. 492016
Àcid Palmític	Sigma, Ref. P9767
PMSF	Sigma, Ref. 7626
<i>ProLong®Gold Antifade Reagent</i>	Invitrogen, Ref. P36930
Proteinasa K	Fermentas, Ref. E00491
Random Hexamers (dN) 6	Roche, Ref. 1103473001
S-Palmitoil-CoA	Sigma, Ref. P9716
T4 DNA lligasa (NEB)	New England Biolabs, Ref. M0202S
T4 DNA lligasa (Promega)	Promega, Ref. M1801
TEMED	Bio-Rad, Ref. 161-0801
Tires reactives Elite	Bayer, Ref. 3921C
Transcriptasa inversa M-MLV	Invitrogen, Ref. 28025-013
TriReagent	Ambion, Ref. AM9738
Triton-X	Sigma, Ref. T8787
Tween-20	Calbiochem, Ref. 655205

MATERIALS I MÈTODES

8. EINES INFORMÀTIQUES

Basic Local Alignment tools (2.2.18): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (National Center for Biotechnology Laboratory-NCBI-USA).

Entrez-Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (National Center for Biotechnology Laboratory-NCBI-USA).

SPSS v11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA).

ImageJ 1.42I: <http://rsb.info.nih.gov/ij> (NIH, USA)

Webcutter software: <http://bio.lundberg.gu.se/cutter2>

MÈTODES

I. OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ DEL DNA

1. OBTENCIÓ DE DNA

1.1. Preparació de DNA plasmídic

Per tal d'obtenir el DNA plasmídic, es parteix d'una soca bacterina que conté el plasmidi d'interès i es fa créixer en medi líquid Luria-Bertrani Broth (LB) amb antibiòtic. L'antibiòtic utilitzat depèn de la resistència que confereixi el plasmidi, en el present treball es va fer servir ampicil·lina (100mg/L) o kanamicina (25mg/L). El volum utilitzat per créixer la soca varia en funció de la quantitat de DNA que es vol obtenir: 2 mL per obtenir una preparació a petita escala (mini-preparació) o 100 mL per obtenir-la a gran escala (maxi-preparació). En el primer cas el cultiu es va iniciar a partir d'una colònia aïllada crescuda en medi sòlid, en el segon cas és necessari fer un pre-cultiu d'un volum inferior (2-10mL) per què el creixement sigui òptim.

Es va conservar una alíquota de cèl·lules DH5 α i de DH5 α transformades amb els plasmidis utilitzats congelades a -80°C en medi LB amb glicerol al 15%.

LB (Luria-Bertrani Brtoh) pH 7.4

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

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

El mètode de preparació de DNA plasmídic utilitzat es basa 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 (basat en el mètode de Birnboim i Doly, 1979). 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 *WizardTM Minipreps DNA Purification* (Promega, Ref. A1460), obtenint-se, a partir de cultius de 2mL, 1-10µg de DNA d'un plasmidi d'alt nombre de còpies. En l'obtenció de grans quantitats de DNA es va utilitzar el *kit* comercial *Pure LinkTM HiPure Plasmid Filter Maxiprep kit* (Invitrogen, Ref. K2100-17) obtenint-se, a partir de cultius de 100mL, 100-500µg de DNA d'un plasmidi d'alt nombre de còpies.

En el cas de l'obtenció del plasmidi pFLOX-5'ARM-EXON2-3'ARM per ser electroporat, es va utilitzar el *kit* comercial *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Ref. 12362) que elimina les endotoxines bacterianes. Es va partir d'un cultiu de 200mL de LB i es van realitzar l'elució del DNA de la columna amb TE estèril.

1.2. Obtenció de DNA genòmic

1.2.1. De teixits

Es partí del fetge de 3 ratolins de la soca 129SvEv sacrificats per desnucació. S'utilitzà el *kit* comercial *Genomic DNA extraction* (Biotools, Ref. 21.002). S'obtingueren els teixits i es repartiren en fraccions de 150mg amb 1ml de solució de lisi tamponada que conté proteïnasa K i β-mercaptoetanol. S'homogenitzà amb un *polytron* RPT-MR 2100 (*Kinematica AG*). Es deixaren les mostres en agitació a 65°C durant 3h. Es procedí segons el protocol de la casa comercial, el fonament del qual és l'adsorció selectiva dels àcids nucleics a la resina de sílica utilitzada.

1.2.2. De cèl·lules mare embrionàries

Es va utilitzar una modificació del mètode descrit per Blin i Stafford (1976), que permet l'obtenció de DNA genòmic a partir de teixit o de cèl·lules en cultiu. Consisteix en lisar les cèl·lules en una solució tamponada que conté SDS i Proteïnasa K (solució TESNA). Després d'una incubació de 2h a 37°C es recullen les cèl·lules dels poucs i

MATERIALS I MÈTODES

s'incuben 3h més a 55°C. Un cop lisades les cèl·lules, el DNA es purifica per extracció amb fenol-cloroform-isoamilalcohol 25:24:1 per eliminar les proteïnes. Seguidament, el DNA es precipita amb un volum d'isopropanol i NaCl 50mM i després d'un rentat amb etanol al 70%, es resupèn en TE, incubant-lo a 15 min a 65°C.

Solució de lisi (TESNA)

Tris pH 8	10mM
EDTA	10mM
NaCl	100mM
SDS	0.5%
De manera extemporània:	
Proteinasa K	250µg/mL

1.3. Precipitació de 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 d'una hora i posteriorment, es van centrifugar a 15000 rpm durant 20 minuts. El sediment obtingut es va rentar amb etanol al 70% i, després de tornar a centrifugar 5 minuts a 15000 rpm, s'eliminà el sobrenadant. El DNA precipitat va ser resuspès en aigua MilliQ autoclavada o TE pH 8.0.

1.4. Quantificació del DNA

La concentració de DNA es determina per espectrofotometria mesurant l'absorbància de la mostra a 260 nm i 280 nm, i considerant que 1 densitat òptica a 260 nm (OD_{260}) correspon a 50 ng/mL de DNA de doble cadena. La relació entre les dues absorbàncies és un indicatiu de la puresa de la mostra; es consideren acceptables valors >1.8. La lectura espectrofotomètrica es va realitzar per addició directa de 2 µL de la mostra a quantificar en un NanoDrop-1000 (*NanoDrop Technologies, Inc*).

1.5. Ressolució, identificació i purificació de fragments de DNA

1.5.1. Separació de fragments de DNA en gels d'agarosa/TAE/Bromur d'etidi.

L'electroforesi en gels d'agarosa és una tècnica que permet la separació de fragments de DNA de mides compreses entre 50 pb i 25 Kb. La resolució d'aquests gels vé determinada per la concentració d'agarosa (0.8-2.5%), permetent així la separació dels fragments de menor mida augmentant la relació agarosa/TAE.

La comparació de les mobilitats electroforètiques de les bandes resoltes en un gel d'agarosa amb fragments de DNA de mida coneguda permet el càlcul del pes molecular d'un DNA lineal, tenint en compte que la mobilitat electroforètica d'un fragment de DNA en un gel d'agarosa és inversament proporcional al logaritme del seu pes. Es van utilitzar tres marcadors de pes molecular de DNA indicats en l'apartat Materials 7.3.

El DNA es visualitza en un gel d'agarosa mitjançant la incorporació, a la solució d'agarosa/TAE, d'un colorant fluorescent, bromur d'etidi, que s'intercala entre les dues cadenes de l'àcid nucleic i revela la presència de DNA o RNA en ser irradiat amb llum UV d'ona curta (310 nm). Per preparar els gels d'agarosa es va dissoldre, en calent, l'agarosa en el tampó d'electroforesi (TAE 1X) i s'afegiren 0.5 µg/mL de bromur d'etidi a la solució atemperada.

Tampó d'electroforesi (TAE 1x)

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

Tampó de càrrega de les mostres 5x

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

1.5.2. Purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa

Es va utilitzar el *kit* comercial *WizardTM SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Ref. A9282) i es segueixen les indicacions de la casa comercial per a la purificació de les bandes de DNA. Aquest mètode de purificació es basa en la dissolució del fragment de gel que conté el DNA a purificar en un agent caotrópic (perclorat sòdic) i la posterior adsorció selectiva d'aquest DNA en una matriu de sílice. El DNA

MATERIALS I MÈTODES

adsorbit és rentat per eliminar impureses i eluït en condicions de baixa força iònica (aigua miliQ autoclavada o TE pH 8.0) (Vogelstein i Gillespie, 1979).

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 protocol·lar, per norma general, digerint el DNA a una concentració final de 50-200ng/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). 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. Desfosforil·lació del DNA

Per a la desfosforilació del DNA es va emprar la fosfatasa alcalina de vedella (CIAP) que 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 Zn^{2+} per actuar. El seu ampli ús vé donat per la seva elevada activitat específica i per ser fàcilment inactivable per escalfament (70°C 10 min) o extracció amb fenol-cloroform.

La CIAP es va utilitzar per desfosforilar els extrems cohesius o roms dels vectors plasmídics, per tal de reduir la possibilitat de relligació del vector en els clonatges. La reacció de desfosforilació es va realitzar afegint la quantitat d'enzim necessària en les reaccions de digestió del DNA, ja que els tampons són compatibles i la temperatura d'actuació també (37°C). Les reaccions ja digerides i desfosforil·lades van ser resoltes en un gel d'agarosa i purificades com s'indica en l'apartat mètodes I.1.5.1 i 2.

2.3. Lligació del DNA

Es va utilitzar la DNA lligasa del bacteriòfag T4 per a la construcció de molècules híbrides de DNA. Aquest enzim catalitza la formació d'enllaços fosfodièster entre un grup fosfat 5'terminal d'un fragment de DNA de doble cadena i l'hidroxil 3'terminal d'un altre. La DNA lligasa pot actuar sobre extrems 5' o 3' cohesius o sobre extrems roms. Aquest enzim funciona a 16-22°C, i és dependent d'ATP.

Reacció de lligació (Vf=20µl)

Vector	50ng
Insert	x2-x4 molècules/molècula de vector
T4DNA lligasa	1µl (1-3U.I./µl)
Tampó 1x	Tris-HCl pH7.5 40mM, MgCl ₂ , DTT 10mM, ATP 0.5mM, BSA 50µg/ml

En general, s'utilitza la T4 DNA lligasa de Promega i s'incubà la reacció tota la nit en aigua-gel. Per al clonatge de la construcció pFLOX-5'ARM-EXON2-3'ARM es va utilitzar la T4 lligasa de New England Biolabs (NEB) durant 1h a temperatura ambient.

3. CONSTRUCCIÓ DE MOLÈCULES DE DNA RECOMBINANT

3.1. Clonatge de fragments de DNA

El primer pas per clonar un fragment de DNA és realitzar una reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifiqui el fragment desitjat (Mètodes 1.4.1). Un cop obtingut es pot procedir a la digestió enzimàtica del fragment i al posterior clonatge en el vector desitjat o bé es pot lligar directament amb un vector de clonatge intermig com pGEM-T. Així, els fragments de PCR generats amb la Taq DNA polimerasa van ser resolts, extrets i purificats d'un gel d'agarosa i lligats sense modificació enzimàtica prèvia, gràcies als extrems cohesius compatibles generats per la Taq polimerasa, que afegeix dATP a l'extrem 5' i els extrems protuberants 3' T del vector intermig. A continuació, es procedí al subclonatge dels fragments en els vectors desitjats (veure següent apartat).

3.2. 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 desfosforilat. Vector i insert van ser purificats en gel d'agarosa i van ser combinats i tractats amb T4 DNA lligasa. Posteriorment, els productes de la reacció de lligació van ser introduïts a cèl·lules *E.coli* competents (transformació; Mètodes I.3.3). Els transformants van ser identificats per selecció de color (blau/blanc), resistència a antibiòtic o PCR-preps i van confirmar-se els positius per digestió, electroforesi i seqüenciació del DNA obtingut de les colònies. En cada cas es va buscar la metodologia òptima per l'obtenció de la molècula de DNA desitjada. Els detalls de les contruccions generades en el present treball es recullen a l'apèndix.

3.3. Transformació de cèl·lules de *E. Coli*

La transformació consisteix en la introducció de DNA plasmídic a cèl·lules procariotes. Hi han diferents mètodes de transformació (xoc tèrmic, electroporació, etc.) i tots requereixen de la preparació prèvia de les cèl·lules per fer-les receptives a l'entrada de DNA exogen. Aquest procés consisteix, generalment, en permeabilitzar la membrana d'aquestes cèl·lules. Aquestes cèl·lules susceptibles de ser transformades s'anomenen cèl·lules competents.

3.3.1. Preparació de cèl·lules competents: Mètode del CaCl_2

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

A partir d'un cultiu de cèl·lules *E.coli* en fase exponencial de creixement ($\text{OD}_{600}=0.4$), se separen les cèl·lules del medi per centrifugació i es renten dues vegades en una solució de CaCl_2 60 mM. El tractament amb ions calci permeabilitza les

membranes i aquestes cèl·lules esdevenen susceptibles d'incorporar el DNA present en el medi (competents).

Solució de CaCl₂*

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

*Solució estèril. Ajustar pH i filtrar.

3.3.2. Transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic

L'entrada dels productes de lligació anteriorment descrits a la cèl·lula competent es va realitzar per xoc tèrmic (10 min en gel → 5 min 37°C → 2 min gel). Posteriorment, les cèl·lules van ser incubades, en agitació, en 1mL de medi LB líquid no selectiu (1h a 37°C) abans de créixer-les en plaques de medi LB sòlid selectiu. En alguns casos es van utilitzar cèl·lules competents DH5α comercials (Invitrogen, Ref. 18265-017).

3.4. Selecció de colònies transformades

La selecció de les colònies recombinants transformades es realitzà mitjançant el creixement de les cèl·lules sotmeses a la transformació en un medi LB-agar selectiu. La selecció es donava, en tots els casos, per la resistència a l'antibiòtic incorporada pel plasmidi, generalment ampicil·lina o kanamicina. En el cas que el plasmidi incorporat ho permetès també es va fer una selecció per color, blau/blanc, utilitzant plaques suplementades amb IPTG (0.5mM) i X-Gal (80 mg/L), a més de l'antibiòtic.

En alguns casos es va utilitzar també la tècnica PCR-preps (Mètodes 1.4.2) i en tots els casos es va comprovar la correcta identitat de les construccions generades per patró de digestió i seqüenciació (Mètodes, 1.5).

4. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Aquesta tècnica, descoberta l'any 1983 per Karl Mullis, permet la síntesi enzimàtica de molècules definides de DNA a partir d'un DNA motlle que conté la seqüència que es vol amplificar. La reacció utilitza dos oligonucleòtids com a

MATERIALS I MÈTODES

encebadors que hibriden amb cadenes oposades i flanquejen la regió de DNA a amplificar. L'acumulació exponencial (2^n) dels fragments de DNA a amplificar s'aconsegueix mitjançant cicles repetitius de desnaturalització del DNA motlle, hibridació dels encebadors i extensió d'aquests per acció d'una DNA polimerasa, on les cadenes naixents d'un cicle actuen com a motlle en el cicle següent d'amplificació.

Saiki *et al* (1988) van descriure la utilització en aquesta tècnica d'una DNA polimerasa termostable purificada del bacteri termofílic *Thermus aquaticus* (Taq DNA Polimerasa). Aquest enzim treballa a una temperatura òptima de 72 °C i resulta poc inactivat a altes temperatures (94 °C, etapa de desnaturalització), evitant així que s'hagi d'afegir a l'inici de cada amplificació.

4.1. Amplificació de DNA

En aquest treball les amplificacions de DNA s'han realitzat a partir de DNA plasmídic, de cDNA, o bé DNA genòmic de ratolins 129SvEv i de clons de cèl·lules mare embrionàries.

Els criteris considerats per al disseny dels encebadors van ser:

- a. 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.
- b. El rang ideal de G+C és de 40-60%. Percentatges elevats de A+T no hibriden adequadament
- c. 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).
- d. 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.

Les condicions estàndards d'amplificació i de la mescla de reacció es descriuen a continuació. Les amplificacions es realitzaren amb *Biotherm™ Taq Polymerase* en un termociclador *MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad)*.

La temperatura d'hibridació es va decidir en funció de les temperatures de fusió dels encebadors (T_m) i va oscil·lar entre els 54°C i els 60°C. En tots els casos les reaccions es van realitzar en volums de 50-100µL.

Condicions d'amplificació

Desnaturalització inicial (<i>hot start</i>)	94°C 5 minuts
Desnaturalització	94°C 45 segons
Hibridació	55°C-68°C 45 segons
Extensió	72°C o 68°C 1 minut/Kb
25-35 cicles	
Extensió final	72°C o 68°C 10minuts

Reacció de PCR

DNA motlle	100-1000 ng
Tampó Taq 10x	5 µL
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM cada dNTP
Oligo <i>forward</i>	300 µM
Oligo <i>reverse</i>	300 µM
Taq DNA polimerasa	2.5 U.I
Aigua q.s.p.	50 o 100µL

El *kit Expand High Fidelity PCR System* va ser utilitzat quan va ser necessari reduir al màxim la possibilitat d'introduir errors en els productes de PCR. S'utilitzà la *LA TaqTM* per les amplificacions per la genotipació dels clons de cèl·lules mare embrionàries ja que és capaç d'amplificar fragments més llargs. Aquesta Taq funciona a 68°C. Com a motlle s'utilitzaren entre 500ng i 1000ng de DNA genòmic.

4.2. PCR-PREPS

Aquesta tècnica permet la selecció de les colònies transformants, que han incorporat els plasmidi recombinant, mitjançant l'amplificació d'un fragment del plasmidi per PCR directament de les colònies que han crescut sobre una placa de LB/antibiòtic resultat de la transformació. En general, es va utilitzar un oligonucleòtid del vector i un de l'insert. La temperatura inicial de 95°C permet la ruptura de la

MATERIALS I MÈTODES

cèl·lula i, per tant, fa accessible el DNA a la reacció. La mescla de reacció es va preparar segons el protocol descrit a l'apartat anterior en un volum final de 20 µL.

5. SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA DEL DNA

Per a l'anàlisi de la seqüència del DNA, es van enviar 10µL del DNA a seqüenciar i 10µL d'oligonucleòtid a *MacroGen Inc.* (www.macrogen.com). La companyia envia el cromatograma corresponent que es va analitzar mitjançant l'eina informàtica BLAST.

II. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE L'RNA

L'RNA és una molècula molt sensible a l'acció de les RNAses, de manera que sempre es treballa amb guants i material estèril per tal d'evitar la seva degradació.

1. OBTENCIÓ DE L'RNA TOTAL

Aquesta tècnica es basa en el mètode descrit per Chomczynski i Sacchi (1987). Per a la preparació de l'RNA es va utilitzar el reactiu *TriReagent*[®]. Es 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 1 mL de reactiu per placa de 100 mm, o bé, 0.5 mL per placa de 60 mm o MW6, produint-se així, el seu lisat. Per obtenir RNA a partir de teixit, es va escindir un fragment d'aquest (inferior al 10% del volum de *TriReagent*[®]) en un morter amb N₂ líquid i es va sotmentre a la descongelació dins d'1 mL de *TriReagent*[®]; el teixit va ser homogenitzat amb un *polytron* RPT-MR 2100 (*Kinematica AG*), i es va realitzar una centrifugació addicional per eliminar les restes de teixit (10min, 4°C, 12000xg). En ambdós casos, després de l'homogenització 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 el DNA. Seguidament l'RNA va ser precipitat amb isopropanol i ressuspenès en un volum d'aigua adequat.

Pel cas específic de la hibridació de l'RNA amb el *microarray* d'*Affymetrix*[®] (*GeneChip Mouse Gene 1.0ST*) es va utilitzar la combinació de dos protocols. Així, la

fase aquosa obtinguda després de l'homogenització del teixit amb el reactiu *TriReagent*[®] es va mesclar 875µL del tampó RLT proveït en el *kit* comercial *RNeasy Mini* (Qiagen, Ref. 74134) i després de l'addició de 625µL d'etanol absolut es va purificar l'RNA mitjançant les columnes proveïdes per la casa comercial segons les instruccions específiques. L'RNA es va ressuspendre en aigua mQ lliure de DNAses i RNAses.

2. QUANTIFICACIÓ DE L'RNA TOTAL

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

Es va determinar la concentració mitjançant la lectura espectrofotomètrica en un NanoDrop-1000 (*NanoDrop Technologies, Inc*).

3. RT-PCR QUANTITATIVA

3.1. Síntesi de cDNA a partir d'RNA

El cDNA va ser sintetitzat per una DNA polimerasa dependent d'RNA (transcriptasa inversa M-MLV) que necessita un oligonucleòtid encebador. Per tal d'obtenir cDNA representatiu de tot l'RNA present a les cèl·lules es va emprar oligonucleòtids degenerats $p(dN)_6$ (*Random Primers*).

Reacció de retrotranscripció

RNA total	1-2 µg
<i>Random primers</i>	0.25 µg
dNTPs 10 mM each	1 µL
Aigua q.s.p.	13 µL
Desnaturalització	65°C 5 minuts
Afegir:	
5x <i>first strand buffer</i>	4 µL
DTT 0.1 M	2 µL
M-MLV	1 µL (200 U.I.)

Incubar:

37 °C 50 minuts

70 °C 15 minuts

3.2. Eliminació del DNA genòmic

Per evitar la contaminació per DNA genòmic, es van tractar els cDNAs amb el *kit* comercial *DNA-free* (Ambion, Ref. AM1906) seguint les instruccions de la casa comercial.

3.3. PCR quantitativa (*Real Time 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*. El cDNA obtingut és amplificat per PCR amb oligonucleòtids específics del gen d'interès. 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 en unir-se a la seqüència amplificada (TAQMAN PROBES[®]) o bé quan s'intercalen a DNA de doble cadena (SYBR GREEN[®]).

En el present treball s'ha utilitzat el mètode de *TaqMan[®] Gene Expression*. 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 distància que separa el *quencher* del fluorogen és suficient per disminuir la fluorescència emesa per aquest. 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 (Bustin, 2000).

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

Les condicions de la reacció de PCR van ser:

<i>Platinum[®] Quantitative PCR supermix-UDG with Rox</i> (Invitrogen, Ref:11743-100)	12.5 µL
TaqMan [®] <i>Gene expression assay</i>	1.25 µL
18S <i>eukaryotic Probe</i>	1.25 µL
cDNA	50-300 ng
Aigua q.s.p.	25 µL

Les condicions d'amplificació van ser:

50 °C	2 minuts	40 cicles
95 °C	10 minuts	
95 °C	15 segons	
60 °C	1 minut	

Les sondes TaqMan[®] (Applied Biosystems) utilitzades es descien a continuació:

Gen	Espècie	Sonda (Referència)
Hmgcs2	<i>Mus musculus</i>	Mm00550050_m1
Fgf21	<i>Mus musculus</i>	Mm00840165_g1
Pck1	<i>Mus musculus</i>	Mm01247058_m1
Cpt1a	<i>Mus musculus</i>	Mm00550438_m1
Fsp27	<i>Mus musculus</i>	Mm00617672_m1
Sult1e1	<i>Mus musculus</i>	Mm00499178_m1
HMGCS2	<i>Homo sapiens</i>	Hs00985427_m1
FGF21	<i>Homo sapiens</i>	Hs00173927_m1
CIDEC	<i>Homo sapiens</i>	Hs00535723_m1
CPT1A	<i>Homo sapiens</i>	Hs00157079_m1
PPAR α	<i>Homo sapiens</i>	Hs00231882_m1
18S	Eucariotes	Ref: 4319413E

III. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES

1. OBTENCIÓ D'EXTRACTE CRU DE PROTEÏNES

Per a l'obtenció d'extracte cru de proteïnes les cèl·lules es va recollir en PBS 1x i es centrifugaren 10min a 500xg. Seguidament es va resuspendre el sediment cel·lular en el tampó de lisi NP40 i s'incubaren en plataforma oscilant a 4 °C durant 15-20min. Els lisats cel·lulars es centrifugaren (15min, 15000xg, 4°C) i es recuperà el sobrenadant.

MATERIALS I MÈTODES

Tots els tampons utilitzats per obtenció de proteïnes van ser suplementats amb un còctel de inhibidors de proteases (veure Materials) i PMSF 0.1mM. Els extractes proteics es congelaren a -80°C fins al seu posterior anàlisi.

Tampó NP40

Tris HCl pH 8	50 mM
NP40	1%
NaCl	150 mM

Per a l'obtenció d'extracte cru de teixits es procedí a dissoldre un fragment del teixit congelat en el tampó de lisi RIPA. El teixit es va homogenitzar amb un *polytron* RPT-MR 2100 (*Kinematica AG*), i posteriorment es va centrifugar per eliminar les restes de teixit (10min, 16000xg, 4°C).

RIPA Buffer

Tris HCl pH 7	10 mM
Tritó X-100	1%
NaCl	150 mM
EDTA	5mM

En el cas concret de mostres de teixit adipós es va utilitzar el tampó de lisi que es detalla a continuació suplementat amb un còctel d'inhibidors de fosfatases.

Tampó de lisi per teixit adipós

HEPES pH 7.5	50 mM
NaCl	1%
EDTA	1 mM
EGTA	2.5 mM
Tween-20	0.1%
Glicerol	10%
NaF	1 mM

2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES: MÈTODE DE BRADFORD

El mètode de quantificació de proteïnes descrit per Bradford (1976) que es basa en el canvi que es produeix en l'espectre d'absorció de certs colorants, com a conseqüència de la seva adsorció sobre molècules proteïques. Aquest mètode mostra una gran sensibilitat i amplis marges de linealitat. Per al seu ús es van seguir les

indicaciones del fabricant de la solució *Bio-Rad Protein Assay*, utilitzant com a patró l'albumina sèrica bovina (BSA).

3. SEPARACIÓ ELECTROFORÈTICA DE PROTEÏNES EN GELS D'ACRILAMIDA-SDS

L'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) és una tècnica de separació de proteïnes en funció del seu pes molecular (Laemmli, 1970). Aquesta separació es realitza en una matriu de poliacrilamida en condicions que assegurin la dissociació de les proteïnes en subunitats polipeptídiques individuals. La desnaturalització de les proteïnes es duu a terme en presència de β -mercaptoetanol, agent reductor de ponts disulfur, i d' SDS, que s'uneix a aquests polipèptids desnaturalitzats carregant-los negativament. En aquest cas, la càrrega negativa de cada polipèptid serà proporcional a la quantitat d' 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 de la fase separadora es va decidir en funció dels pesos moleculars de les proteïnes a resoldre en el gel, oscil·lant entre el 8% per proteïnes d'alt pes molecular i el 12% per proteïnes de baix pes molecular. El processament de les mostres abans de sotmetre-les a l'electroforesi inclou: la mescla amb el tampó de càrrega i la desnaturalització per ebullició durant 10 minuts.

<u>Gel apilador</u>		<u>Gel separador</u>	
Acrilamida	5%	Acrilamida	5-15%
Tris-HCl pH 6.8	0.12 M	Tris-HCl pH 8.8	0.37%
SDS	0.1%	SDS	0.1%
Persulfat ammònic	0.1%	Persulfat ammònic	0.1%

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

MATERIALS I MÈTODES

Tampó de càrrega per proteïnes 2X

(Laemmli Buffer)

Tris-HCl pH 6.8	50 mM
SDS	2%
Glicerol	10%
Blau de bromofenol	0.0012%
β -mercaptoetanol	5%

Tampó d'electroforesi

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

4. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER IMMUNOTRANSFERÈNCIA: *WESTERN BLOT*

En la tècnica de *Western blot*, les mostres proteïques 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 mitjançant la utilització d'anticossos.

Després de l'electroforesi, el gel de poliacrilamida-SDS és col·locat en contacte amb una membrana de PVDF, entre peces de paper Whatman[®] 3MM i dues esponges humides en tampó de transferència. El conjunt es col·loca, submergit en tampó de transferència, en un suport entre dos electrodos on el gel es queda en el càtode i la membrana encarada a l'ànode. La transferència es va realitzar en un *Mini Trans blot* (Bio-Rad) durant un temps mínim de 2 h, a 4 °C i 200 mA.

Tampó de transferència

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

Després de la transferència, es procedeix a la saturació de la membrana amb PBS1x-Tween amb un 5% de llet en pols desnatada, durant 1h a temperatura ambient, o bé, tota la nit a 4°C. El percentatge de Tween-20 utilitzat depèn de cada anticòs primari. Seguidament, aquesta membrana va ser incubada amb l'anticòs primari i amb el secundari, mantenint aquestes incubacions un temps mínim d'1 hora cada una a

temperatura ambient o tota la nit a 4°C. Entre les dues incubacions i abans de la detecció es van fer tres rentats de 10 minuts amb PBS1x-Tween.

Durant el procés d'immunodetecció, l'anticòs primari reconeix els punts antigènics presents a la membrana i el secundari és un anticòs que reconeix la cadena pesada del primari. Aquest segon anticòs està conjugat a un enzim (peroxidasa de rave) que permetrà la localització dels punts de la membrana on s'ha unit el primari. Per a la immunodetecció de les proteïnes es va utilitzar el *kit EZ-ECL™ Western Blotting detection reagent* (Reactiva, Ref. 20-500-120).

A continuació es mostra una relació dels anticossos utilitzats en el present treball, així la seva dilució de treball i el *blotto* utilitzat (PBS-T1: 1% de Tween, TBS-T1: TBS 1%Tween, TBS-T0.05: TBS 0.05% Tween).

<u>Ac primari</u>	<u>Dilució</u>	<u>Blotto</u>	<u>Ac secundari</u>	<u>Dilució</u>	<u>Blotto</u>
PPAR α	1:1000	PBS-T1 5% llet	cabra	1:2000	PBS-T1 5% llet
Actines	1:500	PBS-T1 5% llet	conill	1:5000	PBS-T1 5% llet
Tubulines	1:5000	PBS-T1 5% llet	ratolí	1:2000	PBS-T1 5% llet
HMGC2 (1)	1:500	PBS-T1 5%llet	Conill	1:10000	PBS-T1 5% llet
	1:1000 ¹				
HMGC2 (2)	1:800 ²	PBS-T1 5%llet	Conill	1:10000	PBS-T1 5% llet
GFP	1:2000	PBS-T1 5%llet	Ratolí	1:2000	PBS-T1 5% llet
p-HSL	1:1000	TBS-T1 5%llet	Conill	1:10000	TBS-T1 5%llet
RXR α	1:500	PBS-T1 5%llet	Conill	1:10000	PBS-T1 5%llet
SIRT1	1:500	PBS-T1 5%llet	Conill	1:10000	PBS-T1 5%llet
FOXO1	1:1000	TBS-T0.05 5%llet	Conill	1:5000	TBS-T0.05 5%llet

¹Dil·lució emprada per mitocondris de fetges de ratolins dejunats. ²Emprat per la immunodetecció en els assajos de *GST-Pulldown*.

5. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER TINCIÓ DE *COMASSIE BRILLANT BLUE*

Després de l'electroforesi en gels 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 gel és tenyit durant 15 minuts a temperatura ambient i posteriorment és submergit en solució de destinció.

MATERIALS I MÈTODES

Solució de tinció

Blau de Comassie	0.025%
Metanol	40%
Àcid acètic glacial	7%

Solució de destinció

Metanol	40%
Àcid acetic glacial	7%

6. IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTE EN CULTIUS CEL·LULARS

Les tècniques d'immunofluorescència indirecte permeten la detecció de proteïnes mitjançant l'ús d'anticossos primaris, que reconeixen les proteïnes d'interès, i anticossos secundaris conjugats amb 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 d'immunocolocalització de dues o més proteïnes. Amb aquesta tècnica s'aconsegueix una amplificació del senyal molt més gran que amb les tècniques d'immunofluorescència directa, en les quals l'anticòs primari està conjugat amb un fluorocrom.

En el present treball es van utilitzar cèl·lules HepG2 pels experiments d'immunofluorescència. Les cèl·lules es sembraren en plaques de 60 mm a una densitat de 6×10^5 cèl·lules per placa on s'havien dipositat els cobreobjectes de vidre (170 μm de gruix, 12 mm de diàmetre i 1.525 índex de refracció) (Marienfeld, Ref. 01 115 20). El dia següent, es va infectar amb diferents adenovirus (Ad-PPAR α , Ad-LacZ) i 48 hores després de la infecció es va procedir a la immunodetecció de la proteïna PPAR α sobreexpressada i la proteïna HMGCS2 endògena mitjançant anticossos específics.

6.1. Fixació de les cèl·lules sobre cobreobjectes de vidre.

Aquest pas és 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 al seu ús, sobretot en els casos en que es vulgui mantenir bé la citoarquitectura per estudis en 3D.

En el present estudi es va utilitzar la fixació amb paraformaldehid. Les cèl·lules crescudes en plaques de 60 mm sobre cobreobjectes de vidre van ser rentades dos cops amb PBS1x i fixades utilitzant una solució de paraformaldehid al 3% durant 10-15 minuts a temperatura ambient. Seguidament es va aspirar la solució de fixació i es va fer un rentat ràpid amb PBS1X i dos rentats posteriors amb PBS-Glicina.

Solució de fixació

Paraformaldehid 16%	760 µL
Sacarosa 1M	240 µL
PBS 1X	2 mL
Aigua mQ autoclavada	1 mL

Solució de PBS-Glicina (solució de rentat)

PBS	100 mM
Glicina*	20 mM

*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...)

6.2. Permeabilització

La permeabilització és necessària per a la detecció d'antígens intracel·lulars. Per a la permeabilització 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, les cèl·lules HepG2 un cop fixades es van incubar durant una hora a 37°C amb solució de permeabilització. Seguidament es feren dos rentats amb PBS-Glicina.

Solució de permeabilització

PBS	100 mM
Glicina	20 mM
Tritó X-100	0.1%

6.3. Bloqueig

Per tal d'evitar unions inespecífiques dels anticossos es va realitzar el bloqueig de les preparacions utilitzant PBS-Glicina amb BSA a l'1% (solució de bloqueig) durant 1 hora a 37°C.

6.4. Incubació amb els anticossos

El procés d'incubació amb els anticossos primaris es va realitzar durant una hora a 37°C. Els diferents anticossos primaris utilitzats es van diluir en solució de bloqueig a la dilució de treball adient i es van incubar durant 2h a 37°C. Els anticossos utilitzats van ser PPAR α (dilució 1:1000, sc-1985X) i HMGCS2 (dilució 1:100, sc-33828).

Després de la incubació amb els anticossos primaris es rentaren les cèl·lules dues vegades amb solució de PBS-Glicina i s'incubaren 10min a temperatura ambient amb DAPI 6.25 μ g/mL per tenyir els nuclis cel·lulars. Després de dos rentats més amb PBS-Glicina s'incubà amb els anticossos secundaris que foren diluïts en solució de bloqueig 1h a 37°C. A partir d'aquest moment les mostres es protegiren de la llum per evitar la pèrdua de fluorescència dels fluorocroms conjugats als anticossos secundaris.

Els anticossos secundaris utilitzats en aquest treballs es mostren a continuació:

<u>Anticòs secundari</u>	<u>Dilució</u>	<u>Condicions d'incubació</u>
Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L) *2mg/mL	1:1000	1h a 37°C (estufa)
Alexa Fluor® 647 chicken anti-rabbit IgG (H+L) *2mg/mL	1:500	1h a 37°C (estufa)

Finalment, es feren dos rentats amb PBS1x i es procedí al muntatge dels cobreobjectes sobre els portaobjectes.

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

Per al muntatge dels cobreobjectes sobre els portaobjectes es van deixar assecar les mostres uns quants minuts a temperatura ambient. Seguidament es va posar una gota (7 μ L) de medi de muntatge amb *ProLong®Gold Antifade Reagent* sobre el portaobjectes i es depositaren, de manera molt suau, els cobreobjectes per la cara on estan les cèl·lules en contacte amb el medi. Les preparacions es van deixar assecar tota la nit a temperatura ambient i després es guardaren a 4°C fins al seu anàlisi al microscopi confocal de fluorescència LEICA SP2.

7. 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. En aquest treball es va expressar i purificar, a partir de cèl·lules bacterianes *E.coli DH5α*, la proteïna de fusió GST-PPAR α .

Per tal d'expressar i purificar les proteïnes de fusió, cèl·lules *E.Coli* DH5 α transformades es van fer créixer en medi LB/ampicil·lina (50mL) durant 16 hores a 37°C. Aquest pre-inòcul va ser diluït en 500mL de medi LB/ampicil·lina fresc i es va deixar créixer a 30°C fins a una O.D.₆₀₀ de 1.6. En aquest punt es va iniciar la inducció de la proteïna de fusió afegint al medi isopropil- α -D-tiogalactosidasa (IPTG) 0.5mM i mantenint el cultiu a temperatura ambient. Aquesta inducció es va repetir 4 hores més tard. Les cèl·lules van ser recollides 16 hores després d'aquesta segona inducció per centrifugació (5000xg, 15min), ressuspeses en tampó NETN i lisades per sonicació (4 temps de 30'', 90% de potència). El sonicat va ser centrifugat (15000rpm, 10min) per eliminar les restes cel·lulars i es va iniciar la purificació de la proteïna de fusió utilitzant la capacitat de la glutatió-S-transferasa (GST) s'unir-se al glutatió.

El sobrenedant de la centrifugació del sonicat es va incubar durant mínim 1h amb una suspensió al 50% de resina glutatió-sefarosa, seguint les instruccions de la casa comercial. Després de rentar tres vegades la resina amb NETN, la proteïna purificada va ser eluïda de la glutatió-sefarosa mitjançant el tampó d'elució (1h 4°C en rotació).

<u>Tampó NETN</u>		<u>Tampó d'elució</u>	
Tris-HCl pH 8.0	20 mM	Tris-HCl pH 9.0	50 mM
NaCl	100 mM	Glutatió reduït	20 mM
EDTA	1 mM		
Nonidet P-40	0.5%		

Es va comprovar la integritat de la proteïna obtinguda per electroforesi en un gel SDS-PAGE i tinció amb *Comassie Blue* i es va quantificar pel mètode de Bradford (Mètodes, III.5).

8. ASSAIG D'UNIÓ DE PROTEÏNES (*GST PULL-DOWN*)

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

8.1. Reacció d'unió

Per a la reacció d'unió s'incubaren 15 µg de proteïna de fusió (eluïda i quantificada pel mètode de Bradford) amb 250 µg d'extracte cru d'HepG2 infectades amb els corresponents adenovirus, afegint a la mescla de reacció 50 µL de resina glutatió-sefarosa per a la posterior purificació. La mescla de reacció es va portar a un volum final de 1 mL amb tampó d'unió i es va incubar durant 4 hores a 4°C en rotació.

Tampó d'unió (preparació extemporànea)

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

Reacció d'unió

GST eluïda	25µg
Extracte cru de proteïnes	250µg
Glutatió-Sepharosa 80%	50 µL
Tampó d'unió q.s.p.	1 mL

8.2. Recuperació dels complexos proteïcs

Després de la reacció d'incubació les mostres es van centrifugar (2min, 500xg). La resina obtinguda en el sediment va ser rentada tres cops amb NETN i es va barrejar amb tampó de càrrega de proteïnes per poder ser resolta en un gel de poliacrilamida-SDS. Les interaccions proteïna-proteïna es van detectar per *Western Blot* utilitzant els anticossos RXRα i HMGCS2 (2) (Materials 6.1).

IV. CULTIUS CEL·LULARS

1. CONDICIONS DE CULTIU

En el present treball s'han utilitzat diferents línees cel·lulars establertes. Les condicions de cultiu de cadascuna d'elles es descriuen a continuació.

HepG2

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

Hek293A/HeLa/Phoenix

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

¹El DMEM i el MEM ja inclou aquestes quantitats de glucosa i per tant no cal afegir-les en preparar el medi de cultiu. ²La solució Penicil·lina- Estreptomicina 10.000 UI/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 amb un 5% CO₂, en un incubador humidificat. Periòdicament, les cèl·lules van ser tripsinitzades i diluïdes en funció del número 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.

2. CONGELACIÓ DE CÈL·LULES

Les cèl·lules es conservaren congelades en N₂ líquid. Un cop tripsinitzades, les cèl·lules es centrifuguen a 1500rpm durant 5 minuts. El sediment cel·lular es va resuspendre em medi de cultiu suplementat amb un 5-10% de dimetilsulfòxid (DMSO), segons les indicacions de les cases comercials. El procés de congelació es va realitzar

MATERIALS I MÈTODES

em un criotub ($2-3 \times 10^6$ cèl./criotub), disminuint la temperatura de les cèl·lules gradualment durant 48 hores, mantenint-les a -80°C en un tanc d'isopropanol.

3. 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 10 mL de medi de creixement fresc i es va afegir a una placa de 10 mm. Um cop les cèl·lules es van adherir es va canviar el medi per tal d'eliminar el DMSO.

4. TRANSFECCIONS EN CÈL·LULES EUKARIOTES

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

La transfecció transitòria permet la introducció de DNA a l'interior de cèl·lules eucariotes durant un període de 2-3 dies. Existeixen diferents mètodes de transfecció que s'escolliran, en funció de la durada de l'expressió requerida (transfecció estable o transitòria) i del tipus de cèl·lula a transfectar. El mètode de transfecció utilitzat en aquest treball es realitzà amb reactius lipídics comercials que s'especificuen en l'apartat Materials 7.2.

4.1. Transfecció transitòria per assajos d'activitat luciferasa.

Es va utilitzar el reactiu FUGENE[®] 6 per transfectar cèl·lules HepG2 pels assajos d'activitat luciferasa. Aquest sistema de transfecció es basa en l'embolcallament del DNA per lípids catiónics que faciliten l'entrada del DNA a la cèl·lula. Es van procedir segons les indicacions de la casa comercial, preparant primer els complexos DNA-

FUGENE® 6 i dipositant-los, després, sobre les cèl·lules a transfectar. Es va utilitzar una relació de 2.5µL de reactiu per µg de DNA total.

Les cèl·lules HepG2 es van sembrar a una densitat cel·lular de 1×10^5 cèl/ pouet en MW24 24h abans de cada transfecció. En cada pou es va transfectar:

0.4 µg	plàsmid reporter
5 ng	pRL-CMV
0.25 µg	factor transcripció
q.s.p. igualar	pcDNA3

Després de 48h, les cèl·lules transfectades van ser lisades per tal de determinar l'activitat luciferasa present en els extractes cel·lulars. La lisi cel·lular es va realitzar amb 100µL/pouet d'un tampó de lisi passiva comercial (*Passive Lysis Buffer*, Promega, Ref. E1941). Els extractes cel·lulars obtinguts es van assajar amb el kit comercial *Dual-Luciferase™ Reporter Assay System* (Promega, Ref. E1960), seguint les instruccions de la casa comercial. Es van analitzar 10µL d'extracte cel·lular amb 20µL de cada un dels reactius, segons indicacions de la casa comercial. Obtenint-se 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 l'eficiència de la transfecció). Les mesures de luminescència es van realitzar en un luminòmetre *Sirius* de *Berthold Detection System*.

4.2. Transfecció transitòria per assajar l'eficiència dels shRNAs.

Es va utilitzar el reactiu lipídic Lipofectamina LTX per assajar l'eficiència dels shRNAs clonats en els plasmidis pRS o pEGFP-RS. Es sembraren les cèl·lules el dia anterior a la transfecció a la densitat cel·lular indicada en cada cas. Es transfectaren seguint les instruccions de la casa comercial utilitzant una relació de 1.6µL de reactiu per µg de DNA total. Les cèl·lules van ser recollides entre 48 i 72h després de la transfecció i s'analitzaren els extractes crus obtinguts per *Western Blot*.

En concret, per testar l'eficiència dels shRNA contra l'HMGCS2 humana es va utilitzar la línia cel·lular HeLa. Es van sembrar 2.5×10^5 cèl./pou. Es van cotransfectar:

MATERIALS I MÈTODES

1.5µg de plasmid d'expressió pcDNA3-HMGCS2 (humà), 3µg de pRS-shRNA (relació 1:2) i 1.5µg de pN3GFP per analitzar l'eficiència de transfecció.

Per testar l'eficiència dels shRNA contra l'HMGCS2 de ratolí es va utilitzar la línia cel·lular HEK293. Es van sembrar 3×10^5 cèl./pou. Es va cotransfectar: 0.5µg pcDNA3-Hmgcs2 i 3µg p-EGFP-V-RS (relació 1:4).

5. TECNOLOGIA DE L'RNA D'INTERFERÈNCIA

Els *short hairpin RNA* (shRNA) són molècules estructuralment anàlogues als pre-miRNA i estan clonats en un plasmidi sota el promotor depenent de RNA polimerasa III U6. Els plasmidis incorporen 5 timidines al final de la seqüència que fan que l'RNA polimerasa III s'aturi; de fet, la polimerasa s'atura a la segona timidina, produint molècules shRNA amb un parell de nucleòtids protuberants a 3' de doble cadena, que és processada per Dicer i, posteriorment, la cadena complementària a l'mRNA serà incorporada al complex RISC on hibridarà amb la seqüència de l'mRNA diana i inhibirà la traducció de l'mRNA específic (Cullen, 2004) (Figura M2).

Els plasmidis utilitzats d'Origene (*HuSHTM shRNA Plasmids (29-mer)*) contenen la seqüència shRNA clonada sota el promotor U6 amb els *Long Terminal Repeats* (LTR) 5' i 3' necessaris per a la producció dels retrovirus i per a la seva integració en el genoma de les cèl·lules hoste. La transfecció d'aquests plasmidis en cèl·lules empaquetadores, que expressen les proteïnes víriques *gag*, *pol* i *env*, permeten l'obtenció dels retrovirus (Figura M1).

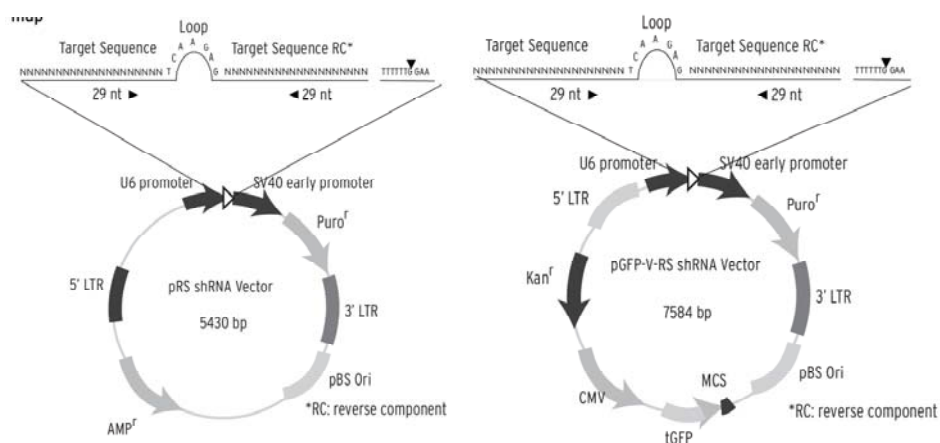


Figura M 1. Plasmidis utilitzats codificants per shRNAs utilitzats.

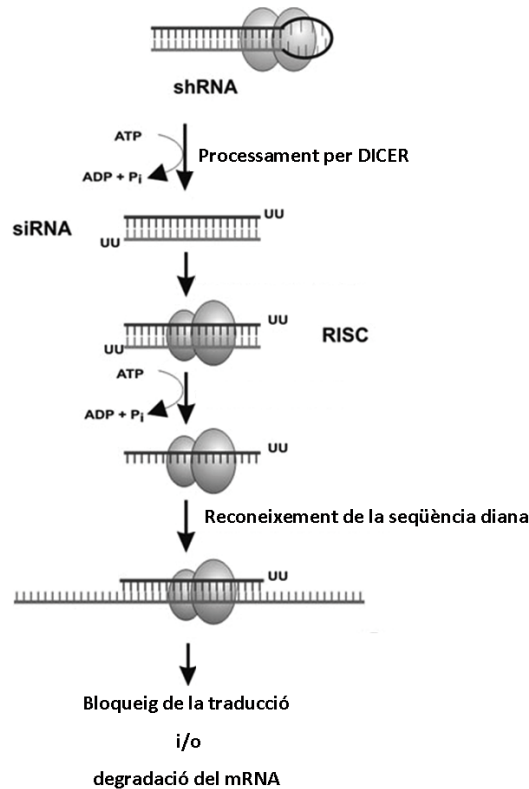


Figura M 2. Mecanisme d'acció dels shRNAs. Les molècules d'shRNA expressades sota el promotor U6, són processades per la proteïna DICER produint-se molècules siRNA que tenen extrems 3' protuberants que formaran un complex amb RISC que permetrà el desenrollament de l'RNA de doble cadena i permetrà la hibridació de la cadena *antisense* a la seqüència de l'mRNA diana.

5.1. Transfecció de cèl·lules empaquetadores per l'obtenció de retrovirus

Els retrovirus són virus que tenen envolta i presenten un genoma d'RNA. Es repliquen en la cèl·lula hoste a través de la transcriptasa inversa per produir DNA de doble cadena que és incorporat al genoma de la cèl·lula hoste a través d'una integrasa, fet que permet una expressió contínua del gen d'interès en aquesta cèl·lula. Un dels retrovirus més utilitzats com a vector de transferència gènica és el *Murine Leukemia virus* (MLV), que és l'utilitzat en aquest treball. S'ha treballat, a més a més, amb virus defectius que no es poden replicar en la cèl·lula hoste.

Per a l'obtenció de retrovirus per generar una línia estable d'HepG2 per els shRNAs control (HepG2-shRNA control) o específic d'HMGCS2 (HepG2-shRNA HMGCS2) es va utilitzar la línia cel·lular *PhoenixTM-Ampho packaging*. Aquesta línia cel·lular deriva de la línia cel·lular HEK293T, de ronyó d'embrió humà, que ha estat

MATERIALS I MÈTODES

establement transfectada amb l'antigen T SV40 que permet la replicació episomal de plasmidis que tenen un origen de replicació SV40. Aquesta línia cel·lular té la peculiaritat de produir les proteïnes necessàries per la producció de retrovirus amfotròpics: *gag*, *pol* i *env*. Els virus amfotròpics poden infectar un ampli ventall de cèl·lules de mamífer.

Es van sembrar les cèl·lules aproximadament 15h abans de la transfecció a una densitat de 3×10^6 cèl./placa 100mm. El dia següent, es van transfectar 10µg de pRS-shRNA inespecífic, pRS-shRNA#59 o pN3GFP (com a control) amb el reactiu de transfecció Lipofectamina LTX seguint les instruccions de la casa comercial en medi de creixement sense antibiòtics. Es va canviar el medi 24h més tard i es cultivaren les cèl·lules a 33°C. Passades 48h, es recullí el medi que contenia els retrovirus produïts i es filtrà amb un filtre de 0.45µm (Whatman, Ref. 6896-2504) per descartar les restes cel·lulars. Aquest medi s'utilitzà per infectar les cèl·lules desitjades immediatament o es conservà a -80°C fins al moment de la infecció.

5.2. Infecció de cèl·lules amb retrovirus

Es sembraren cèl·lules HepG2 el dia previ a la infecció a una densitat de 2×10^6 cèl./placa de 100mm. S'infectaren amb el medi que contenia els virus, prèviament filtrat, de les cèl·lules empaquetadores prèviament transfectades. S'utilitzà el sobrenedant d'una placa de 100mm de cèl·lules empaquetadores per cada placa de 100mm d'HepG2. Per millorar l'eficiència d'infecció s'afegí Polybrene® a una concentració final de 4µg/mL. El dia següent, després de netejar les cèl·lules amb PBS1x, s'incubaren amb medi fresc. Tot el procés en el qual es van manipular retrovirus es va dur a terme en campana de flux laminar i laboratori de bioseguretat II.

5.3. Generació de línies estables

Després de 48h d'infecció les cèl·lules HepG2 es tripsinitzaren i es sembraren a diferents densitats (entre 5×10^5 i 1.5×10^6 cèl./placa de 100mm) i es començà la selecció amb puromicina 1µg/mL. Uns deu dies més tard, ja no hi havia cèl·lules vives en les plaques control, i en les plaques infectades van aparèixer clons. Es van deixar créixer fins que tenien uns 3mm de diàmetre i es van picar amb cilindres autoclavats de vidre

(Sigma, Ref. C1059-1EA). Posteriorment, es va procedir a la propagació i a la caracterització dels clons.

5.4. Transfecció de molècules siRNA

Una altra estratègia per regular a la baixa l'expressió d'una proteïna és la transfecció directament de molècules siRNA. En aquest treball es van utilitzar els *Specific siGENOME* o *On Target plus SMARTpool* de Thermo Scientific Dharmacon contra els gens humans *HMGCS2* (Ref. M-010179-01), *SIRT1* (T2004-01) o *PPAR α* (Ref. L-003434-00-0005). A més a més, com a control es va utilitzar *siGENOME Non-Targeting siRNA #1* (Ref. D-001210-01-05). Els siRNAs van ser ressuspesos en aigua a una concentració de 50 μ M, al·licotats i guardats a -20°C.

Les cèl·lules HepG2 es van sembrar el dia anterior a la transfecció a una densitat de 4x10⁵ cèl./pouet de MW6. El dia següent van ser transfectades amb el reactiu Dharmafect 4, recomanat per la transfecció eficient de siRNAs en aquesta línia cel·lular, seguint les instruccions de la casa comercial. Es va utilitzar una concentració final de 10nM d'siRNA. Les cèl·lules van ser recollides 72h post-transfecció i l'eficiència de regulació a la baixa va ser analitzada per *Western Blot* o per PCR quantitativa.

6. INFECCIÓ DE LES CÈL·LULES AMB ADENOVIRUS

Els adenovirus són una gran família de virus sense envolta cel·lular i amb DNA de doble cadena. 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 5-7 kb). 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.

6.1. Adenovirus utilitzats i protocol d'infecció

En el present treball s'han utilitzat diferents adenovirus recombinants (serotip 5, Ad5, ΔE1 ΔE3) per tal de sobreexpressar determinades proteïnes. A continuació es presenta la relació dels adenovirus utilitzats en el present treball.

<u>Adenovirus</u>	<u>Espècie</u>	<u>Procedència</u>
AdPPARα	Hommo sapiens	Lab. Dr. F. Villaroya (UB)
AdGFP		CBATEG-593a
AdHMGCS2 WT	Hommo sapiens	Mayordomo Tesi Doctoral 2007
AdHMGCS2 mut	Hommo sapiens	Mayordomo Tesi Doctoral 2007
Ad shRNA scrambled ¹		Vector Biolabs
Ad shRNA HMGCS2 ^{1,2}	Mus musculus	Vector Biolabs
AdFOXO1	Mus musculus	Dra A. Martínez Valverde/Dr. D. Accili

¹Els adenovirus van ser purificats per Vector Biolabs per tal de ser injectats *in vivo*. ²Els detalls de la construcció de l'Ad-shRNA HMGCS2 es mostren a l'apèndix.

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, les cèl·lules HepG2 van ser sembrades el dia anterior a la infecció i van ser infectades a una *multiplicity of infection* (MOI o pfu/cèl.) de 40 en medi de creixement. Les cèl·lules van ser recollides o assajades 48h després de la infecció.

6.2. Amplificació d'adenovirus

Els adenovirus es poden amplificar utilitzant la línia cel·lular HEK293. L'amplificació dels estocs virals consta de 4 passos:

1) Primera amplificació: es plaquejaren 1.5×10^6 cèl·lules HEK293 en un flascó de 25 cm² amb un volum final de 7 mL (DMEM 10% FBS). Passades 8-15 hores les cèl·lules es van infectar amb l'estoc viral de partida a una dosi de 1×10^7 pfu/mL. A les 24-30 hores ja s'observaren canvis morfològics (les cèl·lules estaven rodones i es començaven a desenganxar de la placa) degut a la infecció amb els virus, en aquest moment es recolliren les cèl·lules i es procedí a la lisi cel·lular mitjançant 4 cicles de congelació/descongelació en un bany de neu carbònica/etanol i en un bany d'aigua a

37°C. Seguidament es centrifugà 15 minuts a 5000 rpm i a 4°C per eliminar les restes cel·lulars, es recuperà el sobrenadant que contenia els adenovirus i es guardà a -80°C.

2) Segona amplificació: es plaquejaren 3.5×10^6 cèl·lules HEK293 en un flascó de 75 cm² amb un volum final de 15 mL (DMEM 10% FBS). Passades 8-15 hores les cèl·lules es van infectar amb 500 µL del producte de la primera amplificació. A les 24-30 hores ja s'observaren canvis morfològics degut a la infecció amb el virus, en aquest moment es recolliren les cèl·lules i es centrifugaren 10 minuts a 1500 rpm. El sediment cel·lular es va resuspendre en 10 mL i es procedí a la lisi cel·lular igual que en el pas anterior. Seguidament es centrifugà 15 minuts a 5000 rpm i a 4°C per eliminar les restes cel·lulars, es recuperà el sobrenadant que contenia els adenovirus i es guardà a -80°C.

3) Tercera amplificació: es repetí el procediment anterior però amb tres flascons de 75cm².

4) Quarta amplificació: es plaquejaren 3.5×10^6 cèl·lules Hek-293A en vint flascons de 75 cm² amb un volum final de 15 mL cadascun (DMEM 10% FBS). Passades 15 hores les cèl·lules es van infectar amb 100 µL del producte de la tercera amplificació. A les 24-30 hores ja s'observaren canvis morfològics degut a la infecció amb el virus, en aquest moment es recolliren les cèl·lules i es centrifugarem 10 minuts a 1500 rpm. Els *pellets* cel·lulars s'ajuntaren i resuspengueren en 3-5 mL i, seguidament, es procedí a la lisi cel·lular igual que en els passos anteriors, es centrifugà 15 minuts a 5000 rpm i a 4°C per eliminar les restes cel·lulars, es recuperà el sobrenadant que contenia els adenovirus. Es van fer alíquotes de 100 µL i es guardaren a -80°C.

6.3. Titulació dels adenovirus

La quantificació o titulació dels estocs virals és important per tal d'assegurar la reproducibilitat de les preparacions, així com per aconseguir nivells adequats d'expressió de la proteïna a sobreexpressar. Per a la titulació dels adenovirus es va utilitzar el *kit* comercial *Adeno X_{TM} Rapid Titer kit* (Clontech, Ref. K1653-1) i es va seguir les instruccions indicades per la casa comercial. Aquest mètode es basa en la immunodetecció de la proteïna viral *hexon* a la membrana de les cèl·lules infectades.

MATERIALS I MÈTODES

El càcul del títol de l'estoc víric s'obtingué contant al microscopi (objectiu 20x) el nombre de cèl·lules tenyides en almenys 3 camps visuals. L'aplicació de la següent fórmula ens donà el títol de l'adenovirus en pfu/mL:

$$\text{Títol (pfu/ml)} = [(\text{cèl·lules infectades/camp}) \times 594] / [0,1 \times \text{factor de dilució}]$$

V. ASSAJOS RADIOQUÍMICS

1. MESURA D'OXIDACIÓ DE PALMITAT

L'oxidació de palmitat sobre cèl·lules en cultiu es va realitzar segons el protocol descrit per García-Martínez *et al* (2005). Les cèl·lules HepG2 van ser sembrades en MW de 12 a una densitat de 2×10^5 cèl./pou. Al dia següent, van ser infectades amb els corresponents adenovirus durant 48h. La nit anterior a l'assaig, es van incubar les cèl·lules en medi d'oxidació no radioactiu (palmitat no radioactiu 0.5mM) durant 16h. L'assaig es va realitzar mitjançant la incubació de les cèl·lules en 0.5mL de medi d'oxidació radioactiu (mescla de palmitat fred i palmitat radioactiu) durant 2h a 37°C. La reacció es va aturar per addició de 125µL d'àcid perclòric 3M i el $^{14}\text{CO}_2$ va ser recollit mitjançant la col·locació de papers Whatmann prèviament tallats i mullats amb β-fenieltamina (Sigma, Ref. 27.100-8). Les plaques van ser sellades amb parafilm amb un pes de plom a sobre (per evitar la fuga del CO_2) durant 1h a 37°C. Posteriorment, es van deixar assecar els paperets, es van deixar en 5mL de líquid de centelleig tota la nit i van ser comptats *Liquid Scintillation Analyzer, Packard Tri-carb 2100 TR*.

Medi d'oxidació

DMEM sense ni glucosa ni piruvat (Invitrogen, Ref. 11966)	1x
Glucosa (Sigma, Ref. G7528)	3mM
Carnitina	200 µM
[^{14}C] Palmitat*	500µM (2.8µci/nmol)
BSA sense àcids grassos	0.1mM

*El palmitat es va preparar fresc a partir d'una solució de palmitat 25mM (en NaOH 30mM), que va ser incubada a 80°C durant 5min. Prèviament a la incubació de les cèl·lules, es va afegir la quantitat adequada de palmitat no radioactiu o la mescla radioactiva i es deixà durant 1h a 37°C en el medi d'oxidació per tal de permetre l'acomplexació del palmitat amb el BSA.

D'altra banda, els productes solubles en àcids formats es van determinar segons el protocol descrit per Zhou *et al* (2007). Es van recollir les cèl·lules i el medi de

cada pouet i es va neutralitzar durant 1h a 60°C amb KOH 0.5N. Després es va acidificar el medi mitjançant l'addició d'acetat sòdic 150mM i H₂SO₄ 0.3N. Després de centrifugar (4°C 10min 1000xg), es va extreure la fase aquosa amb metanol:cloroform 1:1. Es va expressar l'oxidació total de palmitat com la suma de nmols de palmitat oxidats per h per mg de proteïna convertits en CO₂ i en ASPs.

2. ASSAIG RADIOQUÍMIC PER MESURAR ACTIVITAT HMGCS2

2.1. Obtenció de mitocondris i diàlisi

L'obtenció de proteïna mitocondrial dels fetges de ratolins es va realitzar a partir d'un fragment d'aproximadament 1g que es va homogenitzar en 5mL de tampó d'homogenització suplementat amb còctel d'inhibidors de proteases i PMSF 0.1mM amb una Black&Decker amb un pistó de tefló durant 5-10". El teixit homogenitzat es va centrifugar (350xg, 10min, 4°C) i el sobrenedant obtingut es va tornar a centrifugar (15000xg, 15min, 4°C). El sediment es va netejar en tampó d'homogenització i es repetí la centrifugació anterior. El sediment de mitocondris es va ressuspendre en dos volums de tampó de ressuspenió (aproximadament 2mL).

Posteriorment, els mitocondris van ser dialitzats per tal d'eliminar els ions magnesi que inhibeixen l'activitat l'HMGCS2, amb *Dialysis sacks, avg. flat width 25 mm* (1.0 in) contra la solució de diàlisi 1:1000 durant tota la nit a 4°C i durant 6h més. Després de la diàlisi es va centrifugar a 14000rpm 3min 4°C i el sobrenedant va ser quantificat i guardat a -80°C.

Tampó d'homeització

Sacarosa	250mM
EDTA	0.1mM
Tris HCl pH 7.4	5mM

Tampó de ressuspenió

Tris HCl pH 8	100 mM
Tritó X-100	1.5%
Addició extemporània:	
DTT	0.4mM

MATERIALS I MÈTODES

Tampó de diàlisi (pH 7)

KH ₂ PO ₄	20 mM
EDTA	12mM

2.2. Assaig radioquímic d'HMGCS2

L'activitat HMGCS2 es va mesurar com la formació de HMG-CoA a partir d'acetoacetyl-CoA i acetyl-CoA radioactiu a 30°C durant 10min (Clinkenbeard *et al.*, 1975). La reacció es va iniciar per l'addició dels mitocondris i es va aturar 10min més tard per addició d'àcid perclòric 6N. Després d'incubar la reacció 2h a 100°C per tal d'evaporar [¹⁴C]acetyl-CoA residual, es van ressuspèndre els vials amb aigua i es va comptar en l'aparell *Liquid Scintillation Analyzer, Packard Tri-carb 2100 TR*. L'activitat s'expressa com nmols de HMG-CoA produïts per minut (mU) per mg de proteïna assajada.

Mescla de reacció

Tris HCl pH 8	100 mM
EDTA	1mM
Acetoacetyl-CoA	20 µM
[¹⁴ C] Acetyl-CoA	200µM (5000dpm/nmol)
Aigua	q.s.p 200µL

3. MESURA D'ACTIVITAT CPT TOTAL

L'activitat CPT va ser assajada pel mètode de l'intercanvi directe utilitzant L-[³H] carnitina (Bremer *et al.*, 1985). Les reaccions es van realitzar en un volum final de 500µL.

Les reaccions es van incubar a 30°C durant 3minuts a partir del moment que s'afegeixen els mitocondris (50µg) sobre la mescla de la reacció temperada i es van aturar amb 4mL d'àcid perclòric al 6%. Després de centrifugar les mostres (2000rpm, 5 min, 4°C), els sediments obtinguts van ser ressuspèsos en 1.6mL d'aigua. A continuació, es van afegir a cada tub 1mL de n-butanol per extreure el producte de la reacció [³H]palmitoïlcarnitina i 0.4mL d'àcids perclòric al 6%. Finalment, després de centrifugar les mostres 3min a 2000rpm es van contar 0.5mL de la fase no aquosa amb

líquid de centelleig. L'activitat s'expressa en nmols de carnitina per minut per mg de proteïna assajada.

Mescla de reacció

HEPES pH 7	20 mM
BSA lliure d'àcids grassos	1%
Palmitoil-CoA	80 μ M
L-[³ H] carnitina	200mM (5000dpm/nmol)
KCl	40-75mM

VI. EXPERIMENTACIÓ ANIMAL

1. INJECCIÓ D'ADENOVIRUS PER LA VENA CAUDAL

Per a la injecció dels adenovirus per la vena caudal es va preparar una mescla de 4×10^9 pfu/animal de cada adenovirus dissolt en sèrum fisiològic estèril en excés tenint en compte que en l'èmbol de la xeringa es perden gairebé 100 μ L.

Es van anestesiar el ratolins mascles C57BL6 amb isoflurà per via inhalatòria amb una dosi del 3%. Es va submergir la cua dels animals en aigua calenta per tal de dilatar la vena. Es va injectar un volum final de 100 μ L per animal amb una agulla de 25G. Els animals es van supervisar cada dia durant els 9 dies posteriors a la injecció. Passats els 9 dies, es van sotmetre a un dejuni de 24h abans de ser sacrificats. Els animals van ser sacrificats en el *zeitgeber time* (ZT) 3, és a dir tres hores després de l'inici de la fase llumínica.

2. CINÈTICA DEL DEJUNI

Es van utilitzar ratolins C57BL6 de 10 setmanes. Es van dividir en 4 grups experimentals amb 5 animals per grup: alimentats AL (sacrificats al ZT12, és a dir a l'inici de la fase fosca), dejunats 6h (sacrificats al ZT18), dejunats 15h (sacrificats al ZT3) i dejunats 24h (sacrificats al ZT12). Es va retirar l'aliment dels grups experimentals dejunats al ZT12.

3. OBTENCIÓ DEL SÈRUM

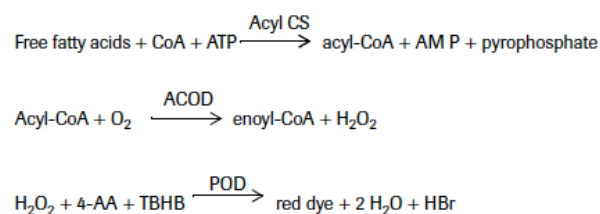
S'obtingué la sang per punció intracardíaca en el moment del sacrifici. Es deixà coagular la sang a temperatura ambient i posteriorment es centrifugà a 3000rpm durant 10min i el sobrenedant (sèrum) va ser guardat a 4°C fins a la determinació de cossos cetònics o àcids grassos lliures.

4. DETERMINACIÓ DE LA GLICÈMIA

La glicèmia dels animals es va determinar en el moment del sacrifici directament en sang cardíaca amb un glucòmetre *Ascensia Elite XL* (Bayer) amb les corresponents tires reactives Elite (Bayer, Ref. 3921C).

5. DETERMINACIÓ DE NEFAs EN SÈRUM

La determinació dels àcids gràcids lliures en sèrum es va dur a terme amb el *kit* comercial *Free fatty acids, Half-micro test* (Roche Diagnostics, Ref. 11383175001). El *kit* es basa en l'addició de l'enzim acil-CoA sintetasa, que en presència d'ATP i CoA transforma els àcids grassos lliures en acil-CoAs. Els acil-CoAs en presència d'oxigen per acció de l'acil-CoA oxidasa produeixen enoil-CoAs i H₂O₂. L'H₂O₂ produïda en presència de peroxidasa transforma l'àcid 2,4,6-tribromo-3-hidroxi-benzoic (TBHB) i 4-aminoantipirina (4-AA) en un colorant vermell que pot ser mesurat a una longitud d'ona de 546nm a 25°C.



Es va procedir seguint les especificacions de la casa comercial. Es va mesclar 100µL de la solució A (tampó fosfats pH 7.8, ATP, CoA, acil-CoA sintasa, ascorbat oxidasa, 4-AA) amb 5µL de sèrum. Es va deixar reaccionar 10min. S'afegiren 5µL de solució 3 que conté N-etil-maleinimida per tal de retirar l'excés de CoA. En aquest punt es mesurà l'absorbància de la mostra a la longitud d'ona indicada (A₁). Posteriorment, s'afegiren 5µL de la solució B (acil-CoA oxidasa) i es deixà reaccionar durant 15min a

25°C i es tornà a mesurar l'absorbància de les mostres (A_2). La concentració d'àcids grassos lliures en sèrum es van calcular segons la següent fórmula:

$$c \text{ (mM)} = 1.192 \times (A_2 - A_1)$$

6. DETERMINACIÓ DE COSSOS CETÒNICS

La determinació dels cossos cetònics totals (acetoacetat i β -hidroxibutirat) en sèrum es va realitzar amb el *kit* comercial *Autokit Total Ketones Bodies* (Wako, Ref. 415-73301 i 415-73401). El principi d'aquest kit es basa la mescla de la mostra amb l'enzim β -hidroxibutirat deshidrogenasa que en presència de NADH i tio-NAD⁺ provocaran reaccions cícliques en les quals l'acetoacetat es convertirà en β -hidroxibutirat i viceversa. En aquestes reaccions es produirà NAD⁺ i tio-NADH. La producció de tio-NAD⁺ es pot mesurar espectrofotomètricament a una longitud d'ona de 405nm. La mesura de cossos cetònics totals (acetoacetat i β -hidroxibutirat) es va determinar a partir de la velocitat de producció de tio-NAD⁺.

Es va realitzar la reacció en un volum final d'1mL. Es van mesclar 10 μ L de sèrum amb 630 μ L d'aigua i es col·locaren en una cubeta dins l'espectofotòmetre a 37°C. S'afegiren 270 μ L de solució R1 (tampó fosfats 20mM pH7, 4.27mM thio-NAD⁺) i es deixà atemperar a 37°C durant 5min. Passat aquest temps, s'afegiren 90 μ L de solució R2 (Tampó Good 0.2M pH 9.0, 3200 IU/mL β -hidroxibutirat deshidrogenasa i 2.65 mM NADH) i es mesurà l'absorbància (A_1) al cap de 3min es tornà a mesurar l'absorbància (A_2).

La variació d'absorbàncies ($\Delta A = A_2 - A_1$) correspon a la producció de tio-NAD⁺. Es feu una recta patró graficant el canvi d'absorbàncies (ΔA) corresponent a concentracions conegudes de β -hidroxibutirat (enlloc de sèrum). La concentració de cossos cetònics totals (AA i β -hidroxibutirat) s'expressa doncs en mM de β -hidroxibutirat (mM 3HB).

RESULTATS

I. EFECTE DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN *HMGCS2* SOBRE L'OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS I L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN CÈL·LULES HEPG2

1. L'EXPRESSIÓ DEL GEN *HMGCS2* ÉS NECESSÀRIA PER A LA INDUCCIÓ DE L'OXIDACIÓ DE PALMITAT MITJANÇADA PER PPAR α

En dejuni, els cossos cetònics són sintetitzats a partir de molècules d'acetil-CoA que provenen de la degradació activa d'àcids grassos (McGarry i Foster, 1980). Així doncs, la via de la β -oxidació ha d'estar activada perquè es produeixi la cetogènesi. I al contrari, existeixen evidències que suggereixen una inducció de l'oxidació d'àcids grassos per acció de la cetogènesi (Duée *et al.*, 1994; Ikeda i Tanaka, 1990; Le May *et al.*, 2000).

En aquest sentit, en el grup de recerca estem interessats en l'estudi del paper de l'*HMGCS2* sobre l'homeòstasi energètica, concretament en determinar si l'expressió del gen *HMGCS2* té un paper actiu en la regulació de l'oxidació dels àcids grassos. D'acord amb els antecedents existents, resultats previs del nostre grup, demostren com la sobreexpressió del gen *HMGCS2* en cèl·lules HepG2 provoca un increment de la cetogènesi i de l'oxidació de palmitat, que depèn de l'activat catalítica de l'enzim (veure figura 1 publicació annexa).

Amb l'objectiu d'estudiar el paper de l'*HMGCS2* sobre l'homeòstasi energètica i comprovar que efectivament la seva expressió té un paper actiu en la regulació de l'oxidació dels àcids grassos, vam dissenyar una estratègia de regulació a la baixa del gen *HMGCS2* en la línia cel·lular HepG2. Així, shRNAs específics contra el gen *HMGCS2* humà predissenyats (Origene) van ser testats per transfecció transitòria en la línia cel·lular HeLa juntament amb el plasmidi d'expressió d'*HMGCS2* humà. En el *Western Blot* de la figura R1, es mostra com l'shRNA#59 provoca una disminució de la proteïna *HMGCS2* humana transfectada pràcticament del 100%.

RESULTATS

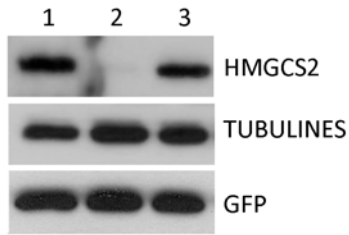


Figura R 1. Regulació a la baixa de la proteïna HMGCS2.

5µg d'extracte cru de cèl·lules HeLa cotransfectades amb el plasmidi d'expressió d'HMGCS2 humà i els plasmidis que expressen els shRNA inespecífic (1), #59 (2) o #58 (3), respectivament en una relació 1:2, es van resoldre en un gel d'acrilamida i es va realitzar un *Western Blot* amb els anticossos específics contra les proteïnes que s'indiquen. En tots els casos es va transfectar un plasmidi d'expressió de GFP com a control de transfecció.

A continuació, vam procedir a produir una línia estable per l'shRNA 59 (HepG2 shRNA 59) i una altra per l'shRNA inespecífic (HepG2 shRNA control) en la línia cel·lular HepG2, mitjançant la producció de retrovirus. En la línia cel·lular HepG2 shRNA control, la sobreexpressió de PPARα provoca una inducció dels nivells de proteïna HMGCS2 que no es produeix en la línia HepG2 shRNA 59 (Figura R2A). Assajos de β-oxidació amb palmitat radioactiu demostraren que, mentre que la sobreexpressió de PPARα indueix dues vegades la β-oxidació de palmitat en la línia HepG2 shRNA control, consistent amb resultats prèviament publicats (Hsu et al., 2001; Minnich et al., 2001), aquesta inducció es perd en la línia cel·lular HepG2 shRNA 59, on l'enzim HMGCS2 no s'expressa (Figura 2B).

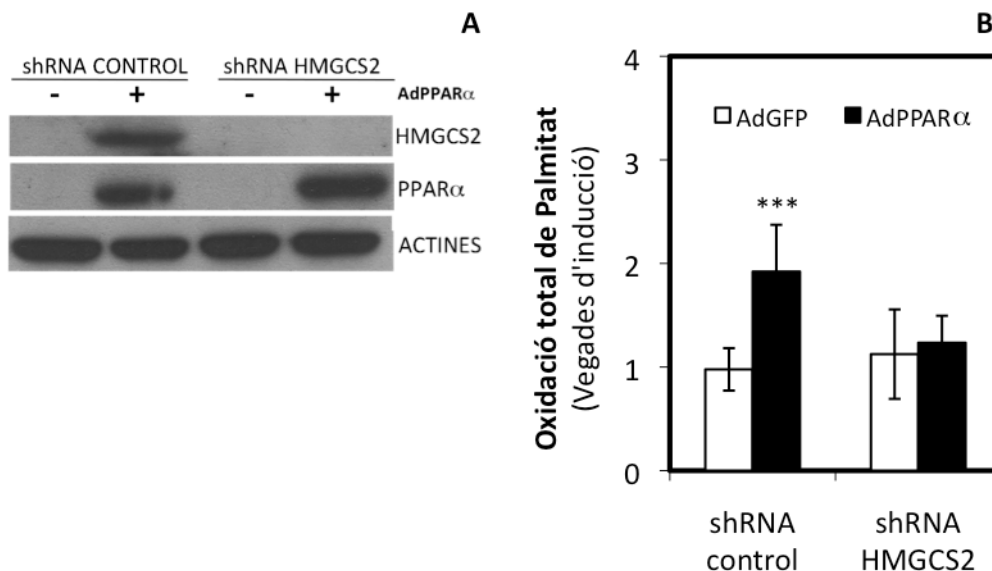


Figura R 2. L'expressió d'HMGCS2 és necessària per la inducció de la β-oxidació mitjançada per PPARα. Les línies cel·lulars HepG2 shRNA 59 i shRNA control van ser infectades els adenovirus GFP o PPARα amb una MOI de 40 durant 48h. **A)** *Western Blot* representatiu de 70µg d'extracte cru amb els anticossos específics indicats. **B)** Assaig d'oxidació de [¹⁴C]palmitat realitzat sobre les línies infectades amb els corresponents adenovirus durant 48h. Es mostra la mitjana de tres experiments independents realitzats per triplicat. ***p<0.001

Aquests resultats demostren que l'expressió d'HMGCS2 és suficient i necessària per la inducció de l'oxidació de palmitat mitjançada per PPAR α en HepG2, ja que quan l'HMGCS2 no s'expressa no s'indueix la β -oxidació per PPAR α .

2. HMGCS2 NO ACTUA COM A COACTIVADOR DE PPAR α

S'ha suggerit que l'HMGCS2 pot ser translocada al nucli en presència del factor de transcripció PPAR α , interaccionar amb aquest, i estimular l'activitat transcripcional del PPRE present en el seu promotor (Meertens *et al.*, 1998). En base a aquestes dades, vam comprovar si l'HMGCS2 podia actuar com a coactivador de PPAR α , estimulants així l'oxidació d'àcids grassos. Vam resoldre aquesta qüestió mitjançant tres aproximacions experimentals diferents: assajos d'activitat luciferasa amb construccions reporteres de gens diana de PPAR α i plasmidis d'expressió de PPAR α /RXR α i HMGCS2, experiments d'immunofluorescència de les proteïnes HMGCS2 i PPAR α i assajos de *GST-pull down*.

En primer lloc, mitjançant experiments de transfecció transitòria en cèl·lules HepG2, vam analitzar l'activitat promotora del gen *HMGCS2* i d'un altre gen diana de PPAR α , *CPT1A* (Napal *et al.*, 2005) en resposta a l'heterodímer PPAR α /RXR α , en presència o absència d'HMGCS2. Com mostra la figura R3, la transfecció de l'heterodímer PPAR α /RXR α incrementa l'activitat transcripcional dels promotors *CPT1A* i *HMGCS2* humans quatre i vuit vegades respectivament (barres 1 i 5). En cap cas, la cotransfecció de l'heterodímer amb un plasmidi d'expressió de l'HMGCS2 humà modifica l'efecte de PPAR α sobre aquests promotors (barres 3 i 7).

Durant la realització d'aquesta tesi doctoral, es va publicar un treball que descriu que la proteïna HMGCS2 pot ser palmitoilada en el seu centre catalític, fet que permet la interacció amb PPAR α i l'activació transcripcional del seu propi element de resposta a PPAR (Kostiuk *et al.*, 2010). Per això, vam tractar les cèl·lules HepG2 transfectades amb palmitat 0.5mM durant 16h que, un cop convertit en palmitoil-CoA per acció de les acil-CoA sintetases, promouria la palmitoilació descrita per HMGCS2. En la figura R3, es pot veure com aquest tractament, tot i que induïx l'activitat

RESULTATS

transcripcional de PPAR α sobre ambdós promotors, tampoc produeix un efecte coactivador per part de l'HMGCS2 (barres negres 4 i 8).

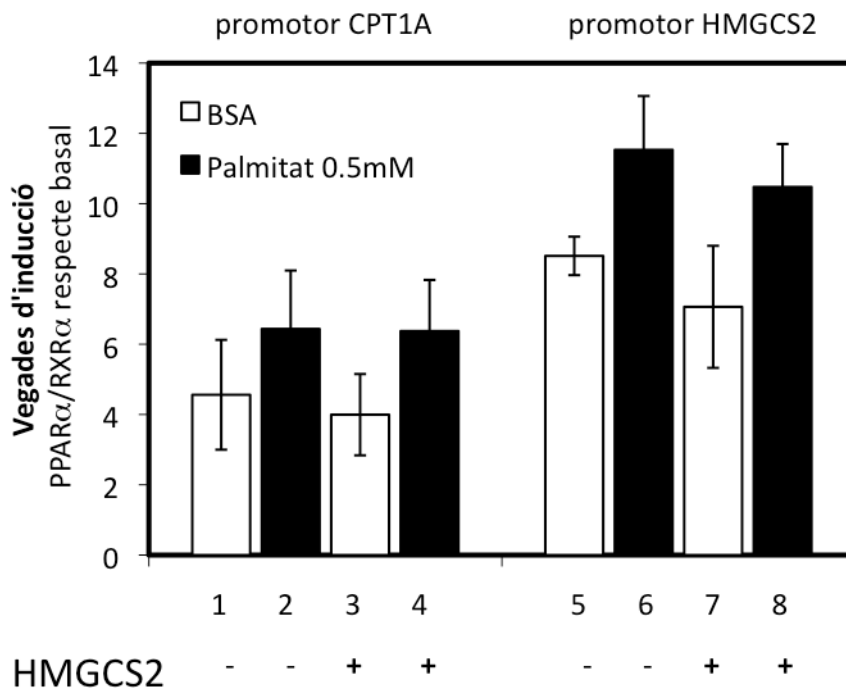


Figura R 3. La cotransfecció d'HMGCS2 no incrementa la transactivació de PPAR α . Transfeccions transitòries en HepG2 dels promotors humans HMGCS2 i CPT1A amb l'heterodímer PPAR α /RXR α (tots els punts) i un plasmidi d'expressió d'HMGCS2 humà (barres 3,4, 7 i 8) en presència o absència de palmitat. Es mostren les vegades d'inducció de l'activitat promotora (activitat luciferasa normalitzada per renilla) en presència de l'heterodímer PPAR α /RXR α respecte de l'activitat basal del promotor, en absència (barres blanques) o en presència (barres negres) del tractament amb palmitat (0.5 mM, 16h). Es mostra la mitjana \pm desviació estàndard de tres experiments independents realitzats per duplicat.

Amb l'avantatge que la sobreexpressió de PPAR α provoca la inducció endògena d'HMGCS2 en HepG2, vam realitzar experiments d'immunofluorescència per tal de determinar la seva localització subcel·lular i la possible colocalització amb PPAR α . Així, vam infectar cèl·lules HepG2 durant 48h amb un adenovirus control que no interferís amb la detecció de la fluorescència (AdLacZ) i amb l'adenovirus PPAR α . Tot i que els nivells de proteïna HMGCS2 no són detectables en condicions basals, la sobreexpressió de PPAR α induïx l'expressió del gen *HMGCS2*, incrementant els nivells de proteïna (vermell). A nivell subcel·lular, l'enzim HMGCS2 presenta una localització mitocondrial, mentre que PPAR α es troba en el nucli de les cèl·lules (verd) (Figura R4).

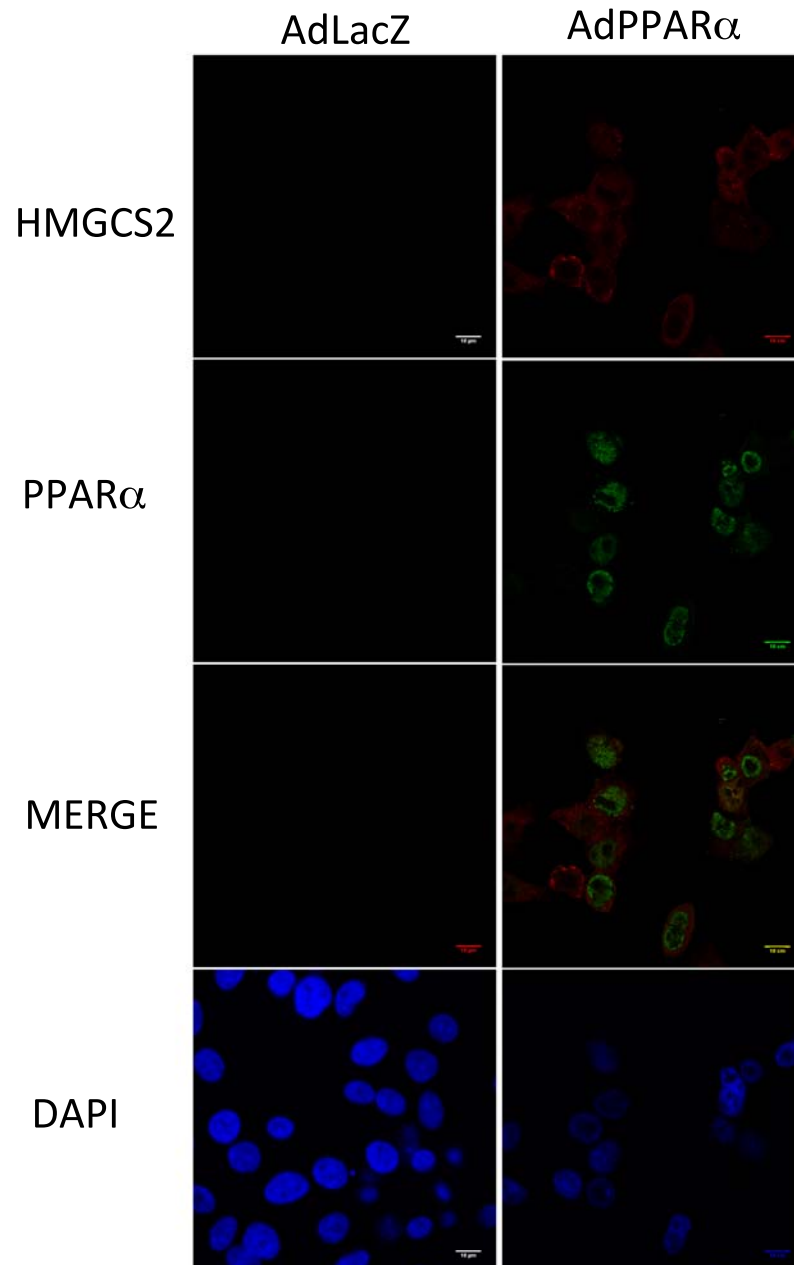


Figura R 4. Immunofluorescència realitzada sobre cèl·lules HepG2 infectades amb AdLacZ o AdPPAR α . Cèl·lules HepG2 van ser infectades amb una MOI de 40 durant 48h amb els adenovirus indicats. Es va realitzar la immunofluorescència sobre les cèl·lules amb els anticossos primaris d'HMGCS2 i PPAR α i els anticossos secundaris AlexaFluor chicken anti-rabbit 647 (vermell) i AlexaFluor donkey anti-goat 488 (verd) respectivament. En els quadres *merge* es mostra la sobreposició del senyal dels dos fluoròfors.

Aquests resultats mostren que les proteïnes HMGCS2 i PPAR α no co-localitzen, demostrant, per tant, que les observacions de Meertens *et al* no es confirmen per la proteïna HMGCS2 endògena en la línia cel·lular hepàtica HepG2.

RESULTATS

Finalment, vam comprovar si la proteïna HMGCS2 sobreexpressada en les cèl·lules HepG2 era capaç d'interaccionar amb una proteïna de fusió GST-PPAR α i si aquesta unió depenia de la palmitoilació del centre catalític de l'enzim. Així, vam realitzar un assaig d'unió (*GST-pull down*) entre la proteïna de fusió GST-PPAR α i un extracte cru obtingut de cèl·lules HepG2 infectades amb un adenovirus control (AdGFP), un adenovirus que codifica per la forma *wild type* del gen *HMGCS2* (AdHMGCS2 WT) i un adenovirus que codifica per la forma catalíticament inactiva de la proteïna (AdHMGCS2 MUT), en presència o absència de palmitat (0.5mM 16h). Com s'observa a la figura R5, en aquestes condicions, no es detecta interacció entre la proteïna de fusió GST-PPAR α i la proteïna HMGCS2 sobreexpressada en cèl·lules HepG2. Com a control positiu de l'assaig d'unió, vam realitzar un *Western blot* d'una part de la reacció d'unió contra RXR α , l'heterodímer de PPAR α .

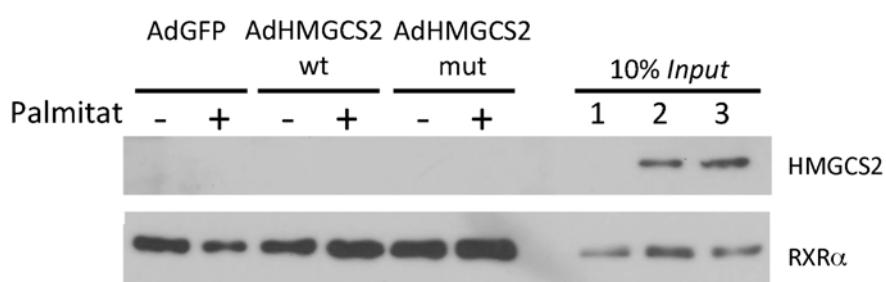


Figura R 5. Assaig d'unió de la proteïna de fusió GST-PPAR α amb la proteïna HMGCS2 sobreexpressada en cèl·lules HepG2. Les cèl·lules HepG2 van ser infectades amb l'adenovirus control (AdGFP), l'adenovirus que codifica per l'HMGCS2 *wild type* (AdHMGCS2 WT) o l'adenovirus que codifica per l'HMGCS2 catalíticament inactiva (AdHMGCS2 MUT) amb una MOI de 40. 48h després de la infecció es va obtenir l'extracte cru (250 μ g) que va ser utilitzar per la reacció d'unió amb 15 μ g de GST-PPAR α . En els *inputs* es mostra el 10% de l'extracte cru que es va utilitzar per la reacció d'unió on 1: AdGFP, 2: AdHMGCS2 wt i 3: AdHMGCS2 mut.

En conjunt, aquests resultats indiquen que la proteïna HMGCS2 no actua com a coactivador de PPAR α en la inducció de la β -oxidació d'àcids grassos, ja que ambdues proteïnes no interaccionen en la línia cel·lular HepG2.

3. HMGCS2 MODULA L'EXPRESSIONI DEL GEN DIANA DE PPAR α FGF21

Donat que el gen *HMGCS2* afecta l'oxidació dels àcids grassos mitjançada per PPAR α , ens vam plantejar si l'expressió d'alguns dels gens diana de PPAR α es veia afectada per l'expressió del gen *HMGCS2*. En concret, vam analitzar l'expressió del gen

FGF21, que s'ha descrit com un gen diana de PPAR α i com un gen implicat en la cetogènesi (Badman *et al.*, 2007; Hotta *et al.*, 2009; Potthoff *et al.*, 2009), en la línia cel·lular HepG2, mitjançant aproximacions de regulació a la baixa i de sobreexpressió de l'HMGCS2.

Com es pot veure a la figura R6A, quan es regula a la baixa l'expressió d'HMGCS2 mitjançant la transfecció transitòria d'un siRNA específic, es produeix una disminució d'un 50% en l'expressió del gen *FGF21* en condicions basals (cèl·lules infectades amb l'adenovirus control GFP, barres blanques); i sobre la inducció per PPAR α (cèl·lules infectades amb l'adenovirus de PPAR α , barres negres). En canvi, no s'observa un efecte significatiu en un altre gen diana de PPAR α també important per l'oxidació dels àcids grassos com és la *CPT1A* (Figura R 6B). La regulació a la baixa d'HMGCS2 va ser analitzada per PCR quantitativa i va ser del 70%.

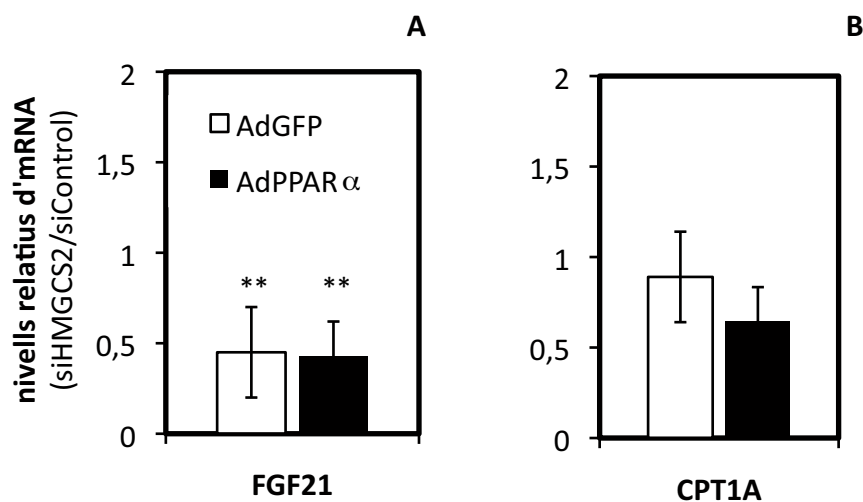


Figura R 6. Efecte de l'expressió de l'HMGCS2 sobre els gens *FGF21* i *CPT1A* en absència o presència de PPAR α . PCR quantitativa amb una sonda específica d'*FGF21* humà (A) o *CPT1A* humà (B) de cDNA obtingut de cèl·lules HepG2 transfectades amb un siRNA control o un siRNA específic contra HMGCS2 i posteriorment infectades 48h amb els adenovirus control (AdGFP, barres blanques) o l'adenovirus que codifica per PPAR α (AdPPAR α , barres negres). Es mostren els nivells d'mRNA relatius de cada gen, expressats com el ràtio de l'expressió de les cèl·lules transfectades amb el siRNA específic d'HMGCS2 respecte les cèl·lules transfectades amb el siRNA control per cada condició. Els resultats mostren la mitjana d'un mínim de tres experiments independents \pm la desviació estàndard. ** $p < 0.01$.

Per aprofundir en aquesta regulació, vam analitzar l'efecte de la sobreexpressió del gen *HMGCS2* sobre els nivells d'mRNA d'*FGF21*. Com s'observa a la figura R7A, la sobreexpressió d'HMGCS2 provoca un increment significatiu de l'expressió d'*FGF21* en aquesta línia cel·lular, i aquesta inducció depèn de l'activitat catalítica de l'enzim.

RESULTATS

A més a més, com mostra la figura R7B, aquest efecte no es produeix sobre altres gens diana de PPAR α , com *CPT1A* o el propi *PPAR α* (Rakhshandehroo *et al.*, 2010).

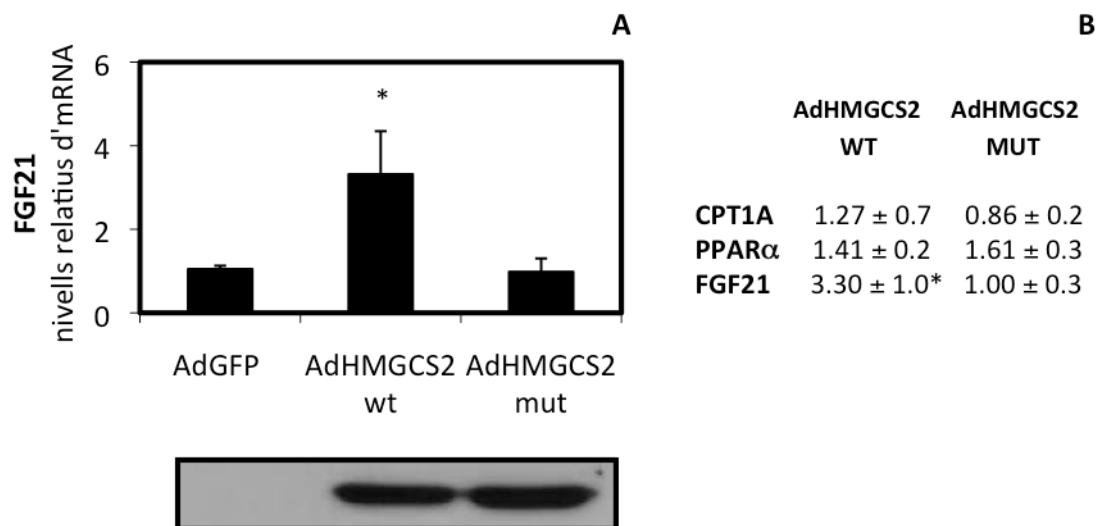


Figura R 7. Efecte de la sobreexpressió d'HMGCS2 sobre l'expressió de gens diana de PPAR α . PCR quantitativa amb una sonda específica de FGF21 humà (A), CPT1A o PPAR α humà (B) de cDNA obtingut de cèl·lules HepG2 infectades amb una MOI de 40 durant 48h amb l'adenovirus control (AdGFP), l'adenovirus que codifica per l'HMGCS2 *wild type* (AdHMGCS2 WT) i l'adenovirus que codifica per l'HMGCS2 catalíticament inactiva (AdHMGCS2 MUT). La part inferior de la figura A mostra un *Western Blot* contra la proteïna HMGCS2 que demostra la correcta sobreexpressió del gen HMGCS2 i que les quantitats de proteïna HMGCS2 són similars. Els resultats expressen la mitjana d'un mínim de 3 experiments independents \pm la desviació estàndard.* $p < 0.05$

Aquests resultats demostren que l'expressió del gen *HMGCS2* té un paper actiu i específic en la regulació de l'expressió del gen *FGF21*, ja que la regulació a la baixa d'HMGCS2 comporta una reducció dels nivells d'mRNA d'FGF21 mentre que la sobreexpressió d'HMGCS2 es tradueix en una inducció d'aquests nivells. Aquesta regulació és alhora específica sobre el gen *FGF21* i no s'observa en altres gens diana de PPAR α (*CPT1A*, PPAR α).

4. L'HMGCS2, A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓ D'ACETOACETAT, MODULA L'EXPRESSIÓ D'FGF21 PER UN MECANISME QUE DEPÈN DE SIRT1

Degut a què l'efecte d'HMGCS2 sobre els nivells d'expressió d'FGF21 depèn de l'activitat catalítica de l'enzim, vam analitzar si el tractament amb cossos cetònics, acetoacetat i β -hidroxibutirat, era capaç de reproduir aquesta inducció. Així, varem

tractar cèl·lules HepG2 amb concentracions creixents d'acetoacetat i β -hidroxibutirat. Com s'observa a la figura R8, només la forma oxidada del parell de cossos cetònics (acetoacetat) indueix l'expressió de FGF21 d'una manera dosi dependent.

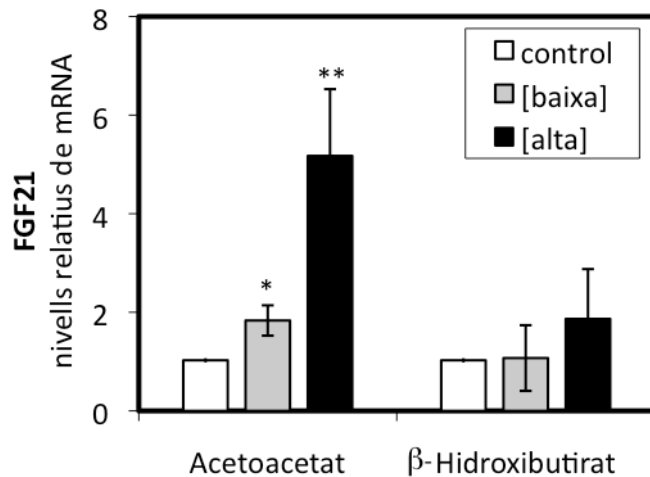


Figura R 8. Efecte del tractament amb cossos cetònics sobre l'expressió d'FGF21. PCR quantitativa amb una sonda específica d'FGF21 humana de cDNA de cèl·lules HepG2 tractades amb concentracions baixes (1mM d'acetoacetat i 2mM de β -hidroxibutirat) o altes (10mM d'acetoacetat, 20mM de β -hidroxibutirat) de cossos cetònics durant 5h. Es mostra la mitjana de tres experiments independents \pm la desviació estàndard.* $p < 0.05$,** $p < 0.01$

Per explicar aquests resultats, cal mencionar que l'etapa final de la cetogènesi (figura I2) consisteix en la conversió d'acetoacetat en β -hidroxibutirat produint molècules de NAD^+ per acció de la β -hidroxibutirat deshidrogenasa mitocondrial (McGarry i Foster, 1980). Tot i que aquest enzim es localitza principalment al mitocondri, recentment, s'ha descrit un isotip citosòlic en humans d'aquest enzim (Guo *et al.*, 2006).

D'altra banda, s'ha vist que l'eliminació específica en fetge del gen *SIRT1*, provoca alteracions en la senyalització de gens diana de $\text{PPAR}\alpha$, així com de l'oxidació d'àcids grassos (Purushotham *et al.*, 2009b). En aquest sentit i per tal d'estudiar el mecanisme pel qual l'HMGCS2 regula l'expressió d'FGF21, vam plantejar-nos que el diferent efecte sobre l'expressió d'FGF21 de l'acetoacetat (la forma oxidada dels cossos cetònics) respecte el β -hidroxibutirat (la forma reduïda) podria ser degut a un canvi en la relació $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ intracel·lular que modificaria l'activitat de SIRT1.

Per demostrar aquesta hipòtesi, vam regular a la baixa l'expressió de SIRT1 mitjançant la transfecció transitòria d'un siRNA específic i vam analitzar els nivells d'mRNA d'FGF21 en cèl·lules HepG2. Com mostra la figura R9A, la inducció de

RESULTATS

l'expressió del gen *FGF21* mitjançada per l'acetoacetat es perd completament quan l'expressió de SIRT1 és regulada a la baixa. A la figura R9B es mostra un *Western Blot* representatiu que demostra que l'acetoacetat no afecta als nivells de proteïna de SIRT1 i que la regulació a la baixa ha funcionat correctament.

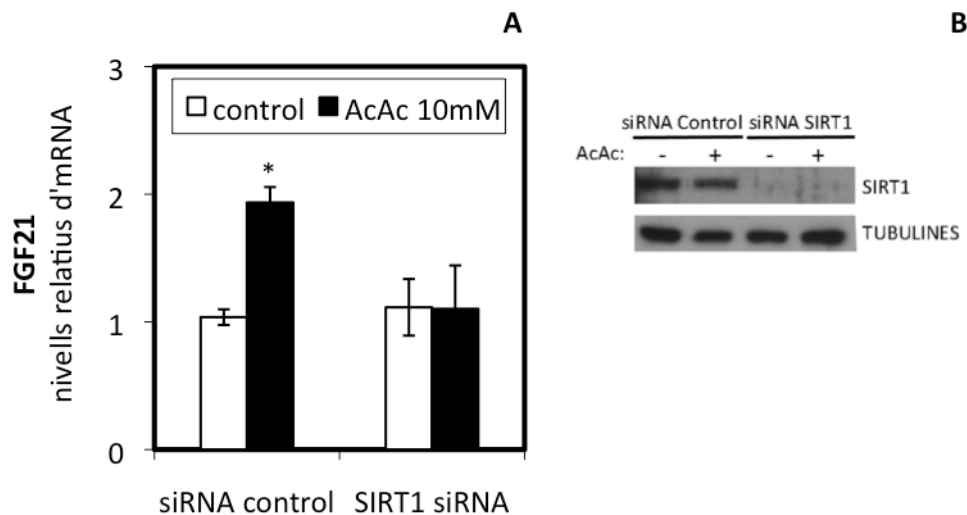


Figura R 9. Efecte de SIRT1 sobre la inducció de FGF21 pel tractament amb acetoacetat. PCR quantitativa amb una sonda específica d'FGF21 humà de cDNA de cèl·lules HepG2 tractades o no amb acetoacetat 10mM durant 5h en medi de manteniment, prèviament transfectades amb el siRNA control o siRNA específic contra SIRT1 durant 67h (A). *Western Blot* representatiu contra SIRT1 i tubulina com a control de càrrega (B). Es mostra la mitjana de 3 experiments independents \pm desviació estàndard. * $p < 0.05$

Aquest resultat demostra que l'efecte de l'acetoacetat sobre l'expressió del gen *FGF21* depèn de l'expressió de SIRT1 i suggereix, per tant, que l'HMGCS2 regula l'expressió del gen *FGF21*, a través de la producció d'acetoacetat, per un mecanisme dependent de SIRT1.

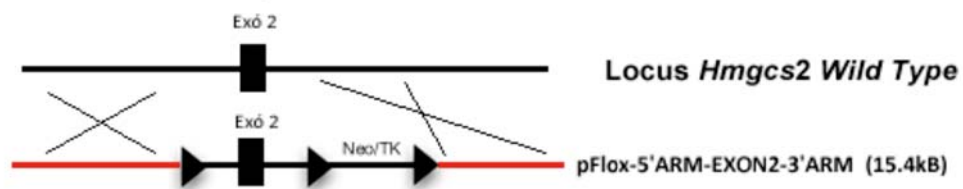
II. GENERACIÓ D'UN *KNOCKOUT* TEIXIT ESPECÍFIC DEL GEN *Hmgcs2*

Per tal de confirmar els resultats obtinguts en cèl·lules en cultiu i per tal d'aprofundir en el paper de l'HMGCS2 i dels cossos cetònics en l'homeòstasi energètica, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral era la generació d'un ratolí *knockout* teixit específic.

Vam triar l'estratègia *site specific gene targeting*, mitjançant la qual s'aconsegueix modificar específicament la regió genòmica diana (Capecchi, 1989a, b). Aquesta estratègia implica la utilització de l'enzim Cre recombinasa aïllat del bacteriòfag T1 que reconeix dues seqüències loxP de 34pb cadascuna que flanquegen la regió diana. Quan aquestes seqüències es troben en la mateixa direcció, la seqüència de DNA compresa entre elles és escindida per l'enzim Cre recombinasa (Sauer i Henderson, 1988).

A continuació es mostra un esquema de les diferents etapes del procés (Figura R10):

1. Generar construcció i electroporar en cèl·lules mare embrionàries



2. Eliminació del gen de selecció



3. Generació de knockout teixit específic



Figura R 10. Esquema de les fases del projecte de generació d'un ratolí knockout específic d'HMGCS2. Es mostra l'estructura genòmica del gen *Hmgcs2* (WT), l'estructura genòmica esperada quan tingui lloc la recombinació homòloga en cèl·lules mare embrionàries que encara tindrà el gen de selecció (*Targeted*), l'estructura genòmica després d'eliminar el gen de selecció (*Floxed*), i finalment l'estructura genòmica amb l'exó 2 delectat després de creuar els animals amb animals que expressin CRE sota un promotor teixit específic. En vermell es mostren els braços de recombinació homòloga 5' i 3'.

Aquest projecte es va dur a terme en col·laboració amb el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica de la Universitat Autònoma de Barcelona (CBATEG). La generació de la construcció pFlox-5'ARM-EXON2-3'ARM, l'estratègia de

RESULTATS

genotipació i la pròpia genotipació es van realitzar al nostre laboratori. El procés d'electroporació en cèl·lules mare embrionàries, la selecció i la propagació dels clons responents es va dur a terme al CBATEG.

1. GENERACIÓ DE LA CONSTRUCCIÓ PFLOX-5'ARM-EXON2-3'ARM

El primer pas d'aquest projecte va ser dissenyar una construcció que pogués ser electroporada en cèl·lules mare embrionàries de ratolí i modificar l'estructura genòmica del gen *Hmgcs2*. Vam decidir utilitzar un vector de substitució que permet el clonatge de la regió gènica que es vol modificar entre dos llocs loxP i la introducció de dos braços d'homologia a 5' i a 3' que permetran la recombinació homòloga entre la construcció i la seqüència genòmica present en les cèl·lules mare embrionàries, modificant així el locus genòmic *wild type* (Figura R 10).

Per realitzar el clonatge vam utilitzar el plasmidi pFLOX que conté dues seqüències loxP amb un lloc de clonatge entremig i dos llocs de clonatge a 5' i 3' d'aquestes seqüències (Chui *et al.*, 1997). Vam dissenyar dos braços d'homologia un 5' i un 3' de 4kb i 3.4kb respectivament. Aquestes seqüències van ser amplificades a partir de DNA genòmic de la soca de ratolí 129SvEv (soca de les cèl·lules mare embrionàries on es produiria la recombinació homòloga) i clonades en els llocs pertinents del vector per tal que tinguessin la màxima identitat amb les seqüències amb les quals han de ser recombinades.

D'altra banda, vam situar l'exó 2 del gen *Hmgcs2* entre les dues seqüències loxP, ja que aquest exó conté el centre catalític de l'enzim i a més a més, la seva escissió provoca la pèrdua del marc obert de lectura de la proteïna. Així, l'exó 2 amb unes petites regions intròniques a 5' i a 3' (1.5kb en total) va ser amplificat també a partir de DNA genòmic isogènic a les cèl·lules mare embrionàries de destí i clonat en el vector pFLOX en el lloc corresponent. La figura R11 mostra l'esquema de la construcció obtinguda en col·laboració amb *GenScript Corporation* (Piscataway, NJ) que, després de ser linearitzada, va ser enviada al CBATEG on va ser electroporada en cèl·lules mare embrionàries.

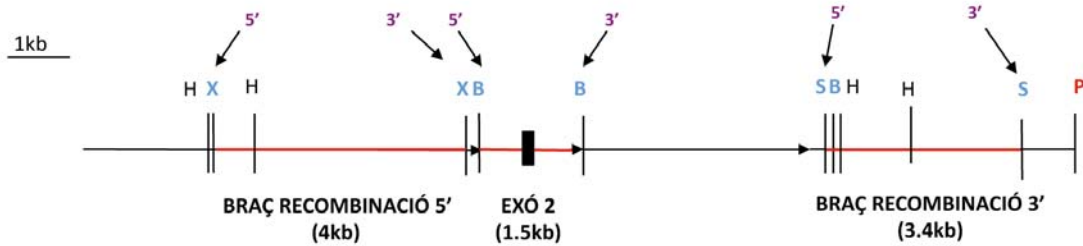


Figura R 11. Esquema de la construcció generada pFLOX-5'ARM-EXON2-3'ARM. En vermell es mostren els fragments de DNA que s'han introduït en el plasmidi pFLOX. Es mostren les dianes de clonatge en blau (X: XhoI, S: Sall, B: BamHI), la diana utilitzada per linearitzar el vector de 15.4kb en vermell (P: PdxI) i la diana utilitzada pel patró de restricció en negre (H: HindIII).

2. ANÀLISI DELS CLONS DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES

El CBATEG ens va enviar un total de 365 clons resistents a l'antibiòtic de selecció neomicina. Així, vam obtenir DNA genòmic dels clons i vam procedir a analitzar-los per PCR segons l'estratègia que es mostra en la figura R12.

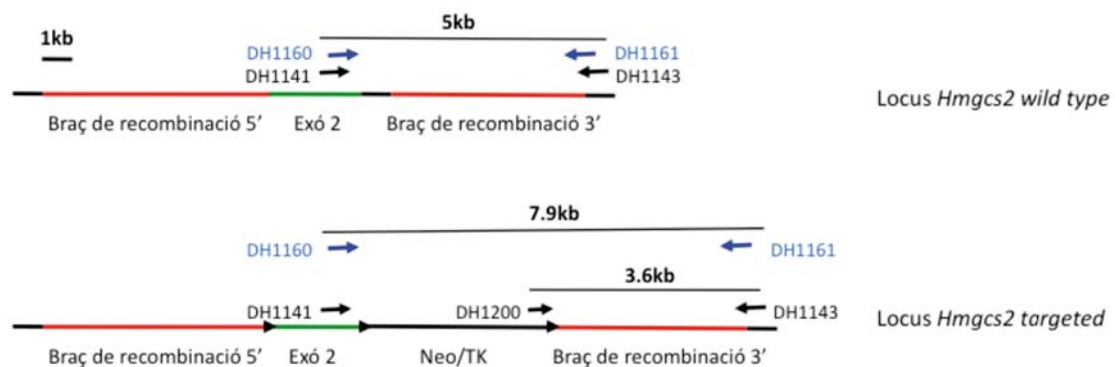


Figura R 12. Estratègia de genotipació per PCR. Esquema de la situació dels oligonucleòtids emprats, així com la mida de les bandes esperades en cada cas. Els oligonucleòtids en blau van ser utilitzats per la PCR *nested*. En vermell s'indiquen els braços de recombinació, en verd, el fragment corresponent a l'exó 2 i en negre la seqüència genòmica *wild type*.

En primer lloc vam analitzar la correcta inserció de la regió 3' de la construcció. Per això vam utilitzar el parell d'oligonucleòtids DH1141 (situat a l'exó 2) i DH1143 (situat fora de la construcció generada). Donat que alguns clons no donaven cap banda vam dissenyar un *nested* PCR amb el parell d'oligonucleòtids DH1160 i DH1161 per tal d'amplificar-los. En total, es van amplificar el 80.2% dels clons, donant tots una única banda de 5kb corresponent a la seqüència *wild type*. En cap cas, es va observar una

RESULTATS

segona banda de 7.9kb, que correspondria a l'estructura genòmica esperada si la recombinació homòloga hagués tingut lloc correctament (construcció *targeted*).

En vista d'aquests resultats, vam decidir analitzar els clons amb el parell d'oligonucleòtids DH1200 (situat en el gen de selecció de la construcció) i DH1143, on esperaríem una única banda de 3.6kb. En cap dels clons assajats es va amplificar el fregment esperat, indicant que no havien integrat la construcció en el lloc correcte del genoma.

A partir d'aquestes dades podem concloure que utilitzant la nostra construcció no ha tingut lloc la recombinació homòloga. Fins a aquest any, els consorcis internacionals que tenen per objectiu mutar tots els gens del genoma de ratolí que codifiquen per proteïnes no han tingut cap clon positiu pel gen *Hmgcs2*, malgrat que han electroporat dues construccions similars a la nostra.

III. REGULACIÓ A LA BAIXA DEL GEN *Hmgcs2* DE FORMA AGUDA EN FETGE

1. GENERACIÓ D'UN ADENOVIRUS QUE CODIFICA PER UN shRNA ESPECÍFIC D'HMGCS2 DE RATOLÍ

Davant la manca de recombinació homòloga en la generació del ratolí *knockout* pel gen *Hmgcs2*, ens vam proposar una estratègia alternativa: la construcció d'un adenovirus que codifiqués per un shRNA específic contra HMGCS2 de ratolí que pogués ser injectada a un animal *wild type*, produint una regulació a la baixa de forma aguda *in vivo*.

En primer lloc, vam testar una bateria d'shRNA contra l'HMGCS2 de ratolí (Origene) per transfecció transitòria en cèl·lules HEK293. Es va clonar l'*Hmgcs2* de ratolí a partir de cDNA de ratolins C57BL6, i mitjançant la cotransfecció transitòria dels plasmidis codificants pels diferents shRNA juntament el plasmidi d'expressió de l'HMGCS2 de ratolí, vam poder comprovar que l'shRNA#78 provoca la desaparició total de la proteïna transfectada (Figura R13).

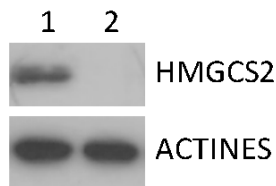


Figura R 13. Regulació a la baixa de HMGCS2 de ratolí. Es mostra un *Western Blot* amb els anticossos indicats de 10 μ g d'extracte cru de cèl·lules HEK293 co-transfectades amb una relació 1:4 del plasmidi d'expressió d'HMGCS2 de ratolí i el plasmidi que expressa l'shRNA inespecífic (1) i l'shRNA#78 (2).

D'acord amb aquest resultat, vam procedir al clonatge de la seqüència de l'shRNA#78 en el vector llançador *Dual basic EGFP* sota el control del promotor U6 per tal de construir un adenovirus (veure apèndix per detalls). En col·laboració amb *Vector Biolabs* (Philadelphia, PA) van ser produïts, amplificats i purificats un adenovirus que codificava per l'shRNA control (inespecífic) i un altre que codificava per l'shRNA de l'HMGCS2 per tal de ser injectats a ratolins *wild-type*.

2. LA INJECCIÓ D'ADENOVIRUS QUE CODIFIQUEN PER UN shRNA ESPECÍFIC DISMINUEIX ELS NIVELLS HEPÀTICS DE PROTEÏNA I D'ACTIVITAT HMGCS2.

Un cop disposàvem dels adenovirus corresponents, vam injectar ratolins C57BL6 de 9 setmanes per la vena caudal amb una dosi de 4×10^9 pfu/animal. Després de 9 dies de la injecció, vam dejunar els animals 24h i els vam sacrificar, obtenint-ne el sèrum, mitocondris frescos dels fetges i congelant la resta de fetge per posteriors anàlisis. A partir d'aquest moment s'anomenen els ratolins injectats amb l'adenovirus que codifiquen pel shRNA inespecífic (ratolins shRNA inespecífic) i amb l'shRNA específic contra HMGCS2 (ratolins shRNA HMGCS2).

La figura R14 mostra com la injecció amb l'shRNA específic contra HMGCS2 provoca una disminució significativa de la proteïna HMGCS2 en els ratolins respecte la injecció amb l'shRNA inespecífic. El fet que els adenovirus coexpressin la proteïna verda fluorescent (GFP) juntament amb els shRNAs ens va permetre comprovar la correcta infecció dels fetges. Així, en els animals 1 i 2 del grup shRNA inespecífic i en l'animal 2 del grup shRNA HMGCS2 no es detecta GFP per *Western Blot* i això es correspon amb uns nivells de proteïna HMGCS2 elevats.

RESULTATS

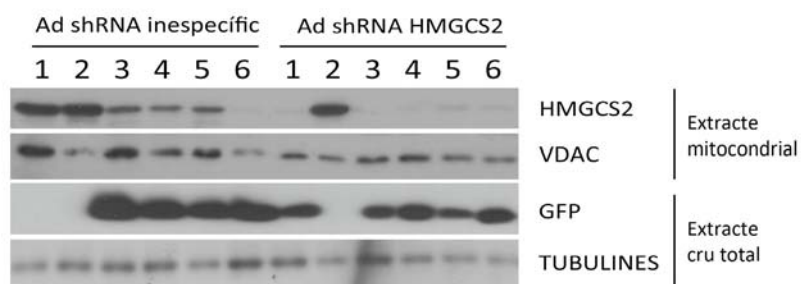


Figura R 14. Anàlisi de l'eficiència de la injecció i infecció en els fetges dels animals. *Western Blot* amb els anticossos indicats de 5 μ g d'extracte mitocondrial hepàtic o d'extracte cru total de ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. VDAC: *Voltage-dependent anion channel* com a control de càrrega mitocondrial; GFP: com a control d'infecció; Tubulines: com a control de càrrega de l'extracte cru total.

A més a més, aquesta disminució dels nivells de proteïna HMGCS2 es correlaciona amb una disminució de l'activitat HMGCS2 assajada en els mitocondris obtinguts i dialitzats de fetge dels ratolins (Figura R15).

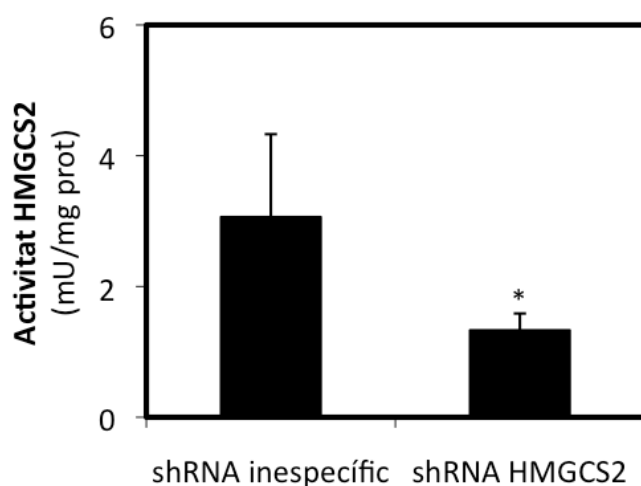


Figura R 15. Activitat enzimàtica HMGCS2 hepàtica de ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. Es van aïllar mitocondris dels homogenats hepàtics de ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2 i es va determinar l'activitat enzimàtica HMGCS2. Es mostra la mitjana de 5 animals per grup \pm desviació estàndard.* $p < 0.05$

3. LA REGULACIÓ A LA BAIXA D'HMGCS2 EN FETGE PROVOCA UNA DISMINUCIÓ DELS NIVELLS DE COSSOS CETÒNICS CIRCULANTS DEL 25%

Donat que havíem reduït significativament l'activitat HMGCS2 hepàtica en els ratolins shRNA HMGCS2, vam analitzar si aquesta disminució es correlacionava amb una disminució dels cossos cetònics circulants. Per això vam obtenir el sèrum dels animals injectats i vam determinar els nivells de cossos cetònics circulants totals en ratolins dejunats 24h, que van resultar ser de l'ordre d'1mM. Els ratolins shRNA

HMGCS2 presentaven una disminució significativa del 25% d'aquests nivells respecte el grup shRNA inespecífic (Figura R16A).

A més a més, existeix una correlació positiva entre l'activitat HMGCS2 hepàtica i els cossos cetònics circulants (Figura R16B), fet que aporta una evidència més que l'enzim HMGCS2 és l'enzim clau de la via de la cetogènesi, com ja s'ha descrit anteriorment (Ayté *et al.*, 1990; Casals *et al.*, 1992; Gil-Gómez *et al.*, 1993).

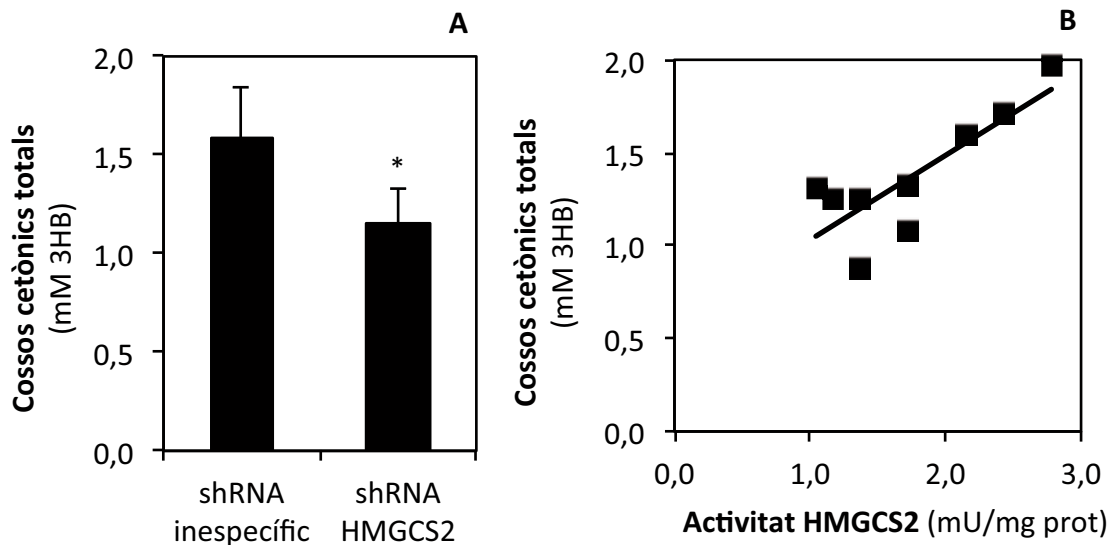


Figura R 16. Cossos cetònics circulants en ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. A) Determinació del nivell de cossos cetònics totals dels dos grups experimentals resultat de la suma d'acetoacetat i β -hidroxibutirat (veure mètodes VI.6). Es mostra la mitjana de 5 animals per grup. * $p < 0.05$. B) Relació entre els cossos cetònics circulants totals i l'activitat enzimàtica HMGCS2 hepàtica dels animals injectats. Recta de regressió lineal ($n=9$) amb una $R^2 = 0.7$.

4. EXISTEIX UNA CORRELACIÓ NEGATIVA ENTRE ELS NIVELLS DE COSSOS CETÒNICS CIRCULANTS I LA PÈRDUA DE PES CORPORAL EN EL DEJUNI

Els ratolins injectats amb l'shRNA inespecífic o l'shRNA contra HMGCS2 van perdre entre un 7 i un 17% del seu pes corporal degut a les 24h de dejú, que es va correlacionar negativament amb els nivells de cossos cetònics circulants d'aquests animals. Així, els ratolins amb uns nivells de cossos cetònics menors, presenten una disminució del pes corporal més pronunciada, fet que confirma que els cossos cetònics tenen un paper actiu en el manteniment del pes corporal durant el dejuni.

RESULTATS

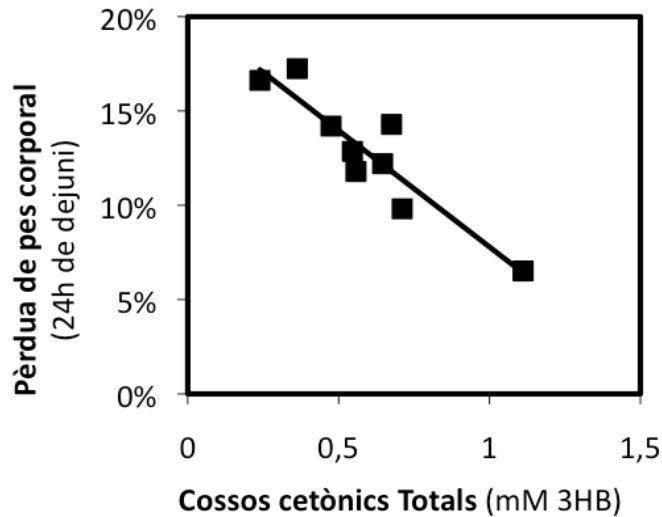


Figura R 17. Correlació entre el pes corporal i el nivell de cossos cetònics circulants. Correlació entre la pèrdua de pes corporal deguda al dejuni *versus* els cossos cetònics circulants (n=9). $R^2= 0.8$.

5. LA REDUCCIÓ DELS COSSOS CETÒNICS CIRCULANTS D'UN 25% NO TÉ EFECTES EN EL TEIXIT ADIPÓS BLANC

Tenint en compte que s'ha descrit el β -hidroxibutirat com un lligand endogen del receptor GPR109A (un receptor acoplat a proteïna G_i) en el teixit adipós blanc (Taggart *et al.*, 2005), vam analitzar si la disminució dels cossos cetònics circulants observada en els ratolins on l'HMGCS2 s'havia regulat a la baixa, produïa alguna alteració en la senyalització en aquest teixit.

L'efecte del β -hidroxibutirat sobre el teixit adipós blanc s'ha descrit que es produeix a través d'un mecanisme de retroalimentació pel qual la interacció del cos cetònic amb el receptor GPR109A altera la senyalització β -adrenèrgica en el teixit adipós (Ahmed *et al.*, 2009). Aquesta alteració provoca una disminució de la lipòlisi per la no activació de la lipasa sensible a hormones (HSL) que és fosforilada i activada per la PKA en resposta a senyals β -adrenèrgiques hidrolitzant els triacilglicerols en àcids grassos.

Per analitzar si la disminució de cossos cetònics circulants havia afectat la fosforilació d'HSL en el teixit adipós blanc, vam obtenir extractes proteïcs d'aquest teixit dels animals injectats i vam realitzar un *Western Blot* amb un anticòs específic d'HSL fosforilada.

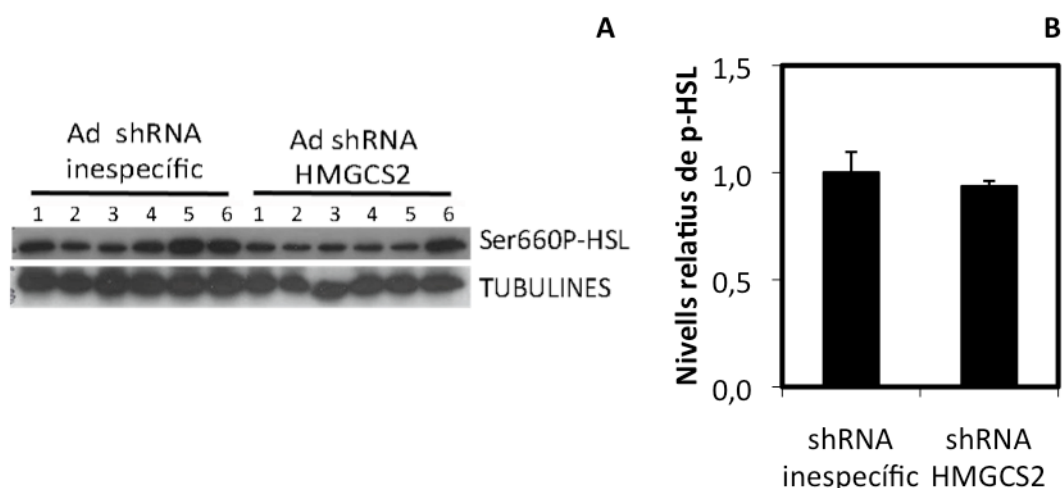


Figura R 18. Anàlisi de la fosforilació de la HSL en el teixit adipós de ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. *Western blot* de 10 μ g d'extracte proteic de teixit adipós de ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2 amb l'anticòs específic contra la Ser660P de la HSL. El gràfic de la dreta mostra la quantificació de la quimioluminiscència relativa normalitzada per tubulines com a control de càrrega.

Com s'observa a la figura R18, no vam observar canvis significatius en els nivells de fosforilació de la HSL entre els dos grups experimentals. D'acord amb aquests resultats, els nivells d'àcids grassos lliures en sèrum (NEFAs), un reflex de l'activitat lipolítica del teixit adipós, no es veuen significativament modificats per la disminució dels cossos cetònics circulants del 25% observada en aquests animals (Figura R19).

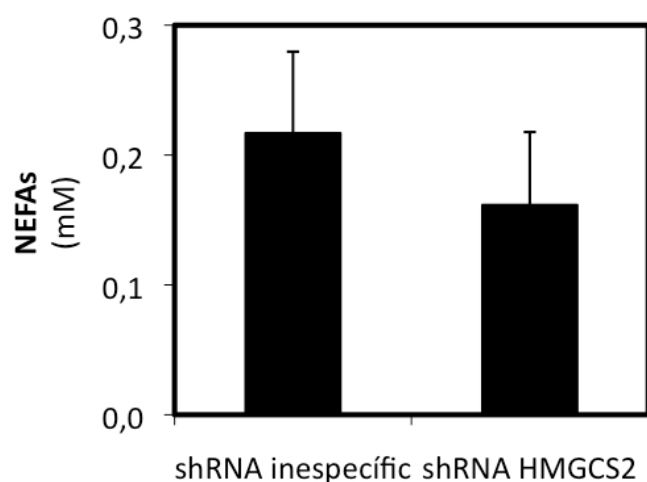


Figura R 19. Nivells de NEFAs en els ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. Es van analitzar els NEFAs en sèrum dels animals shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. Es mostra la mitjana de 5 animals per grup \pm desviació estàndard.

6. EFECTE DE LA DISMINUCIÓ DELS COSSOS CETÒNICS CIRCULANTS SOBRE L'EXPRESSIONI DE GENS IMPLICATS EN EL METABOLISME ENERGÈTIC

6.1. *Fgf21*

Amb l'objectiu de comprovar els resultats obtinguts *in vitro*, vam analitzar l'expressió del gen *Fgf21* en els fetges de ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. Al contrari de l'esperat, vam observar una tendència a l'alça, tot i que no significativa dels nivells d'mRNA d'*Fgf21*, quan l'activitat HMGCS2 estava disminuïda (Figura R20).

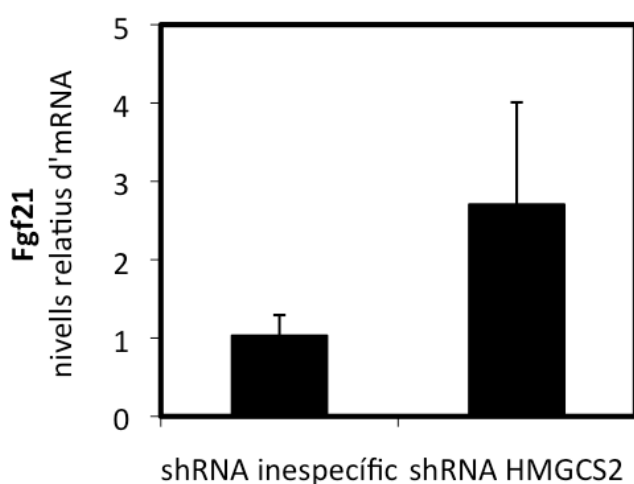


Figura R 20. Expressió d'*Fgf21* en els ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. PCR quantitativa d'*FG21* de ratolí de cDNAs obtinguts de fetge de ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. Es mostra la mitjana de 5 ratolins \pm la desviació estàndard.

6.2. *Cpt1a*

Per aprofundir en el possible efecte de l'HMGCS2 sobre l'expressió hepàtica de gens implicats en el metabolisme energètic, vam analitzar l'expressió del gen *Cpt1a*, regulador de l'entrada d'àcids grassos al mitocondri. Com es mostra en la figura R21A, la disminució de l'activitat HMGCS2 i dels cossos cetònics circulants no altera l'expressió del gen *Cpt1a* en el fetge dels animals injectats. D'acord amb aquests resultats, tampoc vam observar canvis en l'activitat CPT mesurada en mitocondris de fetge (Figura 21B).

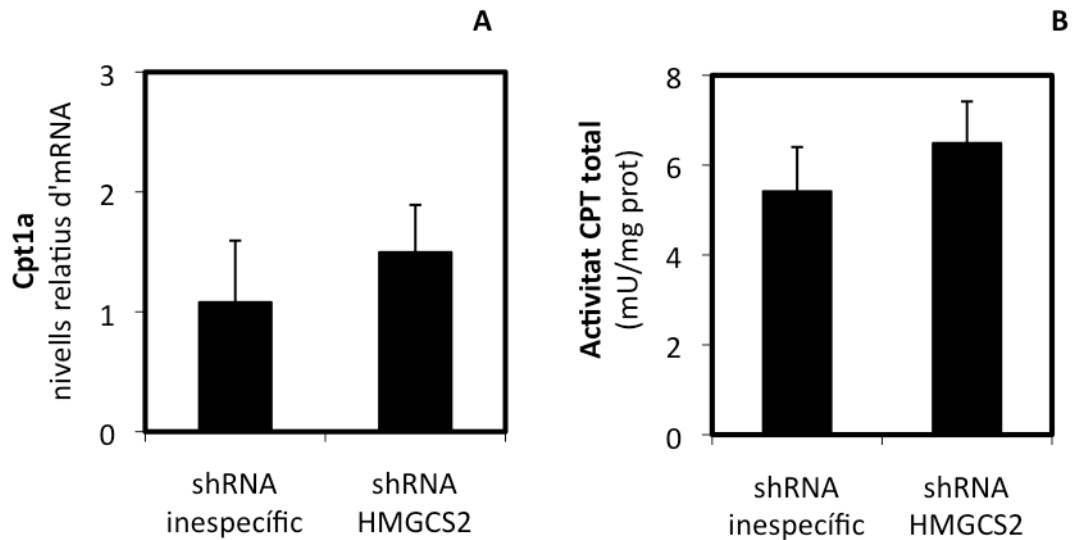


Figura R 21. Anàlisi de l'expressió i l'activitat CPT en ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. A) PCR quantitativa de Cpt1a de ratolí de cDNA obtingut de fetges de ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. B) Activitat CPT total mesurada en mitocondris aïllats de fetge dels animals dels dos grups experimentals. Els resultats mostren la mitjana de 5 animals per grup \pm desviació estàndard.

Aquests resultats són consistents amb els que havíem obtingut en cèl·lules HepG2, on l'expressió del gen *CPT1A* no es veia afectada per la sobreexpressió o la regulació a la baixa del gen *HMGCS2*.

6.3. *Pck1*

D'altra banda, vam analitzar si l'expressió de HMGCS2 tenia algun efecte sobre la gluconeogènesi durant el dejuni. En aquest sentit, està descrit ratolins *knockout* per PPAR α dejunats durant 24h presenten una severa hipoglucèmia que no va associada a un canvi en els enzims claus de la via gluconeogènica però sí a una forta reducció de la β -oxidació d'àcids grassos, de la cetogènesi i de l'expressió d'*HMGCS2* (Le May *et al.*, 2000).

L'expressió del gen *Pck1*, un dels enzims claus de la gluconeogènesi, no es veia alterada entre ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2 (Figura R22A) i els dos grups experimentals presentaven nivells de glucosa en sang similars (Figura R22B), suggerint que l'homeòstasi de la glucosa no es modifica per la disminució de l'activitat HMGCS2 assolida.

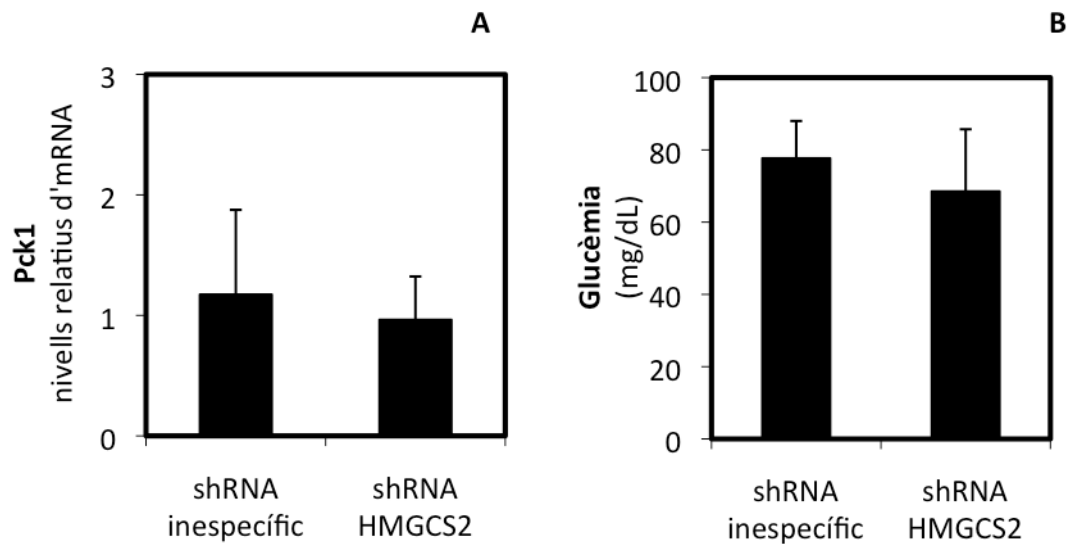


Figura R 22. Homeòstasi de la glucosa en ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. A) PCR quantitativa de *Pck1* de ratolí de cDNA obtingut de fetges de ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. B) Glucèmia dels dos grups experimentals mesurada en el moment del sacrifici dels animals. Els resultats mostren la mitjana de 5 animals per grup \pm desviació estàndard.

6.4. Anàlisi massiu d'expressió gènica

A continuació, per estudiar l'efecte de l'HMGCS2 i dels cossos cetònics sobre l'expressió gènica, vam fer un anàlisi massiu d'expressió gènica amb RNA de fetges de ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. Es va realitzar l'experiment amb els RNAs dels fetges dels animals que presentaven una activitat HMGCS2 i uns nivells de cossos cetònics circulants més baixos respecte els controls que van ser hibridats amb un *microarray* d'Affymetryx® (*GeneChip Mouse Gene 1.0ST*) a l'*IRB Functional Genomics Core*. A la figura R23 es mostra una taula resum dels diferents gens afectats.

Tot i que el nombre de gens que apareixen modificats en el *microarray* és reduït, dos gens relacionats amb el metabolisme i l'homeòstasi energètica, que es troben induïts quan l'activitat HMGCS2 està disminuïda van copsar el nostre interès: la sulfotransferasa que catalitza la reacció de sulfatació d'estrògens inactivant-los (*Sult1E1*) (Falany, 1997) i *Cell death-inducing DNA fragmentation factor-45-like effector c/Fat specific protein 27* (*Cidec/Fsp27*), mediador important de l'esteatosi hepàtica induïda per obesitat (Li i Li, 2007; Matsusue *et al.*, 2008).

Ontologia	Gen	Vegades d'inducció	P Value
<i>Cyclin-dependent protein-kinase regulator activity</i>	Ccnd1	0.428	0.023
ND	Xlr3a	0.451	0.058
<i>Antibiotic transporter activity</i>	Slc15a2	0.473	0.036
ND	Xlr3c	0.490	0.060
<i>Calcium ion binding</i>	S100a8	0.514	0.038
ND	2810417H13Rik	0.526	0.013
ND	Serpina4-ps1	0.527	0.407
ND	Xlr3b	0.529	0.040
<i>AA transmembrane transporter activity</i>	Slc1a4	0.542	0.003
ND	Ankrd37	0.544	0.027
<i>Serine-type endopeptidase inhibitor activity</i>	Serpina7	0.545	0.078
<i>Receptor binding</i>	Trdn	0.575	0.105
<i>ATP binding / nucleotide binding</i>	Mki67	0.584	0.014
<i>FAD or FADH2 binding</i>	Steap4	0.588	0.035
<i>Sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1</i>	Sult1e1	2.106	0.017
ND	Gm129	2.037	0.069
ND	Lcn13	1.810	0.030
<i>Calcium ion binding</i>	Cib3	1.753	0.013
<i>Ion channel activity</i>	Accn5	1.748	0.036
<i>Induction of Apoptosis</i>	CIDEF/Fsp27	1.738	0.036
<i>G-protein coupled receptor</i>	Sucnr1	1.692	0.026
<i>Intermediate filament</i>	Krt23	1.660	0.213
<i>DNA binding (transcription regulator)</i>	Bhlhe41	1.613	0.147
<i>Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 9</i>	Bhlhb9	1.613	0.010
ND	Gm15441	1.610	0.025
<i>G-protein coupled receptor protein signaling</i>	Defb1	1.604	0.021

Figura R 23. Taula resum dels resultats del *microarray Affymetrix® (GeneChip Mouse Gene 1.0ST)* realitzat amb RNA de fetge d'animals shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. A la taula s'indiquen els gens diferencialment regulats entre els animals infectats amb l'shRNA específic de HMGCS2 (n=3) respecte els infectats amb l'shRNA inespecífic (n=3). En verd es mostren els gens que estan regulats a la baixa (vegades d'inducció<0.6) i en vermell els que estan regulats a l'alça (vegades d'inducció>1.6). Enquadrats en negre estan els gens confirmats per PCR quantitativa.

Els gens seleccionats, Sult1E1 i Cidec/Fsp27, van ser posteriorment analitzats per PCR quantitativa en les mateixes condicions experimentals. La figura R24 mostra com l'anàlisi de l'expressió de Sult1E1 per PCR quantitativa no confirmava aquesta regulació. L'anàlisi de l'expressió del gen *CIDEF/Fsp27*, així com els resultats obtinguts en l'estudi de la regulació de la seva expressió s'explica en el següent capítol.

RESULTATS

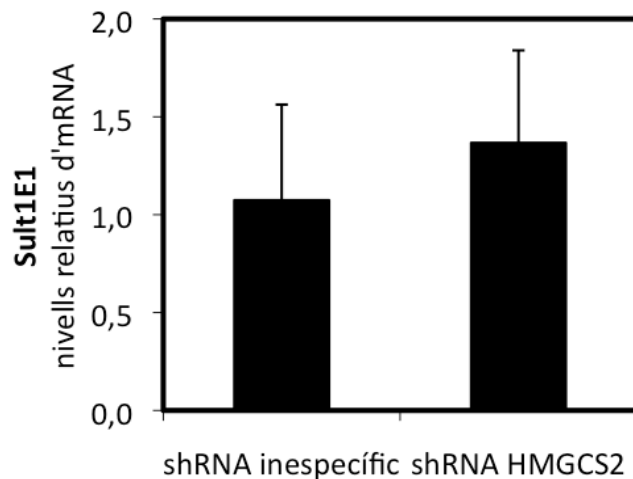


Figura R 24. Expressió del gen *Sult1E1* en ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. PCR quantitativa amb una sonda específica de *Sult1E1* de ratolí de cDNAs obtinguts de fetge de shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. Es mostra la mitjana de 5 ratolins per grup \pm la desviació estàndard.

7. IDENTIFICACIÓ DEL GEN *FSP27* COM A POSSIBLE GEN DIANA D'HMGCS2

El gen *Cidec* (en humans) o *Fsp27* (en ratolins) és un gen que codifica per una proteïna implicada en la formació de gotes lipídiques en el teixit adipós blanc. En fetge, *Fsp27* s'indueix en situacions d'esteatosi hepàtica i es proposa que té una funció similar a la que desenvolupa en el teixit adipós blanc (Matsusue, 2010). L'anàlisi de l'expressió d'*Fsp27* per PCR quantitativa ens va permetre confirmar que, efectivament, existeix una inducció dels nivells d'mRNA d'aproximadament 6 vegades de l'expressió en els ratolins que presenten una activitat HMGCS2 i uns nivells de cossos cetònics circulants disminuïts (Figura R25).

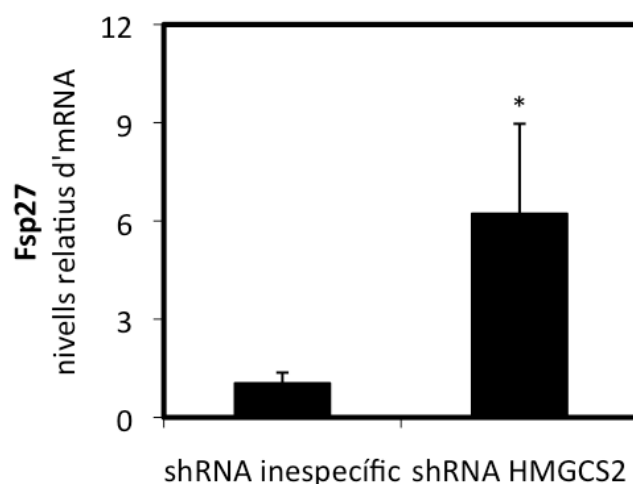


Figura R 25. Expressió d'*Fsp27* en ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. PCR quantitativa amb una sonda específica d'*Fsp27* de ratolí de cDNAs obtinguts de fetge de ratolins shRNA inespecífic o shRNA HMGCS2. Es mostra la mitjana de 5 ratolins per grup \pm la desviació estàndard. * $p < 0,05$.

Per tal de confirmar aquests resultats, vam reproduir l'experiment *in vitro*. Es van transfectar de manera transitòria cèl·lules HepG2 amb un siRNA específic contra

l'HMGCS2. Com s'observa a la figura R26, els nivells d'mRNA de *CIDEC* s'indueixen significativament quan es regula a la baixa l'HMGCS2. La regulació a la baixa d'HMGCS2 va ser analitzada per PCR quantitativa i va ser del 70%.

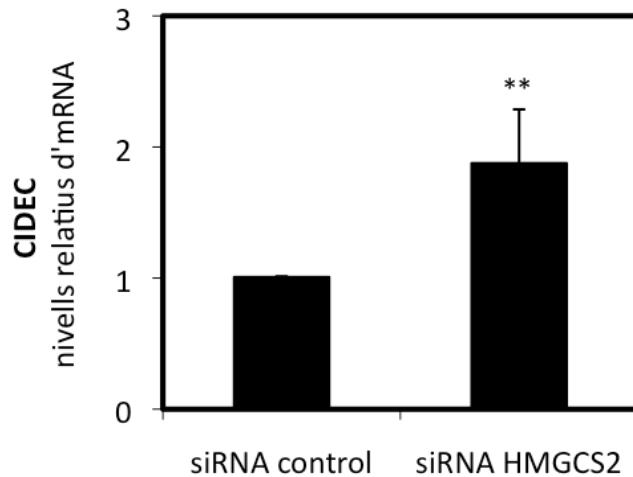


Figura R 26. Efecte sobre el gen *Cidec* de la regulació a la baixa d'HMGCS2 en cèl·lules HepG2. PCR quantitativa amb una sonda específica de *Cidec* humana de cèl·lules HepG2 transfectades durant 72h amb siRNA control o un siRNA específic contra HMGCS2. Es mostra la mitjana de 4 experiments independents \pm la desviació estàndard. ** $p < 0.01$

Aquests resultats indiquen que l'expressió del gen *HMGCS2* afecta l'expressió del gen *CIDEC/Fsp27*. Les conseqüències metabòliques d'aquesta regulació i el mecanisme pel qual l'HMGCS2 exerceix aquest efecte s'estan investigant.

IV. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DEL GEN FSP27/CIDEC

Per tal d'estudiar el mecanisme pel qual l'HMGCS2 podria regular l'expressió del gen *CIDEC/Fsp27*, vam primer estudiar els seus mecanismes de regulació transcripcional.

1. CIDEC ÉS REGULAT TRANSCRIPCIONALMENT PER PPAR α

S'ha descrit que *Fsp27* és activat transcripcionalment per PPAR γ a través d'un PPRE present en el seu promotor (Matsusue *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2003). Tanmateix, també existeixen alguns estudis que apunten que el gen *Fsp27* en fetge també podria ser activat PPAR α , l'isotip majoritari en aquest teixit (Rakhshandehroo *et al.*, 2007, 2009, 2010).

Tenint en compte aquests antecedents, vam investigar si *Fsp27/CIDEC* és un gen diana de PPAR α . Així, la sobreexpressió de PPAR α mitjançant la infecció amb un

RESULTATS

adenovirus de cèl·lules HepG2 provoca una inducció de l'expressió de *CIDEC* de 5 vegades (Figura R27A). Per contra, la regulació a la baixa del factor de transcripció PPAR α en cèl·lules HepG2, mitjançant la transfecció transitòria d'un siRNA específic contra PPAR α disminueix significativament l'expressió del gen un 30% (Figura 27B). La regulació a la baixa de PPAR α va ser analitzada per PCR quantitativa i va ser del 90%.

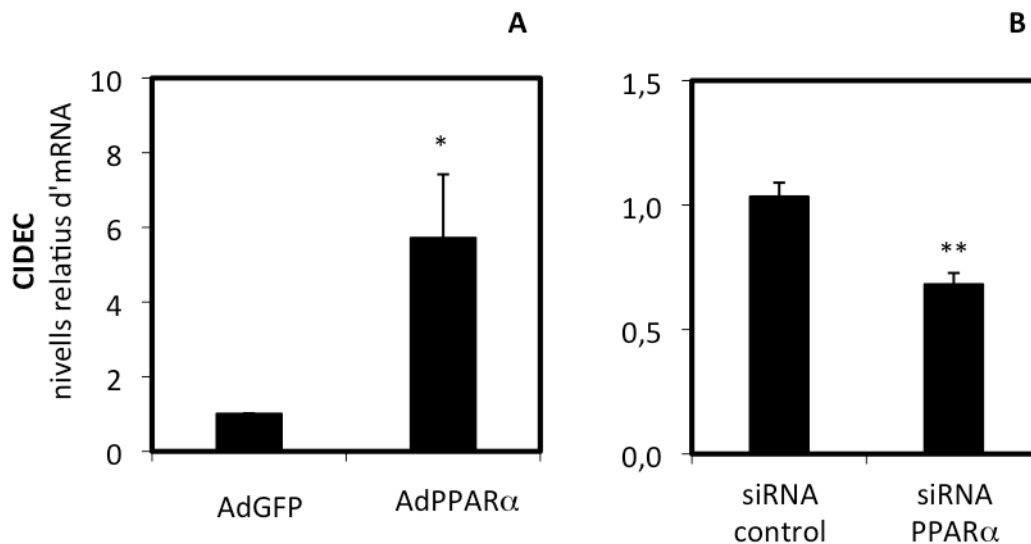


Figura R 27. PPAR α regula l'expressió del gen *Cidec*. PCR quantitativa de cDNA de cèl·lules HepG2 infectades amb l'adenovirus control (AdGFP) o l'adenovirus que sobreexpressa PPAR α (AdPPAR α) amb una MOI de 40 durant 48h (A) o de cèl·lules HepG2 transfectades durant 72h amb un siRNA control o un siRNA específic contra PPAR α (B).

Aquests resultats demostren que efectivament el gen *CIDEC* és regulat transcripcionalment per PPAR α .

2. CIDEC ÉS UN GEN ALTAMENT REGULAT TRANSCRIPCIONALMENT PEL DEJUNI

Donat que el gen *CIDEC/Fsp27* és positivament regulat per PPAR α , un màster regulador de la resposta al dejuni i que hem observat una regulació del gen *Fsp27* per HMGCS2 en ratolins dejunats 24h, ens vam interessar en la regulació del gen *Fsp27* per dejuni.

Amb aquest objectiu, vam analitzar l'expressió hepàtica del gen *Fsp27* en diferents moments del dejuni: a 6, 15 i 24h de dejuni. Com es mostra en la figura R28, els nivells d'mRNA d'*Fsp27* a 6h de dejuni s'indueixen 200 vegades respecte els animals control alimentats *ad libitum* (AL), demostrant que aquest gen és molt sensible als

processos que s'activen durant el dejuni. A les 15h de dejuni la inducció presentava un pic de 800 vegades que disminuïa a les 24h de dejuni.

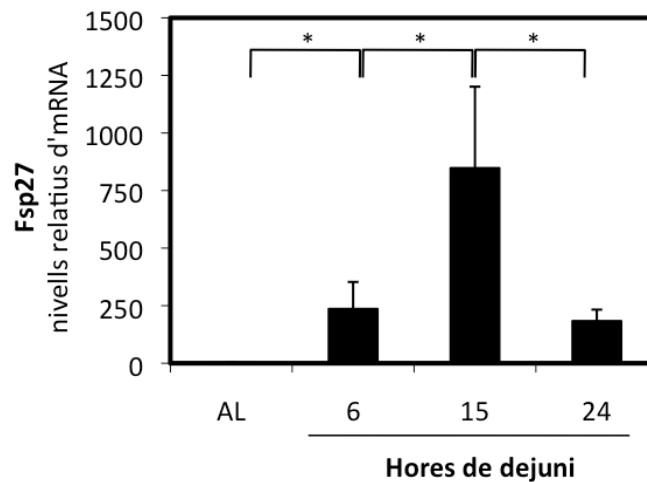


Figura R 28. Efecte del dejuni sobre l'expressió del gen *Fsp27*. PCR quantitativa amb una sonda específica del gen *Fsp27* de cDNA de ratolins C57BL6 de 10 setmanes alimentats ad libitum (AL) o dejunats 6, 15 o 24h. Els ratolins AL van ser sacrificats a les 20h, hora en què es va començar el dejuni de la resta de grups experimentals. Els resultats mostren la mitjana de 4 animals per grup experimental \pm desviació estàndard. * $p < 0.05$.

Aquests resultats demostren que *Fsp27* s'indueix durant les primeres hores del dejuni.

3. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE *CIDEC* PER FOXO1

Resultats previs del nostre grup demostren que els nivells d'mRNA del gen *Hmgcs2* s'indueixen en un dejuni de 15h i a les 24h de dejuni es mantenen elevats. D'altra banda, s'ha proposat que durant la fase tardana del dejú, SIRT1 desacetila el factor de transcripció FOXO1 activant-lo (Liu *et al.*, 2008). A més a més, diversos treballs descriuen que la regulació a la baixa del factor de transcripció FOXO1 participa en l'aparició d'esteatosi hepàtica, situació on l'expressió d'*Fsp27* s'indueix (Matsusue *et al.*, 2008; Nishino *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2003).

Paral·lelament a aquestes dades se sap que durant el dejuni, el factor de transcripció PPAR α es troba fortament activat. Tenint en compte els resultats anteriors on es demostra que el gen *Cidec/Fsp27* s'indueix per PPAR α (Figura R27), vam analitzar l'efecte del factor de transcripció FOXO1 sobre l'activació transcripcional del gen *Fsp27*

RESULTATS

per PPAR α . La figura R29 mostra com la sobreexpressió de FOXO1 en cèl·lules HepG2 mitjançant un adenovirus reprimeix la transactivació del gen *Cidec* per de PPAR α .

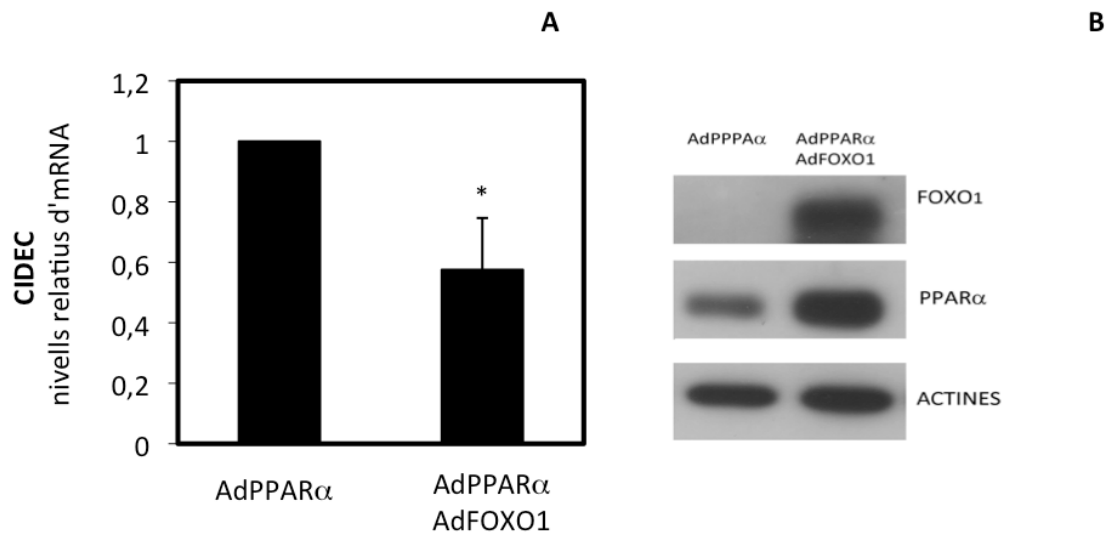


Figura R 29. Efecte de FOXO1 sobre l'activitat transcripcional de PPAR α del gen *Cidec*. A) PCR quantitativa de cDNA de cèl·lules HepG2 infectades amb AdPPAR α (MOI 20) en absència (AdGFP, MOI 5) o en presència de FOXO1 (AdFOXO1, MOI 5) durant 48h tractades amb WY14645 30 μ M durant 16h. Es mostra la mitjana de 4 experiments \pm la desviació estàndard. *p<0.05. B) *Western Blot* representatiu de 50 μ g d'extracte cru amb els anticossos indicats.

En conjunt, aquests resultats suggereixen nous mecanismes de la regulació hepàtica del gen *CIDEC/Fsp27*.

DISCUSSIÓ

I. EFECTE DE L'EXPRESSION DEL GEN *HMGCS2* SOBRE L'OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS I L'EXPRESSION GÈNICA EN CÈL·LULES HEPG2

1. L'EXPRESSION DEL GEN *HMGCS2* ÉS NECESSÀRIA PER A LA INDUCCIÓ DE L'OXIDACIÓ DE PALMITAT MITJANÇADA PER PPAR α

En determinades situacions fisiològiques (dejuni, exercici prolongat) o patològiques (diabetis, obesitat) el fetge reb gran quantitat d'àcids grassos que són captats pels hepatòcits, activats i transportats a l'interior dels mitocondris, on són degradats mitjançant la β -oxidació. La β -oxidació dels àcids grassos genera molècules amb poder reductor NADH i FADH₂, i acetil-CoA que en funció de l'estat metabòlic de la cèl·lula entrarà al cicle de Krebs o serà derivat a la síntesi de cossos cetònics.

Sembla evident que existeix una interrelació entre la β -oxidació i la cetogènesi i existeixen diversos treballs en aquest sentit. Així, s'ha demostrat que:

- L'activitat de les acil-CoA deshidrogenases, enzims que participen en el procés de β -oxidació dels àcids grassos són inhibides pel producte final de la via, l'acetil-CoA (Bremer i Osmundsen, 1984; Ikeda i Tanaka, 1990). En aquest sentit s'ha proposat que el baix flux d'oxidació d'àcids grassos observat en porcs nounats, podria ser una conseqüència metabòlica de la reduïda capacitat cetogènica observada en aquest model, que provocaria l'acumulació d'acetil-CoA i d'intermediaris de la β -oxidació i en conseqüència una inhibició de les acil-CoA deshidrogenases frenant el flux de la via (Duce *et al.*, 1994).
- Ratolins *knockout* de PPAR α dejunats durant 24h, on l'expressió del gen *Hmgcs2* i la cetogènesi es troben fortament disminuïdes, presenten una reducció de l'oxidació dels àcids grassos que no es correlaciona amb una disminució de l'expressió del gen clau de la via, *Cpt1a* (Le May *et al.*, 2000). Aquestes observacions coincideixen amb les del treball realitzat per (Leone *et al.*, 1999), on ratolins *knockout* de PPAR α dejunats durant 24h presentaven també una reducció dels cossos cetònics circulants i de l'expressió dels gens

DISCUSSIÓ

Mcad i *Aco*, implicats en l'oxidació d'àcids grassos, però no presenten una disminució significativa dels nivells d'mRNA de *Cpt1a*.

Tenint en compte que la cetogènesi i β -oxidació són processos metabòlics íntimament relacionats que es regulen recíprocament a través dels nivells d'acetil-CoA i de l'activitat de PPAR α , que modula l'expressió dels enzims clau d'ambdues vies (HMGCS2 i CPT1A), el primer objectiu de la present tesi doctoral ha estat investigar si l'expressió del gen *HMGCS2* i l'estimulació de la cetogènesi regula la β -oxidació.

En aquest sentit, resultats del nostre grup demostren que la sobreexpressió del gen *HMGCS2* en cèl·lules d'hepatoma humà HepG2 mitjançant adenovirus, produeix un increment significatiu de dues vegades de l'oxidació de palmitat i aquest efecte depèn de l'activitat catalítica de l'enzim (veure figura 1 publicació annexa).

Amb l'objectiu de resoldre si l'expressió del gen *HMGCS2* era necessària per mitjançar l'increment per PPAR α de la β -oxidació, vam utilitzar estratègies de RNA d'interferència per generar una línia HepG2 estable que expressés un shRNA específic contra l'*HMGCS2*. Tal i com es mostra en el capítol de resultats, consistent amb el que està descrit, la sobreexpressió de PPAR α en la línia cel·lular shRNA control indueix l'expressió del gen *HMGCS2* (Figura R2A) i l'oxidació de palmitat (Figura R2B) ((Hsu et al., 2001; Minnich et al., 2001). En canvi, aquest efecte desapareix en la línia estable on es regula a la baixa l'*HMGCS2*. Aquests resultats reforcen les evidències proposades on es correlaciona l'efecte de PPAR α sobre la β -oxidació amb els nivells de cetogènesi i d'*HMGCS2*.

Per tant, podem concloure que efectivament l'expressió del gen *HMGCS2* és necessària i suficient per la inducció de l'oxidació dels àcids grassos mitjançada per PPAR α .

2. L'HMGCS2 NO ACTUA COM UN COACTIVADOR DE PPAR α

Davant d'aquest resultat, ens vam plantejar estudiar els mecanismes pels quals l'*HMGCS2* exercia aquest efecte sobre la β -oxidació. Els estudis de Meertens *et al* i de

Kostiuk *et al* suggerien un paper de l'HMGCS2 com a coactivador de PPAR α . Així, una construcció reportera que conté el PPRE del gen *HMGCS2* és activada per la cotransfecció amb els vectors d'expressió PPAR α i HMGCS2. Aquesta activitat coactivadora s'atribuïa a una localització nuclear de la proteïna i a una interacció d'ambdues proteïnes que depèn de la palmitoïlació de la cisteïna 166 que forma part del centre catalític de l'HMGCS2.

Tenint en compte que PPAR α és un fort activador dels processos de captació, activació i translocació a la matriu mitocondrial dels àcids grassos i que indueix l'expressió de diversos gens de la via de la β -oxidació (Introducció II.4.1), vam estudiar si l'efecte de l'HMGCS2 sobre l'oxidació d'àcids grassos era a través de la coactivació transcripcional de PPAR α , estimulants així l'expressió dels seus gens diana.

Per comprovar aquesta hipòtesi, vam realitzar en primer lloc, estudis de transfecció transitòria en la línia cel·lular HepG2. Vam escollir la línia cel·lular hepàtica HepG2 per ser un context més fisiològic que l'utilitzat en els estudis anteriorment publicats. En els treballs referenciats analitzaven l'efecte coactivador de l'HMGCS2 amb una construcció quimèrica del PPRE del gen *HMGCS2*. En la present tesi doctoral vam realitzar els experiments amb construccions reporteres dels gens humans *CPT1A* i *HMGCS2* que contenen el promotor proximal i la regió 5' reguladora dels mencionats gens. Els assajos realitzats amb aquestes construccions no demostren un efecte coactivador de PPAR α per part de l'HMGCS2 (Figura R3). El tractament de les cèl·lules amb palmitat incrementa lleugerament l'activitat promotora dels dos gens estudiats, efecte esperat tenint en compte que els àcids grassos són lligands endògens de PPAR α (Kliewer *et al.*, 1997). Tot i així, el tractament amb palmitat, que és activat a palmitoïl-CoA a l'interior de la cèl·lula, tampoc converteix l'HMGCS2 en un coactivador de PPAR α en aquest context cel·lular i sota les nostres condicions experimentals.

No obstant això, ens vam proposar estudiar la localització subcel·lular de la proteïna HMGCS2 endògena en aquesta línia cel·lular. Tal i com es mostra en el capítol de resultats, la proteïna HMGCS2 endògena induïda per la sobreexpressió de PPAR α amb adenovirus, a diferència de la transfectada i etiquetada que s'havia utilitzat en

DISCUSSIÓ

estudis anteriors (Meertens *et al.*, 1998), presenta un patró mitocondrial i no co-localitza amb el factor PPAR α que es troba al nucli (Figura R4).

Finalment, per tal de reproduir la interacció descrita anteriorment entre PPAR α i la proteïna HMGCS2 etiquetada produïda *in vitro*, es va utilitzar un extracte cru de cèl·lules HepG2 on es va sobreexpressar la proteïna *wild type* o la forma catalíticament inactiva, que té la cisteïna susceptible de ser palmitoilada (C166) segons el grup de Kostiuik *et al.* mutada. En aquestes condicions, vam realitzar assajos d'unió d'aquests extractes amb una proteïna de fusió GST-PPAR α i no vam observar cap interacció amb l'HMGCS2. Per tant, les proteïnes HMGCS2 i PPAR α no interaccionen ni en presència ni en absència de palmitat en les nostres condicions experimentals.

Aquests resultats ens van permetre concloure que, en la línia cel·lular HepG2, l'HMGCS2 no interacciona amb PPAR α i, per tant no té un efecte de coactivador transcripcional d'aquest. Així doncs, la coactivació directa de PPAR α no és el mecanisme pel qual l'HMGCS2 modula l'oxidació d'àcids grassos.

3. HMGCS2 MODULA L'EXPRESSIÓ DEL GEN DIANA DE PPAR α FGF21

En vista que l'expressió del gen *HMGCS2* regulava l'oxidació d'àcids grassos mitjançada per PPAR α i per aprofundir en els mecanismes de regulació implicats, vam decidir estudiar si l'expressió gènica d'alguns gens diana de PPAR α es veia afectada per la regulació a la baixa del gen *HMGCS2*.

Així, vam analitzar l'expressió del gen *FGF21*, recentment descrit com a gen diana de PPAR α (Badman *et al.*, 2007; Inagaki *et al.*, 2007). Els resultats demostren que la regulació a la baixa de l'HMGCS2 en cèl·lules HepG2 provoca una disminució de l'expressió del gen *FGF21* tant en condicions basals, com en presència de PPAR α (Figura R6A). No s'observa, en canvi, un efecte significatiu sobre el gen *CPT1A*, un altre gen diana de PPAR α (Figura R6B) (Napal *et al.*, 2005).

D'altra banda, estudis de sobreexpressió del gen *HMGCS2* en la mateixa línia cel·lular produeixen un augment significatiu de l'expressió del gen *FGF21*, que és

depenent de l'activitat catalítica de l'enzim (Figura R7A) i específic sobre *FGF21*, ja que l'expressió d'altres gens diana de $PPAR\alpha$, com *CPT1A* o el propi $PPAR\alpha$, no es veu afectada (Figura R7B).

Per tant, l'expressió del gen *HMGCS2* és suficient i essencial per la correcta inducció del gen *FGF21* en cèl·lules HepG2. Aquest resultat ens presenta dues qüestions principals: d'una banda per quin mecanisme molecular el gen *HMGCS2* regula l'expressió del gen *FGF21* en aquesta línia cel·lular i d'altra banda quines conseqüències té aquesta regulació.

4. L'HMGCS2, A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓ DE COSSOS CETÒNICS, MODULA L'EXPRESSIÓ D'FGF21, PER UN MECANISME QUE DEPÈN DE SIRT1.

Amb l'objectiu d'elucidar el mecanisme molecular pel qual el gen *HMGCS2* regula l'expressió d'*FGF21*, vam analitzar si l'expressió d'aquest es veia modificada pel tractament amb cossos cetònics, productes finals de la via de l'HMG-CoA.

L'acetoacetat és sintetitzat per la via cetogènica a partir de 3 molècules d'acetil-CoA que donen lloc a acetil-CoA, una molècula d'acetoacetat i dos CoAs lliures, per acció de tres activitats enzimàtiques de localització mitocondrial: acetoacetil-CoA tiolasa, *HMGCS2* i HMG-CoA liasa (McGarry i Foster, 1980). Posteriorment, quan els nivells de NADH al mitocondri són elevats, l'acetoacetat, per acció de l'enzim β -hidroxibutirat deshidrogenasa, és convertit a β -hidroxibutirat produint-se també NAD^+ . Tot i que aquesta activitat enzimàtica en rates es localitza principalment al mitocondri de diversos teixits (Lehninger *et al.*, 1960), hi ha evidències que en alguns mamífers aquesta activitat es troba també en el citosol (Koundakjian i Snoswell, 1970) i, recentment, s'ha descrit un isotip citosòlic en humans (Guo *et al.*, 2006). Així doncs, cal esperar que en funció de la relació $[NAD^+]/[NADH]$ intracel·lular, es podrà produir la interconversió d'acetoacetat a β -hidroxibutirat generant molècules de NAD^+ al citosol.

En aquest sentit, els resultats demostren que el tractament amb acetoacetat, la forma oxidada del parell de cossos cetònics, indueix l'expressió del gen *FGF21* d'una manera dosi depenent, mentre que aquest efecte no s'observa amb el tractament amb

DISCUSSIÓ

β -hidroxibutirat, la forma reduïda dels cossos cetònics (Figura R8), suggerint que aquesta regulació pot ser deguda a un canvi en la relació $[NAD^+]/[NADH]$ intracel·lular.

Donat que la relació $[NAD^+]/[NADH]$ s'ha demostrat que afecta de forma directa l'activitat de SIRT1, vam estudiar el paper de SIRT1 en la modulació de l'expressió del gen *FGF21*. En aquest sentit, s'ha descrit que el tractament d'hepatòcits amb piruvat (forma oxidada) incrementa els nivells de NAD^+ intracel·lulars i els nivells de proteïna SIRT1 (Rodgers *et al.*, 2005). A més a més, molt recentment, s'ha publicat que l'eliminació en ratolins del gen *Poly(ADP-ribose) polimerase (PARP)-1*, que consumeix NAD^+ en gran quantitat, provoca un increment dels nivells de NAD^+ intracel·lulars en múscul i teixit adipós blanc que es correlaciona amb un increment de l'activitat de SIRT1 (Bai *et al.*, 2011). Tot i que SIRT1 presenta una localització nuclear, s'ha detectat la seva presència en el citoplasma on exerceix la seva funció desacetilant, per exemple, l'acetil-CoA sintasa 1 (Hallows *et al.*, 2006).

Finalment, hi ha estudis que demostren que la relació $[NAD^+]/[NADH]$ es troba alterada per diferents estats nutricionals. Així, per exemple, en fetge aquesta relació es troba incrementada en ratolins dejunats durant 24h (Hayashida *et al.*, 2010) i disminuïda per restricció calòrica (Chen *et al.*, 2008) i en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos (Kendrick *et al.*, 2010).

Pel que fa a *FGF21*, Purushotham *et al* han demostrat que la regulació del gen *Fgf21* per $PPAR\alpha$ és altament sensible a la presència de SIRT1. Així, hepatòcits de ratolins *knockout* de SIRT1 específics de fetge presenten una disminució dels nivells d'mRNA d'*Fgf21* i una resistència a la inducció pel tractament amb el lligand específic de $PPAR\alpha$ WY14643, efectes que són revertits per la sobreexpressió de SIRT1 (Purushotham *et al.*, 2009b). Consistent amb aquest treball, resultats del nostre grup demostren que aquests mateixos animals dejunats 24h mostren uns nivells d'mRNA d'*Fgf21* significativament més baixos que els dels ratolins control, que es corresponen amb una disminució significativa dels nivells sèrics de proteïna *FGF21*. Aquest efecte no s'observa en altres gens diana de $PPAR\alpha$, *Hmgcs2* i *Cpt1a* confirmant que el gen *Fgf21* és un gen diana de $PPAR\alpha$ altament sensible a l'activitat de SIRT1 (veure figura 5 publicació annexa).

Tenint en compte totes les dades de què disposàvem, vam voler comprovar si l'HMGCS2 regulava l'expressió d'*FGF21* per un mecanisme depenent de SIRT1 (Figura D1). Tal i com es mostra en l'apartat de resultats, la inducció de l'expressió del gen *FGF21* que es produeix en cèl·lules HepG2 tractades amb acetoacetat, desapareix quan regulem a la baixa l'expressió de SIRT1 amb un siRNA específic (Figura R9), evidenciant que el gen *FGF21* es troba sota el control de SIRT1.

Purushotham *et al*, mitjançant experiments d'immunoprecipitació de cromatina, demostren que SIRT1 està present en el PPRE del promotor d'*Fgf21* i que aquesta interacció es veu incrementada pel tractament amb el lligand específic de PPAR α WY14643. A més a més, demostren que PPAR α i SIRT1 interaccionen. Tot i que no està demostrat que PPAR α sigui susceptible de ser acetilat, els autors suggereixen que PPAR α podria ser un substrat de SIRT1 incrementant la seva activitat transcripcional (Purushotham *et al.*, 2009a). Aquest mecanisme molecular podria explicar que l'HMGCS2 tingui un efecte coactivador de PPAR α , però no a través d'un efecte directe com havien proposat altres grups, sinó a través de l'estimulació de l'activitat de SIRT1. En aquest cas, només els gens diana de PPAR α altament sensibles a l'activitat de SIRT1 veurien modificada la seva expressió per acció de l'HMGCS2.

Segons aquestes dades, el gen *CPT1A*, que no es veu afectat per la regulació del gen *HMGCS2*, és menys sensible a l'acció de SIRT1 (veure figura 5 publicació annexa). D'acord amb el treball de Purushotham *et al* on es mostra que la reducció dels nivells de *Cpt1a* en hepatòcits dels ratolins *knockout* de SIRT1 específics de fetge tractats amb el lligand específic de PPAR α és molt més moderada que la d'*Fgf21*.

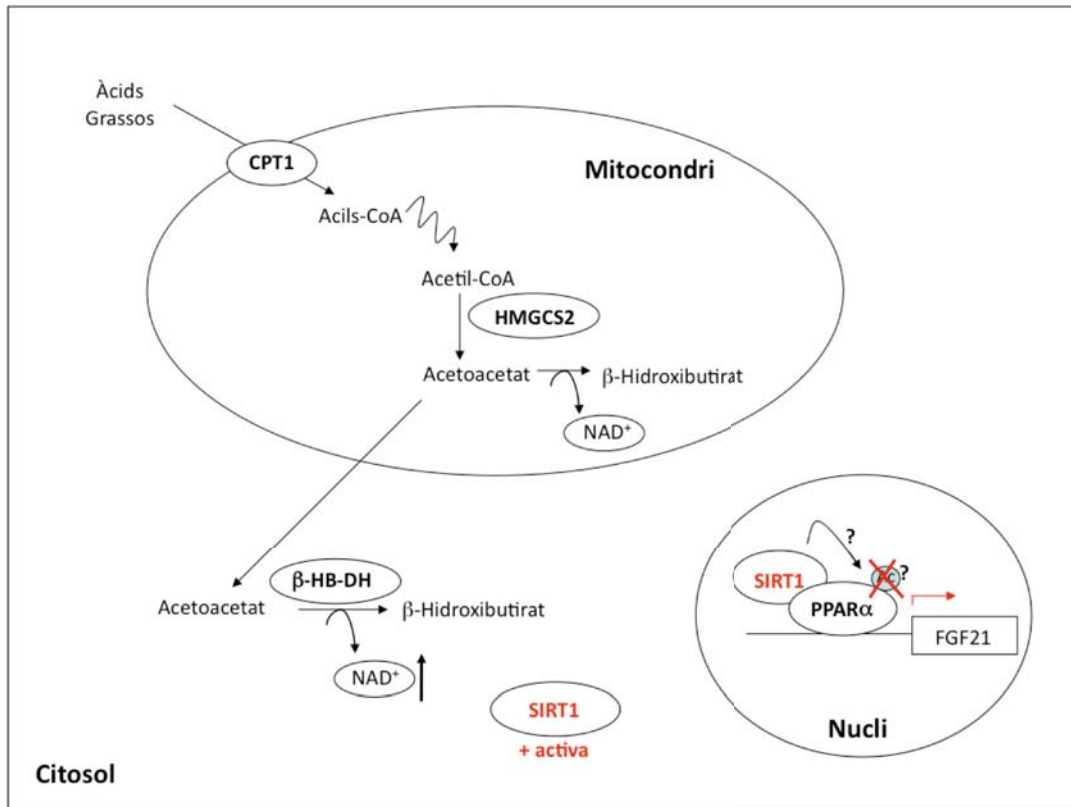


Figura D 1. Mecanisme proposat pel qual l'HMGCS2 regula l'expressió del gen FGF21. L'acetil-CoA provinent de la degradació dels àcids grassos és convertit a acetoacetat per acció de l'HMGCS2. L'acetoacetat pot ser convertit en β-hidroxiacetat al citosol per acció d'una β-hidroxiacetat deshidrogenasa produint-se NAD⁺. L'increment de NAD⁺ activarà SIRT1 que desacetilarà els seus substrats, entre ells es proposa PPARα, i activarà l'expressió del gen FGF21.

5. ELUCIDACIÓ DEL MECANISME DE REGULACIÓ DE L'OXIDACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS PER HMGCS2

Els resultats fins ara exposats ens van suggerir nous mecanismes pels quals l'HMGCS2 podria regular l'oxidació d'àcids grassos. A continuació es detallen les hipòtesis que proposem.

5.1. SIRT1-FGF21-PGC1α

D'acord amb l'apartat anterior, la regulació a la baixa el gen *HMGCS2* en HepG2 reduiria els nivells de NAD⁺ intracel·lulars, que a l'hora disminuiria l'activitat de SIRT1 i en conseqüència, l'activitat de PPARα, PGC1α i els nivells d'FGF21. Segons això, la

disminució de l'activitat de SIRT1 reduïria l'activació mitjançada per PPAR α de gens clau de la β -oxidació. Pel que fa a PGC1 α , s'ha descrit que la seva expressió hepàtica s'indueix durant el dejuni, que promou l'expressió de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos mitjançant la coactivació de PPAR α (Finck i Kelly, 2006; Vega et al., 2000) i que és desacetilat per SIRT1, fet que provoca un increment de la seva activitat coactivadora (Rodgers *et al.*, 2005). Per tant, una disminució de l'activitat de SIRT1 deguda a una disminució de l'activitat HMGCS2, conduiria a una major acetilació de PGC1 α i a una reducció de la β -oxidació.

D'altra banda, Potthoff *et al* demostraren que FGF21 té un paper en la regulació de l'oxidació d'àcids grassos. En aquest treball s'observa que la sobreexpressió del gen *Fgf21*, tant en models transgènics com per l'administració de la proteïna recombinant, incrementa els nivells de PGC1 α , suggerint que sigui via aquesta inducció que FGF21 estimuli la β -oxidació (Potthoff *et al.*, 2009).

5.2. Efecte metabòlic

Finalment, no podem descartar un efecte metabòlic segons el qual un increment en la síntesi de cossos cetònics, reduiria els nivells d'acetyl-CoA mitocondrial i això "desinhibiria" l'activitat de les acil-CoA deshidrogenases, produint un increment de la taxa d'oxidació d'àcids grassos. A més a més, donant suport a aquesta hipòtesi, cal remarcar que en el procés de cetogènesi es produeixen molècules de CoA lliure que podrien ser utilitzades en l'activació dels àcids grassos per acció de l'acil-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.3), etapa prèvia a l'entrada dels àcids grassos a la matriu mitocondrial.

En aquest sentit, s'ha descrit l'enzim SIRT3 desacetila i activa la deshidrogenasa d'acils-CoA de cadena llarga (LCAD), incrementant l'oxidació dels àcids grassos (Hirschey *et al.*, 2010). Alhora l'acetoacetat pot ser convertit en β -hidroxibutirat a l'interior del mitocondri, fent que l'HMGCS2, a través de la producció de cossos cetònics, pugui contribuir a l'augment de NAD⁺ intramitocondrial que té lloc durant el dejuni, activant així, l'enzim SIRT3 i els enzims de la via d'oxidació d'àcids grassos. A més a més, també s'ha descrit que SIRT3 desacetila l'HMGCS2 i n'augmenta la seva

DISCUSSIÓ

activitat (Shimazu *et al.*, 2010), creant-se un mecanisme de retroalimentació positiva durant el dejuni pel qual s'activarien la cetogènesi i l'oxidació d'àcids grassos per obtenir energia.

6. L'HMGCS2 I LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Otto Warburg va demostrar l'any 1956 que les cèl·lules tumorals presenten un perfil metabòlic alterat que es caracteritza per un increment de la captació de glucosa i de la via glicolítica en condicions aeròbiques i que és conegut com a efecte Warburg. Si aquests canvis són la causa o la conseqüència de la malignitat de les cèl·lules i de la seva capacitat de creixement no està del tot establert, però molts han estat els esforços durant l'última dècada per intentar descriure la relació entre el metabolisme cel·lular i la progressió tumoral. Així, una cèl·lula tumoral utilitza les vies glicolítica i lipogènica per obtenir energia i precursors per sintetitzar membranes (síntesi de lípids), per al creixement cel·lular (síntesi de proteïnes) i per mantenir la taxa de replicació (síntesi de nucleòtids). En canvi, aquestes cèl·lules presenten una disminució de la velocitat del cicle de Krebs (Levine i Puzio-Kuter, 2010).

Tots aquests canvis metabòlics impliquen una gran quantitat d'oncogens i supressors tumorals. D'una banda l'oncogen c-myc indueix l'expressió de gens glicolítics, de la lactat deshidrogenasa A (LDH-A) i de diversos enzims involucrats en la síntesi de nucleòtids (DeBerardinis *et al.*, 2008). D'altra banda, el supressor tumoral p53 ajuda a contrarestar aquests efectes disminuint de la glicòlisi i promovent la respiració mitocondrial (Vousden, 2010). Paral·lelament, s'ha descrit que p53 activa l'oxidació d'àcids grassos a través de la inducció de l'enzim guanidinoacetat metil transferasa (GAMT), implicat en la síntesi de creatina (Ide *et al.*, 2009). En aquest treball mostren que ratolins *knockout* de p53 presenten una disminució de l'oxidació hepàtica d'àcids grassos tant en un estat d'alimentació com en dejú. Els autors proposen que p53 indueix la β -oxidació d'àcids grassos amb l'objectiu de contrarrestar l'efecte Warburg, ja que està descrit que una oxidació activa d'àcids grassos inhibeix la utilització de glucosa (Randle *et al.*, 1963). En aquest sentit, s'ha demostrat que durant el creixement anabòlic de cèl·lules hematopoiètiques es suprimeix la β -oxidació a

través de la modulació de l'expressió del gen *CPT1A* a través de la via de la PI3K (DeBerardinis *et al.*, 2006).

A més a més, resultats previs del nostre grup han demostrat que el gen *HMGCS2* és diana dels gens supressors de tumors p53 i PTEN, que l'expressió del gen *HMGCS2* es troba disminuïda en diferents teixits tumorals i que aquesta repressió és mediada per l'oncogen c-myc a través d'un mecanisme dependent de Miz-1 (Camarero *et al.*, 2006; Mayordomo, 2007).

Totes aquestes dades convergeixen en el fet que tal i com ha estat proposat per Ide *et al.*, és possible que la disminució de l'expressió del gen *HMGCS2* en els tumors sigui una estratègia metabòlica de la cèl·lula tumoral, a la qual li suposaria un inconvenient oxidar els àcids grassos, tenint en compte la necessitat de precursors per la síntesi de lípids necessaris per la formació de noves membranes. Tanmateix, fins al moment no hem pogut demostrar un efecte directe de l'expressió del gen *HMGCS2* sobre la proliferació cel·lular. Per tant, el paper de l'*HMGCS2* en la progressió tumoral requereix encara de més investigació.

II. GENERACIÓ D'UN KNOCKOUT TEIXIT ESPECÍFIC DEL GEN *HMGCS2*

Un dels objectius principals d'aquest treball era generar un *knockout* condicional pel gen *Hmgcs2* en diversos teixits. El gen *HMGCS2* s'expressa, a part d'en fetge, en nombrosos teixits com ara múscul esquelètic, cor, còlon, ronyó, etc. (Mascaro *et al.*, 1995), on podria jugar un paper clau en la senyalització cel·lular a través dels cossos cetònics, que a més a més de ser substrats energètics, són molècules senyalitzadores. Així, per exemple, estudis realitzats amb cardiomiòcits de rata demostren que el tractament amb β -hidroxibutirat disminueix la captació de glucosa. Aquest efecte implica, d'una banda, la disminució de la via de la PI3K/AKT en resposta a insulina i, d'altra banda, la disminució de la fosforilació de la proteïna quinasa activada per AMPc (AMPK) i de les proteïnes que es troben sota el seu control, la quinasa activada per mitògens (MAPK) p38 i l'acetil-CoA carboxilasa (ACC). A més a

DISCUSSIÓ

més, aquest tractament també augmenta la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (Pelletier i Coderre, 2007; Pelletier et al., 2007).

A nivell cardíac s'ha suggerit que el β -hidroxibutirat pot tenir un paper en l'aparició de resistència a insulina en aquest teixit donat que atenua la senyalització per aquesta hormona. A més a més, el β -hidroxibutirat podria estar implicat en l'aparició de malalties cardíques secundàries a la diabetis, ja que la correcta captació de glucosa per part del múscul cardíac, en condicions d'estrès metabòlic, és essencial per mantenir la seva funció. Encara que s'ha descrit que l'expressió del gen *HMGCS2* en cardiomiòcits és regulada per àcids grassos a través de $PPAR\alpha$, per dexametasona i per dejuni, es desconeix quin paper té en aquest teixit (Wentz *et al.*, 2010).

En el mateix sentit, en el múscul esquelètic s'ha descrit que els nivells de β -hidroxibutirat són elevats en rates alimentades amb una dieta rica en greixos. Alhora, s'ha vist que en el teixit muscular, la sobreexpressió hepàtica de l'enzim MCD provoca una millora de la resistència a insulina induïda per la dieta rica en greixos i que aquesta sobreexpressió es correlaciona amb una disminució dels nivells de β -hidroxibutirat musculars (An *et al.*, 2004). A més a més, en miotubs L6E9 i C2C12 l'expressió del gen *Hmgcs2* s'indueix pel tractament amb oleat i per la sobreexpressió de $PPAR\alpha$. Tot i que es proposa que els cossos cetònics podrien tenir un paper en l'aparició de la resistència a insulina, el significat fisiològic de l'expressió del gen *HMGCS2* en el múscul esquelètic és desconegut.

Finalment, cal destacar que hi ha evidències que apunten que l'expressió del gen *HMGCS2* i la síntesi de cossos cetònics en ronyó podrien contribuir a millorar la hipertensió en rates mitjançant la disminució de ROS mitocondrial (Yi *et al.*, 2010). En aquest teixit, en canvi, s'ha suggerit que els nivells de proteïna i activitat *HMGCS2* podrien estar relacionats amb l'aparició de la nefropatia diabètica (Zhang *et al.*, 2010).

Així doncs, la generació d'un *knockout* condicional del gen *Hmgcs2* ens permetria aprofundir en el paper de l'*HMGCS2* com a sintetitzador de cossos cetònics en diferents contextos fisiològics i patològics, resistència a insulina en múscul, progressió tumoral en còlon, regulació de l'homeòstasi energètica en fetge, etc.

El procés de generació d'un *knockout* condicional consta de diverses etapes. En la present tesi doctoral s'ha dissenyat l'estratègia, s'ha generat la construcció i s'han analitzat els clons resistents en col·laboració amb el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) de la Universitat Autònoma de Barcelona. Vam utilitzar l'estratègia anomenada *site-specific gene targeting*. Aquesta estratègia va ser descrita per Capecchi *et al* i es basa en el fenomen de recombinació homòloga entre una seqüència de DNA introduïda i la seqüència corresponent del cromosoma i permet la modificació d'un lloc específic del genoma (Capecchi, 1989a, b). A més a més, aquesta tècnica requereix de l'activitat recombinasa Cre aïllada del bacteriòfag P1, una proteïna de 38kDa que catalitza la recombinació entre dos llocs loxP de 34pb cada un. La recombinació pot tenir lloc entre dos llocs loxP repetits en la mateixa molècula de DNA provocant l'eliminació de la seqüència de DNA situada entre aquests dos llocs, o també entre dos llocs loxP invertits donant lloc en aquest cas a l'inversió del fragment situat enmig (Sauer i Henderson, 1988). D'altra banda, per dur a terme aquesta estratègia s'utilitzen cèl·lules mare embrionàries de ratolí que són manipulades *in vitro* i després implantades en una femella pseudogestant. En aquest entorn, les cèl·lules mare modificades genèticament es poden diferenciar i donar lloc tant a la línia germinal com a les cèl·lules somàtiques, generant un animal quimèric (Robertson, 1991).

Per dissenyar una construcció que portarà la mutació desitjada al genoma hi ha diversos aspectes a tenir en compte:

- L'elecció del vector: de substitució o d'inserció.
- La longitud dels braços d'homologia
- La preparació el vector a partir de DNA isogènic
- El disseny del futur genotipat dels clons i dels animals

1. Elecció del vector

Vam utilitzar un vector de substitució ja que era l'estratègia més comunament utilitzada per la comunitat científica per generar *knockout* condicionals. Vam utilitzar el plasmidi pFLOX per generar la construcció que permetria la introducció específica de

DISCUSSIÓ

dos llocs loxP en regions intròniques 5' i 3' de l'exó 2 del gen *Hmgcs2* de ratolí. Vam escollir situar aquest exó entre els dos llocs loxP perquè conté el centre catalític de la proteïna i perquè la seva eliminació provocarà la pèrdua del marc obert de lectura de la proteïna.

2. La longitud dels braços d'homologia

S'ha descrit que una major longitud dels braços d'homologia incrementa els fenòmens de recombinació homòloga en aquestes construccions. En un estudi realitzat per Deng i Capecchi (1992) demostren que pel locus del gen HPRT existeix una relació exponencial entre fenomen de recombinació (cèl·lules que sobreviuen a l'electroporació) i la longitud del fragment d'homologia (quan aquesta es troba entre 2 i 10kb) (Deng i Capecchi, 1992). En la bibliografia hi ha reportades diverses estratègies amb longituds dels braços molt variables (Cheng *et al.*, 2003). Els braços d'homologia que vam utilitzar per dirigir la recombinació homòloga eren de 4 i 3.4kb respectivament, una longitud considerada suficient com per permetre la recombinació homòloga.

3. Preparació de la construcció a partir de DNA isogènic

En l'estudi de Deng i Capecchi demostraven que la recombinació homòloga augmentava si el DNA utilitzat per generar la construcció era obtingut de la mateixa soca que les cèl·lules mare de destí (Deng i Capecchi, 1992). Per això, en aquest treball es van amplificar tant els braços d'homologia com l'exó 2 amb les seves respectives zones intròniques a partir de DNA genòmic de la soca de ratolí 129SvEv.

4. Disseny del futur genotipat dels clons i dels animals

Vam dissenyar una estratègia de PCR amb diferents combinacions d'oligonucleòtids per genotipar les cèl·lules mare embrionàries que ens van enviar del CBATEG (Figura R12). En aquesta estratègia es van utilitzar un oligonucleòtid *forward* dins de la construcció també present en el locus genòmic *wild type* i un *reverse* fora de la construcció que hibridés també en el locus genòmic *wild type*. D'aquesta manera podríem diferenciar la recombinació homòloga de l'heteròloga, ja que si s'havia produït la recombinació homòloga veuríem dues bandes. Tot i que les bandes eren

d'una mida elevada, vam utilitzar una Taq polimerasa d'alta processivitat podia amplificar fins a 13kb.

En vista que tots els clons amplificats presentaven només la banda corresponent a la seqüència *wild type*, vam intentar una segona estratègia posant l'oligonucleòtid *forward* al final del gen de selecció amb el mateix oligonucleòtid *reverse*, de manera que la banda esperada seria més petita. El problema d'aquesta estratègia era que no disposàvem de control positiu, ja que aquest seria la disposició genòmica esperada. Tot i així, vam analitzar tots els clons i no va aparèixer cap banda. Si haguéssim obtingut algun clon positiu mitjançant aquesta estratègia haguéssim procedit a comprovar la resta de la construcció (braç 5') per PCR i, finalment, haguéssim comprovat la correcta disposició gènica per *Southern Blot*. En aquestes estratègies és molt important comprovar que la integració de la construcció ha estat completa i que manté els llocs loxP.

Malauradament, com ja s'ha explicat el fenomen de recombinació homòloga no es va produir, malgrat que vam tenir en compte tots els aspectes per incrementar-la. Cal dir que aquest fenomen és poc freqüent i molt variable en funció del locus del genoma on es troba el gen d'interès. En aquest sentit, ens vam interessar pels treballs realitzats pel consorci internacional de generació de ratolins *knockout* (IKMC). L'IKMC és un consorci internacional que té per objectiu mutar tots els gens del genoma de ratolí que codifiquen per proteïnes, per tal de donar l'oportunitat als investigadors de generar *knockout* condicionals de tots els gens. En aquest consorci s'utilitzen tan tècniques de *gene targeting* com de *gene trapping*. És important constatar que fins a aquest any, l'IKMC no havia obtingut cap clon positiu pel gen *Hmgcs2*, malgrat que han electroporat dues construccions similars a la nostra.

En aquests moments, l'IKMC disposa d'un clon de cèl·lules mare embrionàries en el qual la recombinació homòloga s'ha produït correctament i la construcció que han utilitzat té un disseny similar a la nostra, amb uns braços d'homologia de 4.5kB i 5.4kb respectivament. Tanmateix, el clon no té el lloc loxP a 3' de l'exó 2, fet que significa que ha perdut la capacitat de ser condicional, així doncs, en aquests moments, només hi ha la possibilitat de generar un *knockout* total del gen *Hmgcs2*.

DISCUSSIÓ

Arribats en aquest punt i amb els resultats obtinguts vam aturar el projecte. Es podria plantejar la possibilitat de generar un *knockout* total amb aquest clon tot i que es desconeix si l'HMGCS2 té un paper en el desenvolupament embrionari. En rates, l'activitat HMGCS2 hepàtica i la cetogènesi en l'estat fetal són baixes, però s'indueixen fortament en el moment del naixement fins a assolir un pic el dia postnatal 15, disminuint posteriorment fins als nivells de l'adult (Lockwood i Bailey, 1971). En humans, la deficiència genètica d'HMGCS2 (OMIM 600234) que s'ha detectat en alguns infants cursa amb hipoglucèmia hipocetòtica i pot arribar a provocar el coma si no es diagnostica. Cal remarcar que aquesta patologia només es manifesta quan els individus són sotmesos a un dejuni perllongat i per tant, és possible que el *knockout* total d'*Hmgcs2* fós viable sota un control estricte de l'alimentació de les cries.

Finalment, per aprofundir en l'estudi del paper de l'HMGCS2 i dels cossos cetònics en els diferents teixits on s'expressa seria de gran interès disposar d'un clon que pogués generar un animal *knockout* teixit específic.

III. REGULACIÓ A LA BAIXA DE FORMA AGUDA EN FETGE DEL GEN HMGCS2

1. LA INJECCIÓ D'ADENOVIRUS QUE CODIFIQUEN PER UN shRNA ESPECÍFIC CONTRA HMGCS2 DISMINUEIX ELS NIVELLS HEPÀTICS DE PROTEÏNA I DE L'ACTIVITAT HMGCS2

Com a estratègia alternativa, per estudiar l'efecte de l'HMGCS2 sobre l'homeòstasi metabòlica, ens vam plantejar regular a la baixa el gen *HMGCS2* en fetge de ratolins, de manera aguda, utilitzant la infecció amb un adenovirus que codifica per un *short hairpin RNA* (shRNA) específic per HMGCS2 de ratolí.

Vam estudiar l'efecte de la regulació a la baixa del gen durant el dejuni perquè en aquestes condicions l'activitat de la proteïna és més elevada degut a què els nivells de succinil-CoA són més baixos (Quant *et al.*, 1989). Com s'explica en el capítol de resultats, utilitzant aquesta estratègia es van aconseguir disminuir els nivells de proteïna HMGCS2 de manera significativa i aquesta reducció es correlaciona amb una menor activitat HMGCS2 (Figures R14 i R15).

2. ELS NIVELLS CIRCULANTS DE COSSOS CETÒNICS DISMINUEIXEN UN 25%

Els nivells de cossos cetònics en dejú dels ratolins injectats eren de l'ordre d'1mM. És important destacar que existeix una correlació linial positiva entre els nivells de cossos cetònics dels animals injectats i l'activitat HMGCS2 dels mitocondris aïllats, aportant una evidència més que l'enzim HMGCS2 és l'enzim clau de la producció de cossos cetònics (Figura R16B) (Ayté *et al.*, 1990; Casals *et al.*, 1992; Gil-Gómez *et al.*, 1993).

En humans, la deficiència d'HMGCS2 només es manifesta en situacions d'estrés, com per exemple el dejuni perllongat (Aledo *et al.*, 2001, Zschocke *et al.*, 2002). D'altra banda, ratolins *knockout* de PPAR α dejunats 24h presenten una disminució molt significativa dels cossos cetònics circulants i una clara esteatosi hepàtica (Leone *et al.*, 1999). Els nostres resultats demostren que els ratolins shRNA HMGCS2 presenten una reducció dels nivells sèrics de cossos cetònics d'un 25% (Figura R16A). Tanmateix, aquesta reducció, tot i que significativa, no va alterar l'estat general dels animals, ni va modificar l'aspecte dels fetges que, aparentment no presentaven esteatosi hepàtica.

3. EXISTEIX UNA CORRELACIÓ NEGATIVA ENTRE ELS NIVELLS DE COSSOS CETÒNICS CIRCULANTS I LA PÈRDUA DE PES CORPORAL EN EL DEJUNI

Tots els organismes han de mantenir el balanç energètic per sobreviure als canvis ambientals. En organismes superiors, per tal de mantenir l'homeòstasi, en situacions d'abundància de nutrients s'emmagatzema l'energia en forma de greixos. Tanmateix, l'emmagatzematge excessiu d'energia en forma de greixos deguda a una disminució de la despesa energètica o a un augment de la ingesta calòrica, o a ambdós alhora, provoca sobrepès i obesitat.

Per tal d'evitar el sobrepès, durant les últimes dècades s'han desenvolupat diferents aproximacions dietètiques per disminuir el pes corporal. Així, per exemple, durant els anys 1970 van sorgir les dietes riques en greixos i baixes en carbohidrats per reduir el pes corporal que tenien com a efecte secundari un increment notable d'àcids grassos saturats i colesterol plasmàtics (Veech, 2004). Més recentment, dietes, com

DISCUSSIÓ

l'Atkins, que es basen en un contingut molt baix de carbohidrats i/o ric en proteïnes han demostrat efectes significatius en la disminució del pes corporal i de la ingesta sense augmentar els nivells de colesterol plasmàtics (Johnstone *et al.*, 2008; Westman *et al.*, 2002). En tots els casos però, aquestes aproximacions dietètiques condueixen a un increment en la producció de cossos cetònics.

L'efecte dels cossos cetònics sobre el control de la ingesta i el pes corporal i els mecanismes implicats en aquesta regulació són motiu d'extensa investigació. Així, per exemple, s'ha demostrat que l'administració d'un èster de β -hidroxibutirat afegit a la dieta de rates Wistar incrementa els nivells de malonil-CoA a nivell del sistema nerviós central i provoca una reducció de la ingesta (Kashiwaya *et al.*, 2010). Recentment, s'ha demostrat que un panagonista dels PPAR (un agonista que activa els tres isotips de PPAR) disminueix la ingesta i el pes corporal, i aquest efecte es correspon amb un augment dels nivells de β -hidroxibutirat circulants en ratolins (Perreault *et al.*, 2010).

Amb aquests antecedents vam analitzar si la disminució dels cossos cetònics circulants produïa algun efecte sobre el pes corporal dels animals. En el nostre model experimental, no vam observar diferències significatives en el pes corporal dels animals entre els animals shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2. És possible que la regulació a la baixa de l'HMGCS2 de forma aguda no sigui suficient per observar un efecte dels cossos cetònics sobre la ingesta o el pes corporal, ja que els estudis que demostren aquest efecte s'han realitzat administrant els cossos cetònics en la dieta durant diverses setmanes..

Tanmateix, els nostres resultats sí que indiquen que en dejuni, existeix una correlació negativa entre els nivells de cossos cetònics i la pèrdua de pes corporal (Figura R17). Aquests resultats coincideixen amb estudis que demostren que el β -hidroxibutirat és un substrat energètic més eficient que la glucosa (Kashiwaya *et al.*, 1994). Així, una concentració de cossos cetònics més elevada permetria obtenir més eficientment energia dels substrats disponibles, i evitaria el consum excessiu de proteïnes i, per tant, la pèrdua de pes seria menor.

5. LA REDUCCIÓ DELS COSSOS CETÒNICS CIRCULANTS D'UN 25% NO PROVOCA EFECTES EN EL TEIXIT ADIPÓS

En condicions de manca de nutrients, augmenten els nivells d'adrenalina, que interaccionen amb receptors β -adrenèrgics en el teixit adipós. Aquest senyal provoca una activació de les lipases, que catalitzen la degradació dels triacilglicerols emmagatzemats en aquest teixit i s'alliberen àcids grassos al torrent sanguini. Tanmateix, una lipòlisi excessiva condueix a una acumulació d'àcids grassos excessiva en múscul esquelètic i fetge, fet que pot arribar a provocar resistència a insulina per un mecanisme de lipotoxicitat (Boden, 2006).

El β -hidroxibutirat es va descriure com a lligand endogen del receptor acoplat a proteïna Gi GPR109A (PUMA) en teixit adipós (Taggart *et al.*, 2005). En aquest treball demostren que el tractament d'adipòcits amb β -hidroxibutirat inhibeix la lipòlisi i disminueix els nivells de NEFAs alliberats. Els autors suggereixen un mecanisme de retroalimentació pel qual els cossos cetònics evitarien la depleció completa de les reserves del teixit adipós mitjançant la inhibició de la lipòlisi. El mecanisme d'acció proposat és a través de l'activació del receptor GPR109A que inhibeix l'adenilat ciclase reduint els nivells d'AMPc i, per tant, disminuint l'activitat de la PKA, que finalment inhibirà l'activitat de la lipasa sensible a hormones (HSL) i la lipòlisi en el teixit adipós (Ahmed *et al.*, 2009). Fins ara, no s'ha demostrat que els nivells circulants de β -hidroxibutirat afectin la fosforilació de l'HSL.

Com s'ha mostrat en l'apartat anterior, els animals que presentaven uns nivells sèrics de cossos cetònics majors havien perdut menys pes durant el dejuni (Figura R17), fet que podria ser degut, en part, a una menor activitat lipolítica. Per comprovar aquesta hipòtesi, vam analitzar si la disminució de cossos cetònics circulants produïa un augment de la fosforilació de la HSL en el teixit adipós i un augment dels àcids grassos circulants. Els nostres resultats no mostren canvis en els nivells de fosforilació d'aquest enzim (Figura R18). És possible que una disminució del 25% dels cossos cetònics circulants no sigui suficient per alterar la regulació d'aquests sobre els seus teixits diana. De fet, tampoc observem diferències significatives en els nivells de NEFAs entre els dos grups experimentals (Figura R19).

DISCUSSIÓ

Un animal *knockout* d'*Hmgcs2* seria un bon model per estudiar si els nivells de fosforilació de la lipasa sensible a hormones es veuen modificats pels nivells de cossos cetònics i ens permetria confirmar *in vivo*, el mecanisme de retroalimentació proposat per diversos grups.

6. EFECTE DE LA DISMINUCIÓ DELS COSSOS CETÒNICS CIRCULANTS SOBRE L'EXPRESSIONI DE GENS IMPLICATS EN EL METABOLISME ENERGÈTIC.

6.1. *Fgf21*

FGF21 té un paper molt important en l'adaptació al dejuni (Estall et al., 2009; Kharitononkov i Larsen, 2010; Potthoff et al., 2009). Així, els seus nivells hepàtics en un dejuni perllongat es troben molt induïts i són diversos els factors descrits que regulen la seva expressió (Introducció apartat IV). En aquest sentit, resultats del nostre grup confirmen que *Fgf21* i *Hmgcs2* s'indueixen paral·lelament en el procés d'adaptació al dejuni en ratolins (mantenint una elevada expressió durant l'etapa tardana), correlacionant-se amb el patró d'inducció de cossos cetònics (Badman et al., 2007; Sunny et al., 2010). A més a més, ambdós gens són fortament activats per PPAR α , un màster regulador de la resposta al dejuni.

El nostre objectiu ha estat investigar el paper de la cetogènesi sobre l'expressió d'FGF21 *in vivo*. En el capítol de resultats es mostra com una reducció del 25% dels cossos cetònics provoca una tendència a l'alça, tot i que no significativa, de l'expressió d'*Fgf21* (Figura R20), una regulació que va en sentit contrari de l'observat en cèl·lules HepG2. Les cèl·lules HepG2 són cèl·lules transformades que han perdut part de la senyalització cel·lular; en canvi, un animal dejunat 24h posa en funcionament tots els mecanismes de regulació necessaris per sobreviure. Per tant, és possible que, *in vivo*, els mecanismes que regulen FGF21 durant el dejuni emmascarin la possible regulació d'HMGCS2 sobre aquest gen, o inclús que s'activin mecanismes de compensació. A més a més, com que la regulació a la baixa d'HMGCS2 i dels cossos cetònics no ha estat completa, és possible que aquests canvis no siguin suficients per observar diferències significatives en la regulació del gen *Fgf21 in vivo*.

D'altra banda, hi ha diversos estudis que han intentat relacionar l'expressió d'FGF21 amb la cetogènesi, però existeix una gran controvèrsia. Així, d'una banda, el treball d'Inagaki *et al* demostra que tant la sobreexpressió d'FGF21 com l'administració de l'hormona indueixen la cetogènesi en ratolins alimentats però no en ratolins dejunats (Inagaki *et al.*, 2007). Un segon treball per contra, mostra com ratolins *knockout* d'*Fgf21* presenten una disminució de la cetogènesi hepàtica en dejú, suggerint un paper clau d'FGF21 en la inducció d'aquesta via en aquestes condicions (Potthoff *et al.*, 2009). Aquestes dades podrien explicar, en part, els nostres resultats on l'expressió d'FGF21 *in vivo* estaria induïda per un mecanisme independent a l'HMGCS2 per tal de compensar la disminució de cossos cetònics en els animals shRNA HMGCS2. Aquest mecanisme podria funcionar a través de l'activació de la lipòlisi en el teixit adipós que condueix a un augment de substrat disponible per la β -oxidació i la cetogènesi hepàtiques (Inagaki *et al.*, 2007). En aquest cas es tractaria d'un mecanisme de retroalimentació positiva pel qual l'HMGCS2 estimularia l'expressió d'FGF21 (regulació que no hem pogut determinar *in vivo*, però sí *in vitro*) que alhora induiria la cetogènesi.

Tanmateix, en el treball de Hotta *et al*, mitjançant un altre *knockout* d'FGF21, mostra que la regulació a la baixa del gen *Fgf21* no afecta a la producció de cossos cetònics en dejú, ni als nivells del gen regulador de la via, *Hmgcs2*, suggerint que l'expressió d'FGF21 no és necessària per la producció de cossos cetònics ni per la inducció de l'expressió del gen *Hmgcs2* durant el dejuni (Hotta *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2007; Potthoff *et al.*, 2009). És possible que, almenys part d'aquestes divergències, siguin degudes a la utilització de diferents protocols de manipulació animal.

En qualsevol cas, el paper d'FGF21 sobre la cetogènesi i l'efecte de la cetogènesi sobre l'expressió d'FGF21, així com els mecanismes moleculars implicats en aquesta regulació requereix de futures investigacions.

6.2. *Cpt1a*

La CPT1A constitueix el pas limitant de l'entrada dels àcids grassos a la matriu mitocondrial per ser β -oxidats i per tant un punt clau en el control del metabolisme lipídic (McGarry i Brown, 1997). Dels experiments duts a terme podem dir que ni els nivells d'mRNA de *Cpt1a*, ni l'activitat CPT total mesurada en mitocondris aïllats de fetge dels ratolins injectats no varien *in vivo* quan regulem a la baixa l'HMGCS2 (Figura R21). Aquest resultat és consistent amb els nostres resultats en cèl·lules HepG2 on l'expressió d'aquest gen no es veu modificada ni per una regulació a la baixa ni per una sobreexpressió d'HMGCS2.

Aquests resultats no ens permeten descartar que l'HMGCS2 tingui un efecte sobre l'oxidació dels àcids grassos per sota de l'entrada dels àcids grassos a la mitocondri, guanyant pes la hipòtesi d'un efecte metabòlic pel qual la cetogènesi disminueix la concentració d'acetil-CoA a la matriu mitocondrial i provoca una "desinhibició" de les acil-CoA deshidrogenases (Duée *et al.*, 1994).

6.3. *Pck1*

Le May *et al* van proposar en el seu treball que una reducció de la β -oxidació podria disminuir la gluconeogènesi, ja que les concentracions mitocondrials d'acetil-CoA i dels cofactors NADH i FADH₂ necessaris per l'activació d'aquesta via serien inferiors (Le May *et al.*, 2000). De fet, pacients que presenten deficiències de l'enzim HMGCS2, presenten una greu hipoglucèmia en situacions de descompensació metabòlica com un dejuni perllongat (Aledo *et al.*, 2006). Al contrari, la gluconeogènesi i la cetogènesi s'activen de manera consecutiva en el procés d'adaptació al dejuni (Cahill, 2006), suggerint que podria existir un mecanisme d'inhibició de la segona via sobre la primera. En aquest sentit, l'increment de la cetogènesi provocaria una disminució dels nivells d'acetil-CoA mitocondrials, un activador al·lostèric de la piruvat carboxilasa, el primer pas de la gluconeogènesi (Attwood, 1995), apuntant així a una regulació a la baixa de la gluconeogènesi per part de l'activitat HMGCS2.

Per això vam analitzar l'expressió d'un dels gens claus de la via gluconeogènica: *Pck1*. Els nostres resultats mostren que no hi ha diferències significatives en l'expressió del gen *Pck1* entre els ratolins shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2 ni en els nivells de glucosa circulants (Figura R22).

Aquesta hipòtesi podria ser finalment confirmada o descartada en un model *knockout* d'HMGCS2 en el qual podríem analitzar la producció hepàtica de glucosa.

6.4. Anàlisi massiu d'expressió gènica.

Donat que els cossos cetònics poden exercir un paper senyalitzador i en el nostre model animal (shRNA inespecífic i shRNA HMGCS2) n'havíem reduït significativament els nivells circulants, vam decidir realitzar un estudi massiu de l'expressió gènica per tal d'investigar si a nivell hepàtic hi havia alguna via de senyalització afectada. D'entre els gens que s'expressaven de manera diferencial, vam decidir aprofundir en l'estudi de dos gens implicats en el metabolisme energètic que estaven regulats a l'alça quan l'activitat HMGCS2 era menor: *Sult1E1* i *Fsp27/CIDEA* (Figura R23).

Sult1E1 és un enzim de fase II del metabolisme amb activitat sulfotransferasa, que s'encarrega de sulfatar específicament als estrògens inactivant-los (Falany, 1997). Els estrògens actuen a través dels seus receptors nuclears ER α i ER β , receptors clàssics que quan uneixen al seu lligand transloquen al nucli afectant la transcripció dels seus gens diana. S'ha descrit que els estrògens estimulen l'activitat d'alguns enzims del cicle de Krebs (Beckett *et al.*, 2002; Stirone *et al.*, 2005) i que indueixen la β -oxidació d'àcids grassos (Kamei *et al.*, 2005; Nemoto *et al.*, 2000; Paquette *et al.*, 2009). D'acord amb els nostres resultats de l'estudi massiu d'expressió gènica, quan l'activitat HMGCS2 és menor, observem una inducció d'un gen implicat en la inactivació dels estrògens, fet que provocaria una disminució de la concentració d'estrògens actius, que podria conduir a una disminució de la β -oxidació dels àcids grassos. Per tant, tindria sentit que, per algun mecanisme que desconeixem, l'HMGCS2 estigués afectant la via de senyalització dels estrògens a través de modular l'expressió de l'enzim que els inactiva.

DISCUSSIÓ

Cal mencionar però que tot i que l'ús de *microarrays* per l'anàlisi massiu d'expressió gènica constitueix una eina important per detectar nous mecanismes de regulació gènica, és important confirmar els resultats obtinguts amb tècniques més sensibles com la PCR quantitativa a temps real. Així, per exemple, la regulació per HMGC2 del gen *Sult1E1* no es va confirmar per PCR quantitativa suggerint que és un fals positiu d'aquest assaig (Figura R24).

IV. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DEL GEN FSP27/CIDEC

El gen *Fat specific protein 27* (Fsp27), en ratolins, o *Cell death-inducing DNA fragmentation factor-45-like effector* (CIDE) C, en humans, pertany a la família de proteïnes CIDE. És un regulador important de l'homeòstasi energètica i les seves funcions estan relacionades amb el desenvolupament de desordres metabòlics com l'obesitat, la diabetis o l'esteatosi hepàtica (Matsusue, 2010) (Introducció VI).

L'expressió i la funció del gen *Fsp27/CIDEC* en teixit adipós ha estat ben caracteritzada. En aquest teixit, FSP27/CIDEC permet l'emmagatzematge de lípids en forma de gotes lipídiques. En canvi, la funció i la regulació del gen *Fsp27/CIDEC* en fetge no està clara, tot i que s'ha descrit que la seva expressió està induïda en situacions d'esteatosi hepàtica (Matsusue *et al.*, 2008; Nishino *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2003). En ratolins sotmesos a una dieta rica en greixos, l'administració de β -conglucininina, una proteïna derivada de la soja, protegeix aquests animals de l'esteatosi hepàtica alhora que disminueix l'expressió hepàtica d'*Fsp27* (Yamazaki *et al.*, 2011). També s'ha descrit que la sobreexpressió d'*Fsp27* en un cultiu d'hepatòcits disminueix l'oxidació mitocondrial d'oleat i incrementa l'acumulació de triglicèrids (TGs) i el nombre de gotes lipídiques (Matsusue *et al.*, 2008). En aquest sentit, s'ha publicat que la sobreexpressió hepàtica de la lipasa de triglicèrids del teixit adipós (ATGL) o de la HSL provoca un increment de l'oxidació d'àcids grassos en aquest teixit i una millora de l'esteatosi hepàtica (Reid *et al.*, 2008). Contràriament, ratolins *knockout* específics de fetge de l'ATGL presenten una disminució de l'oxidació d'àcids grassos que va acompanyada d'un increment de l'acumulació de TGs en aquest teixit (Wu *et al.*, 2011).

Tots aquests antecedents suggereixen que l'acumulació de TGs en fetge afecta l'oxidació d'àcids grassos. En aquest sentit, els resultats obtinguts en ratolins dejunats 24h suggereixen que una disminució de l'oxidació dels àcids grassos deguda a una disminució de la cetogènesi, incrementa l'expressió del gen *Fsp27* tant *in vivo* (Figura R25) com *in vitro* (Figura R26), suggerint que la cetogènesi podria tenir un paper en l'acumulació hepàtica de TGs.

Fsp27 és un gen regulat pel factor de transcripció PPAR γ a través d'un PPRE present en el seu promotor on s'hi uneix amb alta afinitat (Matsusue *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2003). En el mateix treball descriuen que l'heterodímer PPAR α /RXR α també s'uneix al PPRE del promotor, tot i que amb menor afinitat. En aquest sentit, experiments d'expressió gènica massiva indiquen que *Fsp27* es troba induït per PPAR α (Rakhshandehroo *et al.*, 2010, 2007). D'acord amb el publicat, els nostres resultats amb cèl·lules HepG2 demostren que existeix una regulació del gen *CIDEA* per PPAR α , ja que la seva expressió es troba significativament induïda per la sobreexpressió de PPAR α i, al contrari, disminuïda quan es regula a la baixa PPAR α (Figura R27).

Davant d'aquestes dades, vam analitzar l'expressió del gen *Fsp27* durant el dejuni, una situació fisiològica en la qual hi ha un gran aport d'àcids grassos al fetge i on la capacitat transactivadora de PPAR α és màxima. A més a més, durant el dejuni el fetge capta del torrent sanguini els àcids grassos lliures alliberats pel teixit adipós i un 40% són convertits en cossos cetònics o oxidats a CO₂ i el 60% restant són reesterificats a triglicèrids i empaquetats en forma de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) per ser transportats de tornada al teixit adipós o a altres teixits (com el múscul) per ser metabolitzats (Hanson i Reshef, 2003). En aquest sentit, s'ha demostrat que un membre de la família CIDE, CIDEA, que s'expressa majoritàriament al fetge, està directament implicat en la lipidació i maduració de les VLDL a través de la seva interacció amb apoB-100/-48. Un dejuni de 16h incrementa l'acumulació hepàtica de TGs i aquesta acumulació és major en ratolins *knockout* de CIDEA en aquesta condició (Ye *et al.*, 2009). Aquests antecedents podrien explicar la forta inducció del gen *Fsp27* durant el dejuni (Figura R28), suggerint una funció d'*FSP27/CIDEA* en la reesterificació o l'emmagatzematge dels àcids grassos.

DISCUSSIÓ

D'altra banda, la cinètica de dejuni suggereix que FSP27 té un paper important en la fase inicial del dejuni (primeres 15h) on hi ha un pic d'expressió (Figura R28), però no tant en el dejuni perllongat, ja que la seva expressió disminueix a les 24h. Així doncs, FSP27/CIDEC participaria en l'emmagatzematge o reesterificació de lípids exercint un paper protector en l'inici del dejuni, quan es produeix una arribada massiva d'àcids grassos al fetge. En canvi, etapes posteriors del dejuni, quan ja s'ha activat la cetogènesi, els cossos cetònics constitueixen el mecanisme d'evacuació d'àcids grassos del fetge i, per tant, ja no és necessari l'emmagatzematge d'àcids grassos i els nivells d'*Fsp27* disminuirien. Concretament, en la literatura està reportat que els nivells de cossos cetònics en ratolins augmenten a partir de les 15h de dejuni (Badman *et al.*, 2007; Sunny *et al.*, 2010). A més a més, resultats del nostre grup demostren que en ratolins, l'expressió del gen *Hmgcs2* i dels gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos (*Cpt1a*, *Cpt2* i *Cact*) s'indueix a partir de les 6h de dejuni i es manté elevada a les 24h. Amb aquestes observacions proposem que l'activació d'HMGCS2 i de l'oxidació dels àcids grassos reprimiria l'expressió de *Fsp27/CIDEC* per tal de disminuir l'acumulació de TGs en el fetge, que ja no és necessària quan es sintetitzen activament els cossos cetònics (Figura D2).

Aquesta hipòtesi és suportada pels nostres resultats, on una reducció dels cossos cetònics circulants després de regular a la baixa l'HMGCS2, provoca la inducció del gen *Fsp27*, probablement promovent l'emmagatzematge i reesterificació de lípids en els hepatòcits. Aquest fet també explicaria que no observem canvis en els nivells de NEFAs circulants ja que aquests quedarien retinguts al fetge.

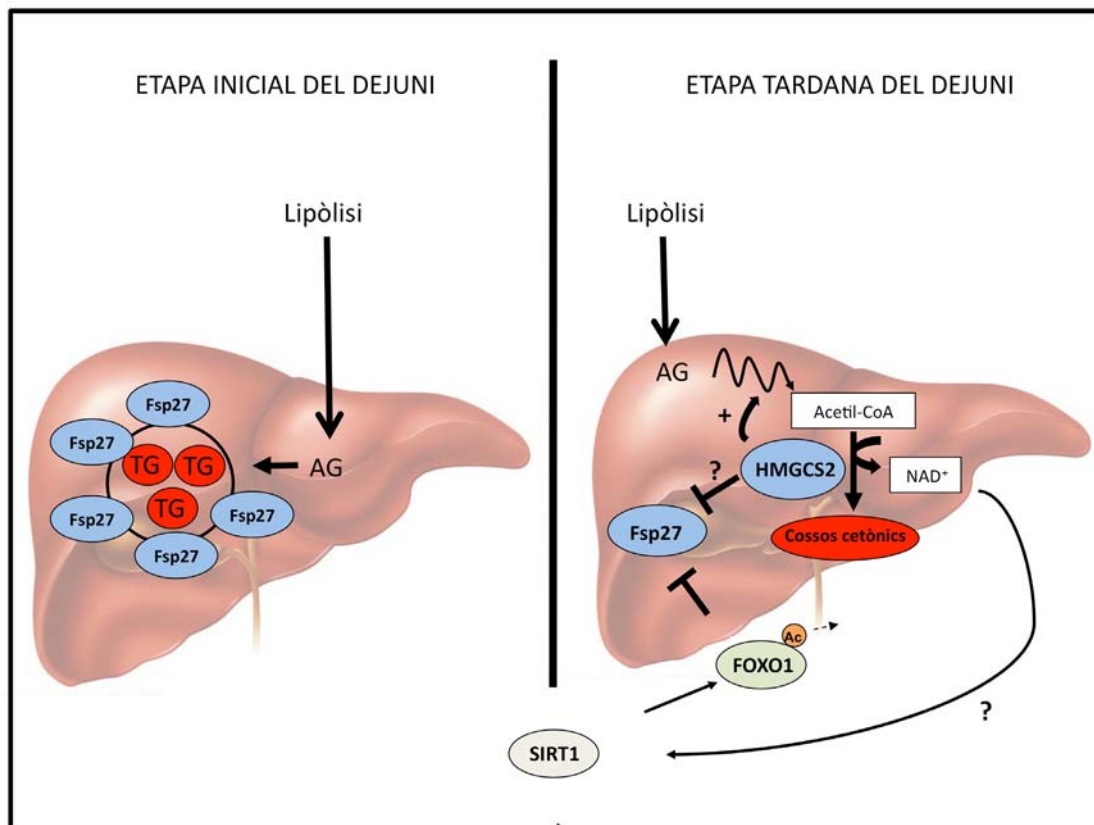


Figura D 2. Hipòtesi sobre el significat fisiològic de la regulació del gen *Fsp27* per l'activitat *HMGCS2* i la cetogènesi. En l'etapa inicial del dejuni, els àcids grassos (AG) provinents de la lipòlisi serien reesterificats a TGs que s'emmagatzemarien en gotes lipídiques gràcies a FSP27. Passades les 15h de dejuni, l'oxidació d'àcids grassos és activa i la cetogènesi també. En aquesta situació l'augment de l'activitat HMGCS2 reprimiria l'expressió del gen *Fsp27*. A més a més, en aquesta situació SIRT1 desacetila FOXO1 i l'activa, fet que reprimeix l'activació transcripcional mitjançada per PPAR α d'*Fsp27*.

D'altra banda, s'ha proposat, que durant la fase tardana del dejuni, SIRT1 desacetila el factor de transcripció FOXO1, activant-lo (Liu *et al.*, 2008). Existeixen diverses evidències que l'activitat transcripcional de FOXO1 està implicada en l'aparició d'esteatosi hepàtica. Així, els ratolins *knockout* de PTEN, una fosfatasa que desfosforila FOXO1 i promou la seva translocació nuclear (Nakamura *et al.*, 2000), desenvolupen esteatosi hepàtica (Horie *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2000). En aquest mateix sentit, un estudi molt recent mostra com ratolins *knockout* triples de FOXO1, 3 i 4 presenten una acumulació de TGs en fetge amb una dieta estàndard, i desenvolupen esteatosi hepàtica quan són sotmesos a una dieta rica en greixos (Tao *et al.*, 2011).

Amb tot això, proposem que en la fase tardana del dejuni, FOXO1, que es troba desacetilat per SIRT1 i al nucli perquè els nivells d'insulina són baixos, regularia diferencialment l'expressió de l'*HMGCS2* i d'*Fsp27*. Diversos treballs suggereixen que

DISCUSSIÓ

FOXO1 pot funcionar com un activador transcripcional en algunes situacions i com un repressor en altres. Concretament, s'ha descrit que el context del promotor és essencial per determinar l'efecte positiu o negatiu de FOXO1 sobre la capacitat transactivadora d'altres factors de transcripció, com per exemple HNF-4, sobre els seus gens diana (Hirota *et al.*, 2008).

Així, quan els nivells d'insulina són baixos i per tant la via de la PI3K/AKT està apagada (en dejú, per exemple), FOXO1 activa la transcripció del gen *HMGCS2* a través d'un IRS present en el seu promotor (Nadal *et al.*, 2002). Així en un dejuni tardà, FOXO1 i PPAR α podrien actuar de manera sinèrgica sobre el promotor de l'*HMGCS2* i contribuir a activar la síntesi de cossos cetònics necessària per mantenir la viabilitat de l'organisme. Paral·lelament, en el promotor del gen *Fsp27* on també hi ha un PPRE, però no s'ha descrit cap element de resposta a FOXOs, podria ser que FOXO1 interaccionés amb PPAR sobre el promotor d'*Fsp27*, disminuint-ne la seva capacitat transactivadora, reduint així l'expressió del gen *Fsp27* per evitar l'acumulació innecessària d'àcids grassos al fetge (Figura D2).

Segons els nostres resultats, en cèl·lules HepG2, FOXO1 reprimeix l'activació transcripcional de PPAR α sobre el gen *CIDEA* (Figura R29), de manera directa o indirecta, mitjançant la interacció amb PPAR α . A més a més, els resultats d'aquest treball en cèl·lules HepG2 suggereixen que l'activitat *HMGCS2* pot afectar l'activitat de SIRT1 i en el present context, l'activació de SIRT1 provocaria una major desacetilació de FOXO1 i una disminució de l'expressió d'*Fsp27*, suggerint un possible mecanisme pel qual l'activitat *HMGCS2* regula l'expressió d'*Fsp27*.

CONCLUSIONS

I. PAPER DEL GEN *HMGCS2* SOBRE L'OXIDACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS I EXPRESSIÓ GÈNICA EN LA LÍNIA HEPG2

- 1) L'expressió del gen *HMGCS2* és necessària per la inducció de la β -oxidació mitjançada per PPAR α .
- 2) *HMGCS2* no actua com un coactivador directe de PPAR α perquè *HMGCS2* i PPAR α no interaccionen.
- 3) L'*HMGCS2* regula positivament l'expressió del gen *FGF21*, un gen diana de PPAR α implicat en el metabolisme energètic.
- 4) L'*HMGCS2*, a través de la producció d'acetoacetat, regula l'expressió del gen *FGF21* a través d'un mecanisme que depèn de SIRT1

II. ANÀLISI DEL FENOTIP DE LA REGULACIÓ A LA BAIXA DEL GEN *Hmgcs2* *in vivo*

- 5) S'ha produït una construcció per generar un *knockout* teixit específic
- 6) La construcció ha estat electroporada i els clons obtinguts genotipats. No s'ha produït la recombinació homòloga.

Mitjançant l'estratègia alternativa de la injecció d'adenovirus que codifiquen per un shRNA específic contra *HMGCS2*:

- 7) S'ha disminuït l'activitat *HMGCS2* hepàtica un 50%.
- 8) S'han disminuït els cossos cetònics circulants un 25%.
- 9) Aquesta disminució no afecta significativament als nivells d'àcids grassos circulants ni a l'estat de fosforil·lació de la HSL en el teixit adipós blanc.
- 10) Aquesta disminució no provoca canvis en la glucèmia.
- 11) Aquesta disminució no afecta significativament l'expressió dels gens *Fgf21*, *Cpt1a* i *Pck1* ni a l'activitat CPT.
- 12) La disminució de l'activitat *HMGCS2* i dels cossos cetònics circulants provoca una inducció significativa dels nivells d'mRNA del gen *Fsp27/CIDEA*.

CONCLUSIONS

- 13) La regulació a la baixa d'HMGCS2 en cèl·lules HepG2 confirma aquests inducció.
- 14) El gen *CIDEA* és transcripcionalment induït per PPAR α .
- 15) FOXO1 reprimeix la transactivació del gen *CIDEA* mitjançada per PPAR α .
- 16) El gen *Fsp27* és transcripcionalment activat durant el dejuni, presentant un pic d'inducció a les 15h de dejuni i disminuïnt a les 24h de dejuni.

BIBLIOGRAFIA

A

Aguiló, F., Camarero, N., Relat, J., Marrero, P.F., and Haro, D. (2010). Transcriptional regulation of the human acetoacetyl-CoA synthetase gene by PPARgamma. *Biochem J* 427, 255-264.

Ahmed, K., Tunaru, S., and Offermanns, S. (2009). GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 30, 557-562.

Aledo, R., Mir, C., Dalton, R., Turner, C., Pié, J., Hegardt, F., Casals, N., and Champion, M. (2006). Refining the diagnosis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 29, 207-211.

Aledo, R., Zschocke, J., Pié, J., Mir, C., Fiesel, S., Mayatepek, E., Hoffmann, G., Casals, N., and Hegardt, F. (2001). Genetic basis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. *Hum Genet* 109, 19-23.

An, J., Muoio, D.M., Shiota, M., Fujimoto, Y., Cline, G.W., Shulman, G.I., Koves, T.R., Stevens, R., Millington, D., and Newgard, C.B. (2004). Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* 10, 268-274.

Anderson, G.J., and Connor, W.E. (1988). Uptake of fatty acids by the developing rat brain. *Lipids* 23, 286-290.

Arias, G., Asins, G., Hegardt, F.G., and Serra, D. (1998). The effect of dexamethasone treatment on the expression of the regulatory genes of ketogenesis in intestine and liver of suckling rats. *Mol Cell Biochem* 178, 325-333.

Arner, P., Pettersson, A., Mitchell, P.J., Dunbar, J.D., Kharitonov, A., and Rydén, M. (2008). FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Lett* 582, 1725-1730.

Attwood, P.V. (1995). The structure and the mechanism of action of pyruvate carboxylase. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 231-249.

Auestad, N., Korsak, R.A., Morrow, J.W., and Edmond, J. (1991). Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 56, 1376-1386.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates and Wiley-Interscience).

Ayté, J., Gil-Gómez, G., Haro, D., Marrero, P.F., and Hegardt, F.G. (1990a). Rat mitochondrial and cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases are encoded by two different genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3874-3878.

Ayté, J., Gil-Gómez, G., and Hegardt, F.G. (1990b). Nucleotide sequence of a rat liver cDNA encoding the cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. *Nucleic Acids Res* 18, 3642.

B

Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 5, 426-437.

Bai, P., Cantó, C., Oudart, H., Brunyánszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R.H., *et al.* (2011). PARP-1 Inhibition Increases Mitochondrial Metabolism through SIRT1 Activation. *Cell Metab* 13, 461-468.

Barbera, M., Schluter, A., Pedraza, N., Iglesias, R., Villarroya, F., Giralt, M (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link

BIBLIOGRAFIA

between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 276 (2), 1486-1493.

Barrero, M. Tesi Doctoral (2001). Mecanismos de control en la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y la cetogénesis (Universitat de Barcelona).

Barrero, M.J., Alho, C.S., Ortiz, J.A., Hegardt, F.G., Haro, D., and Marrero, P.F. (2001). Low activity of mitochondrial HMG-CoA synthase in liver of starved piglets is due to low levels of protein despite high mRNA levels. *Arch Biochem Biophys* 385, 364-371.

Barrero, M.J., Camarero, N., Marrero, P.F., and Haro, D. (2003). Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element. *Biochem J* 369, 721-729.

Beckett, T., Tchernof, A., and Toth, M.J. (2002). Effect of ovariectomy and estradiol replacement on skeletal muscle enzyme activity in female rats. *Metabolism* 51, 1397-1401.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Blin, N., and Stafford, D.W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 3, 2303-2308.

Boden, G. (2006). Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep* 6, 177-181.

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.

Bremer, J., and Osmundsen, H. (1984). Fatty Acid Metabolism and Its Regulation (Numa, S. Ed.). *New Comprehensive Biochemistry*, Elsevier Science, Amsterdam, 113-154.

Bremer, J., Woldegiorgis, G., Schalinske, K., and Shrago, E. (1985). Carnitine palmitoyltransferase. Activation by palmitoyl-CoA and inactivation by malonyl-CoA. *Biochim Biophys Acta* 833, 9-16.

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., *et al.* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.

Buckley, B.M., and Williamson, D.H. (1975). Acetoacetyl-CoA synthetase; a lipogenic enzyme in rat tissues. *FEBS Lett* 60, 7-10.

Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.

C

Cabrero, A., Alegret, M., Sanchez, R., Adzet, T., Laguna, J.C., and Vazquez, M. (2001). Uncoupling protein-3 mRNA up-regulation in C2C12 myotubes after etomoxir treatment. In *Biochim Biophys Acta* (Netherlands), pp. 195-202.

Cahill, G.F. (2006). Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* 26, 1-22.

Camarero, N., Mascaró, C., Mayordomo, C., Vilardell, F., Haro, D., and Marrero, P.F. (2006). Ketogenic HMGCS2 is a c-Myc target gene expressed in differentiated cells of human colonic epithelium and down-regulated in colon cancer. *Mol Cancer Res* 4, 645-653.

- Camarero, N., Nadal, A., Barrero, M.J., Haro, D., and Marrero, P.F. (2003). Histone deacetylase inhibitors stimulate mitochondrial HMG-CoA synthase gene expression via a promoter proximal Sp1 site. *Nucleic Acids Res* 31, 1693-1703.
- Capecchi, M.R. (1989a). Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292.
- Capecchi, M.R. (1989b). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5, 70-76.
- Casals, N., Roca, N., Guerrero, M., Gil-Gómez, G., Ayté, J., Ciudad, C., and Hegardt, F. (1992). Regulation of the expression of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene. Its role in the control of ketogenesis. *Biochem J* 283 (Pt 1), 261-264.
- Cassuto, H., Kochan, K., Chakravarty, K., Cohen, H., Blum, B., Olswang, Y., Hakimi, P., Xu, C., Massillon, D., Hanson, R.W., *et al.* (2005). Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J Biol Chem* 280, 33873-33884.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. In *Science (United States)*, pp. 1866-1870.
- Chen, D., Bruno, J., Easlou, E., Lin, S.J., Cheng, H.L., Alt, F.W., and Guarente, L. (2008). Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev* 22, 1753-1757.
- Chen, J.Q., Brown, T.R., and Russo, J. (2009). Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1128-1143.
- Cheng, H.L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10794-10799.
- Cherbuy, C., Andrieux, C., Honvo-Houeto, E., Thomas, M., Ide, C., Druesne, N., Chaumontet, C., Darcy-Vrillon, B., and Duee, P.H. (2004). Expression of mitochondrial HMGCoA synthase and glutaminase in the colonic mucosa is modulated by bacterial species. In *Eur J Biochem (Germany)*, pp. 87-95.
- Cherbuy, C., Darcy-Vrillon, B., Morel, M.T., Pegorier, J.P., and Duee, P.H. (1995). Effect of germfree state on the capacities of isolated rat colonocytes to metabolize n-butyrate, glucose, and glutamine. In *Gastroenterology (United States)*, pp. 1890-1899.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Chui, D., Oh-Eda, M., Liao, Y.F., Panneerselvam, K., Lal, A., Marek, K.W., Freeze, H.H., Moremen, K.W., Fukuda, M.N., and Marth, J.D. (1997). Alpha-mannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis. *Cell* 90, 157-167.
- Clinkenbeard, K.D., Reed, W.D., Mooney, R.A., and Lane, M.D. (1975). Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. Separate cytoplasmic and mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A generating systems for cholesterologenesis and ketogenesis. *J Biol Chem* 250, 3108-3116.
- Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R., and Sinclair, D.A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305, 390-392.
- Cullen, B.R. (2004). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 102, 3-9.

BIBLIOGRAFIA

Cullingford, T.E., Bhakoo, K.K., and Clark, J.B. (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*, 1804-1812.

Curi, R., Williams, J.F., and Newsholme, E.A. (1989). Pyruvate metabolism by lymphocytes: evidence for an additional ketogenic tissue. *Biochem Int* *19*, 755-767.

D

Danesch, U., Hoeck, W., and Ringold, G.M. (1992). Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) and C/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression. *J Biol Chem* *267*, 7185-7193.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* *7*, 11-20.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., and Thompson, C.B. (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. *J Biol Chem* *281*, 37372-37380.

Deng, C., and Capecchi, M.R. (1992). Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* *12*, 3365-3371.

Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* *86*, 465-514.

Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* *20*, 649-688.

Djouadi, F., Weinheimer, C.J., Saffitz, J.E., Pitchford, C., Bastin, J., Gonzalez, F.J., and Kelly, D.P. (1998). A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest* *102*, 1083-1091.

Domouzoglou, E.M., and Maratos-Flier, E. (2011). Fibroblast growth factor 21 is a metabolic regulator that plays a role in the adaptation to ketosis. *Am J Clin Nutr*.

Duee, P.H., Pegorier, J.P., Quant, P.A., Herbin, C., Kohl, C., and Girard, J. (1994). Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity. *Biochem J* *298 (Pt 1)*, 207-212.

Duée, P.H., Pégorier, J.P., Quant, P.A., Herbin, C., Kohl, C., and Girard, J. (1994). Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity. *Biochem J* *298 (Pt 1)*, 207-212.

Edvardsson, U., von Löwenhielm, H.B., Panfilov, O., Nyström, A.C., Nilsson, F., and Dahllöf, B. (2003). Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators. *Proteomics* *3*, 468-478.

Eggers, A., Caudevilla, C., Asins, G., Hegardt, F.G., and Serra, D. (2000). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase promoter contains a CREB binding site that regulates cAMP action in Caco-2 cells. *Biochem J* *345 Pt 2*, 201-206.

Estall, J.L., Ruas, J.L., Choi, C.S., Laznik, D., Badman, M., Maratos-Flier, E., Shulman, G.I., and Spiegelman, B.M. (2009). PGC-1alpha negatively regulates hepatic FGF21 expression by modulating the heme/Rev-Erb(alpha) axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 22510-22515.

F

- Falany, C.N. (1997). Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J* 11, 206-216.
- Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116, 615-622.
- Fisher, F.M., Chui, P.C., Antonellis, P.J., Bina, H.A., Kharitonov, A., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 59, 2781-2789.
- Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuroo, M., Mangelsdorf, D.J., *et al.* (2010). Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* 24, 2050-2064.
- Frye, R.A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 793-798.

G

- García-Martínez, C., Marotta, M., Moore-Carrasco, R., Guitart, M., Camps, M., Busquets, S., Montell, E., and Gómez-Foix, A.M. (2005). Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C1264-1272.
- Gil-Gómez, G., Ayté, J., and Hegardt, F.G. (1993). The rat mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A-synthase gene contains elements that mediate its multihormonal regulation and tissue specificity. *Eur J Biochem* 213, 773-779.
- Grimaldi, P.A. (2001). The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Prog Lipid Res* 40, 269-281.
- Guarente, L. (2006). Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 444, 868-874.
- Guo, K., Lukacik, P., Papagrigoriou, E., Meier, M., Lee, W.H., Adamski, J., and Oppermann, U. (2006). Characterization of human DHRS6, an orphan short chain dehydrogenase/reductase enzyme: a novel, cytosolic type 2 R-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 281, 10291-10297.
- Gutgesell, A., Wen, G., König, B., Koch, A., Spielmann, J., Stangl, G.I., Eder, K., and Ringseis, R. (2009). Mouse carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) is transcriptionally regulated by PPARalpha and PPARdelta in liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1790, 1206-1216.
- Guzman, M., and Blazquez, C. (2004). Ketone body synthesis in the brain: possible neuroprotective effects. In *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (Scotland)*, pp. 287-292.
- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitonov, A., Bina, H.A., Eriksson, M., Hafström, I., Dahlin, M., Amark, P., Angelin, B., and Rudling, M. (2008). The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metab* 8, 169-174.

H

- Hahn, P., and Toller, M. (1987). Ketone formation in the intestinal mucosa of infant rats. *Life Sci* 41, 1525-1528.
- Hallows, W.C., Lee, S., and Denu, J.M. (2006). Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10230-10235.
- Hanson, R.W., and Reshef, L. (2003). Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 85, 1199-1205

BIBLIOGRAFIA

Hayashida, S., Arimoto, A., Kuramoto, Y., Kozako, T., Honda, S., Shimeno, H., and Soeda, S. (2010). Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice. *Mol Cell Biochem* 339, 285-292.

Henning, S.J., and Hird, F.J. (1972). Ketogenesis from butyrate and acetate by the caecum and the colon of rabbits. *Biochem J* 130, 785-790.

Hirota, K., Sakamaki, J., Ishida, J., Shimamoto, Y., Nishihara, S., Kodama, N., Ohta, K., Yamamoto, M., Tanimoto, K., and Fukamizu, A. (2008). A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. *J Biol Chem* 283, 32432-32441.

Hirschey, M.D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D.B., Grueter, C.A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O.R., *et al.* (2010). SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464, 121-125.

Hojman, P., Pedersen, M., Nielsen, A.R., Krogh-Madsen, R., Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, S., and Pedersen, B.K. (2009). Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. *Diabetes* 58, 2797-2801.

Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem*.

Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 11, 206-212.

Horie, Y., Suzuki, A., Kataoka, E., Sasaki, T., Hamada, K., Sasaki, J., Mizuno, K., Hasegawa, G., Kishimoto, H., Iizuka, M., *et al.* (2004). Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 113, 1774-1783.

Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., and Itoh, N. (2009). Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* 150, 4625-4633.

Hsu, M.H., Savas, U., Griffin, K.J., and Johnson, E.F. (2001). Identification of peroxisome proliferator-responsive human genes by elevated expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in HepG2 cells. *J Biol Chem* 276, 27950-27958.

I

Ide, T., Brown-Endres, L., Chu, K., Ongusaha, P.P., Ohtsuka, T., El-Deiry, W.S., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2009). GAMT, a p53-inducible modulator of apoptosis, is critical for the adaptive response to nutrient stress. *Mol Cell* 36, 379-392.

Iizuka, K., Takeda, J., and Horikawa, Y. (2009). Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett* 583, 2882-2886.

Ikeda, Y., and Tanaka, K. (1990). Selective inactivation of various acyl-CoA dehydrogenases by (methylenecyclopropyl)acetyl-CoA. *Biochim Biophys Acta* 1038, 216-221.

Im, S.S., Kim, M.Y., Kwon, S.K., Kim, T.H., Bae, J.S., Kim, H., Kim, K.S., Oh, G.T., and Ahn, Y.H. (2011). Peroxisome Proliferator-activated Receptor {alpha} Is Responsible for the Up-regulation of Hepatic Glucose-6-phosphatase Gene Expression in Fasting and db/db Mice. *J Biol Chem* 286, 1157-1164.

Imai, S., Johnson, F.B., Marciniak, R.A., McVey, M., Park, P.U., and Guarente, L. (2000). Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 297-302.

Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., *et al.* (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 5, 415-425.

Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., and Núñez, G. (1998). CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* 17, 2526-2533.

Issemann, I., and Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650.

Ito, S., Kinoshita, S., Shiraishi, N., Nakagawa, S., Sekine, S., Fujimori, T., and Nabeshima, Y.I. (2000). Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech Dev* 98, 115-119.

Izumiya, Y., Bina, H.A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* 582, 3805-3810.

J

Johnstone, A.M., Horgan, G.W., Murison, S.D., Bremner, D.M., and Lobley, G.E. (2008). Effects of a high-protein ketogenic diet on hunger, appetite, and weight loss in obese men feeding ad libitum. *Am J Clin Nutr* 87, 44-55.

Juge-Aubry, C.P., Favex, T Burger, AG, Wahli, W Meier, CA, Desvergne, B (1997). DNA binding properties of peroxisome proliferator-... [J Biol Chem. 1997] - PubMed result. *J Biol Chem* 272 (40), 25252-25259.

K

Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13, 2570-2580.

Kamei, Y., Suzuki, M., Miyazaki, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Wu, J., Ishimi, Y., and Ezaki, O. (2005). Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 51, 110-117.

Kashiwaya, Y., Pawlosky, R., Markis, W., King, M.T., Bergman, C., Srivastava, S., Murray, A., Clarke, K., and Veech, R.L. (2010). A ketone ester diet increases brain malonyl-CoA and Uncoupling proteins 4 and 5 while decreasing food intake in the normal Wistar Rat. *J Biol Chem* 285, 25950-25956.

Kashiwaya, Y., Sato, K., Tsuchiya, N., Thomas, S., Fell, D.A., Veech, R.L., and Passonneau, J.V. (1994). Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *J Biol Chem* 269, 25502-25514.

Kelly, L.J., Vicario, P.P., Thompson, G.M., Candelore, M.R., Doebber, T.W., Ventre, J., Wu, M.S., Meurer, R., Forrest, M.J., Conner, M.W., *et al.* (1998). Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology* 139, 4920-4927.

Kendrick, A.A., Choudhury, M., Rahman, S.M., McCurdy, C.E., Friederich, M., Vanhove, J.L., Watson, P.A., Birdsey, N., Bao, J., Gius, D., *et al.* (2010). Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. *Biochem J*.

BIBLIOGRAFIA

Kharitononkov, A., and Larsen, P. (2010). FGF21 reloaded: challenges of a rapidly growing field. *Trends Endocrinol Metab.*

Kharitononkov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., *et al.* (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* *115*, 1627-1635.

Kliewer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., *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*, 4318-4323.

Kostiuk, M., Keller, B., and Berthiaume, L. (2010). Palmitoylation of ketogenic enzyme HMGCS2 enhances its interaction with PPAR{alpha} and transcription at the Hmgcs2 PPPE. *FASEB J.*

Koundakjian, P.P., and Snoswell, A.M. (1970). Ketone body and fatty acid metabolism in sheep tissues. 3-Hydroxybutyrate dehydrogenase, a cytoplasmic enzyme in sheep liver and kidney. *Biochem J* *119*, 49-57.

L

Laegera, T., Metgesa, C.C., Kuhla, B., and a (2010). Role of β -hydroxybutyric acid in the central regulation of energy balance. *Appetite* *54*.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.-M., Frye, R.A., Minucci, S., Pelicci, P.G., and Kouzarides, T. (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* *21*, 2383-2396.

Le May, C., Pineau, T., Bigot, K., Kohl, C., Girard, J., and Pégrier, J. (2000). Reduced hepatic fatty acid oxidation in fasting PPARalpha null mice is due to impaired mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase gene expression. *FEBS Lett* *475*, 163-166.

Lee, C.H., Olson, P., and Evans, R.M. (2003). Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* *144*, 2201-2207.

Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H., and Gonzalez, F.J. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* *15*, 3012-3022.

Lehninger, A.L., Sudduth, H.C., and Wise, J.B. (1960). D-beta-Hydroxybutyric dehydrogenase of mitochondria. *J Biol Chem* *235*, 2450-2455.

Leone, T.C., Weinheimer, C.J., and Kelly, D.P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 7473-7478.

Levine, A.J., and Puzio-Kuter, A.M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* *330*, 1340-1344.

Li, F., Gu, Y., Dong, W., Li, H., Zhang, L., Li, N., Li, W., Song, Y., Jiang, L., Ye, J., *et al.* (2010). Cell death-inducing DFF45-like effector, a lipid droplet-associated protein, might be involved in the differentiation of human adipocytes. *FEBS J* *277*, 4173-4183.

Li, J.Z., and Li, P. (2007). Cide proteins and the development of obesity. *Novartis Found Symp* 286, 155-159; discussion 159-163, 196-203.

Li, X., Ge, H., Weiszmann, J., Hecht, R., Li, Y.S., Véniant, M.M., Xu, J., Wu, X., Lindberg, R., and Li, Y. (2009). Inhibition of lipolysis may contribute to the acute regulation of plasma FFA and glucose by FGF21 in ob/ob mice. *FEBS Lett* 583, 3230-3234.

Liang, L., Zhao, M., Xu, Z., Yokoyama, K.K., and Li, T. (2003). Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family. *Biochem J* 370, 195-203.

Lin, S.J., Defossez, P.A., and Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.

Liu, Y., Dentin, R., Chen, D., Hedrick, S., Ravnskjaer, K., Schenk, S., Milne, J., Meyers, D.J., Cole, P., Yates, J., *et al.* (2008). A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 456, 269-273.

Lockwood, E.A., and Bailey, E. (1971). The course of ketosis and the activity of key enzymes of ketogenesis and ketone-body utilization during development of the postnatal rat. *Biochem J* 124, 249-254.

Lu, C., and Cheng, S.Y. (2010). Thyroid hormone receptors regulate adipogenesis and carcinogenesis via crosstalk signaling with peroxisome proliferator-activated receptors. *J Mol Endocrinol* 44, 143-154.

Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-148.

M

Mandel, M., and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159-162.

Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B., and Auwerx, J. (1997). Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 272, 28210-28217.

Mascaro, C., Acosta, E., Ortiz, J.A., Marrero, P.F., Hegardt, F.G., and Haro, D. (1998). Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 273, 8560-8563.

Mascaro, C., Buesa, C., Ortiz, J.A., Haro, D., and Hegardt, F.G. (1995). Molecular cloning and tissue expression of human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *Arch Biochem Biophys* 317, 385-390.

Mashili, F.L., Austin, R.L., Deshmukh, A.S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J.R., Chibalin, A.V., Moller, D.E., Kharitonov, A., *et al.* (2011). Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Metab Res Rev* 27, 286-297.

Matsusue, K. (2010). A physiological role for fat specific protein 27/cell death-inducing DFF45-like effector C in adipose and liver. *Biol Pharm Bull* 33, 346-350.

Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S.H., Gavrilova, O., Ward, J.M., Brewer, B., Reitman, M.L., and Gonzalez, F.J. (2003). Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 111, 737-747.

BIBLIOGRAFIA

Matsusue, K., Kusakabe, T., Noguchi, T., Takiguchi, S., Suzuki, T., Yamano, S., and Gonzalez, F.J. (2008). Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab* 7, 302-311.

Mayordomo, C. Tesi Doctoral (2007). Significado y control de la expresión del gen HMG-CoA sintasa mitocondrial (Universitat de Barcelona).

McCue, M.D. (2010). Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156, 1-18.

McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1980). Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49, 395-420.

Meertens, L., Miyata, K., Cechetto, J., Rachubinski, R., and Capone, J. (1998). A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPARalpha. *EMBO J* 17, 6972-6978.

Minnich, A., Tian, N., Byan, L., and Bilder, G. (2001). A potent PPARalpha agonist stimulates mitochondrial fatty acid beta-oxidation in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E270-279.

Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B.M., and Milbrandt, J. (2002). FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem* 277, 47928-47937.

Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Latruffe, N. (1998). Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273, 16710-16714.

Motta, M.C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., Bultsma, Y., McBurney, M., and Guarente, L. (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116, 551-563.

Moyers, J.S., Shiyanova, T.L., Mehrbod, F., Dunbar, J.D., Noblitt, T.W., Otto, K.A., Reifel-Miller, A., and Kharitonov, A. (2007). Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. *J Cell Physiol* 210, 1-6.

Muise, E.S., Azzolina, B., Kuo, D.W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., Mu, J., Thompson, J.R., Berger, J.P., and Wong, K.K. (2008). Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol Pharmacol* 74, 403-412.

Muoio, D.M., MacLean, P.S., Lang, D.B., Li, S., Houmard, J.A., Way, J.M., Winegar, D.A., Corton, J.C., Dohm, G.L., and Kraus, W.E. (2002). Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem* 277, 26089-26097.

Muoio, D.M., and Newgard, C.B. (2006). Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 75, 367-401.

N

Nadal, A. Tesi Doctoral (2001). Regulació multihormonal de la transcripció del gen HMG-CoA sintasa mitocondrial (Universitat de Barcelona).

Nadal, A., Marrero, P.F., and Haro, D. (2002). Down-regulation of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by insulin: the role of the forkhead transcription factor FKHL1. *Biochem J* 366, 289-297.

Nakamura, N., Ramaswamy, S., Vazquez, F., Signoretti, S., Loda, M., and Sellers, W.R. (2000). Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol* *20*, 8969-8982.

Napal, L., Marrero, P.F., and Haro, D. (2005). An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A. In *J Mol Biol (England)*, pp. 751-759.

Nemoto, Y., Toda, K., Ono, M., Fujikawa-Adachi, K., Saibara, T., Onishi, S., Enzan, H., Okada, T., and Shizuta, Y. (2000). Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J Clin Invest* *105*, 1819-1825.

Nian, Z., Sun, Z., Yu, L., Toh, S.Y., Sang, J., and Li, P. (2010). Fat-specific protein 27 undergoes ubiquitin-dependent degradation regulated by triacylglycerol synthesis and lipid droplet formation. *J Biol Chem* *285*, 9604-9615.

Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta* *1492*, 203-206.

Nishino, N., Tamori, Y., Tateya, S., Kawaguchi, T., Shibakusa, T., Mizunoya, W., Inoue, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Matsuki, Y., *et al.* (2008). FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest* *118*, 2808-2821.

O

O'Rourke, A., and Rider, C. (1989). Glucose, glutamine and ketone body utilisation by resting and concanavalin A activated rat splenic lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* *1010(3)*, 342-345.

P

Paquette, A., Chapados, N.A., Bergeron, R., and Lavoie, J.M. (2009). Fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats. *Horm Metab Res* *41*, 511-515.

Pelletier, A., and Coderre, L. (2007). Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake through AMPK inhibition and oxidative stress generation in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *292*, E1325-1332.

Pelletier, A., Tardif, A., Gingras, M.H., Chiasson, J.L., and Coderre, L. (2007). Chronic exposure to ketone bodies impairs glucose uptake in adult cardiomyocytes in response to insulin but not vanadate: the role of PI3-K. *Mol Cell Biochem* *296*, 97-108.

Perreault, M., Will, S., Panza, D., Gareski, T., Harding, K., Kubasiak, D., Jalenak, M., Gartrell, K., Wang, S., Bollag, G., *et al.* (2010). Modulation of nutrient sensing nuclear hormone receptors promotes weight loss through appetite suppression in mice. *Diabetes Obes Metab* *12*, 234-245.

Pignataro, O.P., Radicella, J.P., Calvo, J.C., and Charreau, E.H. (1983). Mitochondrial biosynthesis of cholesterol in Leydig cells from rat testis. *Mol Cell Endocrinol* *33*, 53-67.

Plaisance, E.P., Lukasova, M., Offermanns, S., Zhang, Y., Cao, G., and Judd, R.L. (2009). Niacin stimulates adiponectin secretion through the GPR109A receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *296*, E549-558.

Potthoff, M.J., Inagaki, T., Satapati, S., Ding, X., He, T., Goetz, R., Mohammadi, M., Finck, B.N., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., *et al.* (2009). FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 10853-10858.

BIBLIOGRAFIA

Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B.M. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286, 1368-1371.

Puri, V., Konda, S., Ranjit, S., Aouadi, M., Chawla, A., Chouinard, M., Chakladar, A., and Czech, M.P. (2007). Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem* 282, 34213-34218.

Puri, V., Ranjit, S., Konda, S., Nicoloso, S.M., Straubhaar, J., Chawla, A., Chouinard, M., Lin, C., Burkart, A., Corvera, S., *et al.* (2008). Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7833-7838.

Purushotham, A., Schug, T.T., and Li, X. (2009a). SIRT1 performs a balancing act on the tight-rope toward longevity. *Aging (Albany NY)* 1, 669-673.

Purushotham, A., Schug, T.T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X., and Li, X. (2009b). Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* 9, 327-338.

Q

Quant, P.A. (1990). Activity and expression of hepatic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase during the starved-to-fed transition. *Biochem Soc Trans* 18, 994-995.

Quant, P.A., Robin, D., Robin, P., Ferre, P., Brand, M.D., and Girard, J. (1991). Control of hepatic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase during the foetal/neonatal transition, suckling and weaning in the rat. *Eur J Biochem* 195, 449-454.

Quant, P.A., Tubbs, P.K., and Brand, M.D. (1989). Treatment of rats with glucagon or mannoheptulose increases mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity and decreases succinyl-CoA content in liver. *Biochem J* 262, 159-164.

R

Rabinowitz, J.D., and White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science* 330, 1344-1348.

Rakhshandehroo, M., Hooiveld, G., Müller, M., and Kersten, S. (2009). Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human. *PLoS One* 4, e6796.

Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M., and Kersten, S. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res* 2010.

Rakhshandehroo, M., Sanderson, L.M., Matilainen, M., Stienstra, R., Carlberg, C., de Groot, P.J., Müller, M., and Kersten, S. (2007). Comprehensive analysis of PPARalpha-dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling. *PPAR Res* 2007, 26839.

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.

Ranjit, S., Boutet, E., Gandhi, P., Prot, M., Tamori, Y., Chawla, A., Greenberg, A.S., Puri, V., and Czech, M.P. (2010). Regulation of Fat Specific Protein 27 by Isoproterenol and TNF- α to control lipolysis in murine adipocytes. *J Lipid Res*.

Reed, W.D., Clinkenbeard, D., and Lane, M.D. (1975). Molecular and catalytic properties of mitochondrial (ketogenic) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase of liver. *J Biol Chem* 250, 3117-3123.

Reid, B.N., Ables, G.P., Otlivanchik, O.A., Schoiswohl, G., Zechner, R., Blaner, W.S., Goldberg, I.J., Schwabe, R.F., Chua, S.C., Jr., and Huang, L.S. (2008). Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. In *J Biol Chem (United States)*, pp. 13087-13099.

Riu, E., Bosch, F., and Valera, A. (1996). Prevention of diabetic alterations in transgenic mice overexpressing Myc in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2198-2202.

Robertson, E.J. (1991). Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line. *Biol Reprod* 44, 238-245.

Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.

Rodríguez, J.C., Gil-Gómez, G., Hegardt, F.G., and Haro, D. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* 269, 18767-18772.

Rodríguez, J.C., Ortiz, J.A., Hegardt, F.G., and Haro, D. (1997). Chicken ovalbumin upstream-promoter transcription factor (COUP-TF) could act as a transcriptional activator or repressor of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene. *Biochem J* 326 (Pt 2), 587-592.

Rodríguez, J.C., Ortiz, J.A., Hegardt, F.G., and Haro, D. (1998). The hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) represses the mitochondrial HMG-CoA synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 242, 692-696.

Royo, T., Pedragosa, M.J., Ayte, J., Gil-Gomez, G., Vilaro, S., and Hegardt, F.G. (1993). Testis and ovary express the gene for the ketogenic mitochondrial 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. *J Lipid Res* 34, 1636.

S

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170.

Schlicker, C., Gertz, M., Papatheodorou, P., Kachholz, B., Becker, C.F., and Steegborn, C. (2008). Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol* 382, 790-801.

Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T., and Auwerx, J. (1995). Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270, 19269-19276.

Sengupta, S., Peterson, T.R., Laplante, M., Oh, S., and Sabatini, D.M. (2010). mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 468, 1100-1104.

Serra, D., Casals, N., Asins, G., Royo, T., Ciudad, C., and Hegardt, F. (1993). Regulation of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase protein by starvation, fat feeding, and diabetes. *Arch Biochem Biophys* 307, 40-45.

BIBLIOGRAFIA

Shafqat, N., Turnbull, A., Zschocke, J., Oppermann, U., and Yue, W.W. (2010). Crystal structures of human HMG-CoA synthase isoforms provide insights into inherited ketogenesis disorders and inhibitor design. *J Mol Biol* 398, 497-506.

Shimazu, T., Hirschey, M.D., Hua, L., Dittenhafer-Reed, K.E., Schwer, B., Lombard, D.B., Li, Y., Bunkenborg, J., Alt, F.W., Denu, J.M., *et al.* (2010). SIRT3 Deacetylates Mitochondrial 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Synthase 2 and Regulates Ketone Body Production. *Cell Metab* 12, 654-661.

Siess, E.A., Fahimi, F.M., and Wieland, O.H. (1980). Decrease by glucagon in hepatic succinyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun* 95, 205-211.

Stirone, C., Duckles, S.P., Krause, D.N., and Procaccio, V. (2005). Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol* 68, 959-965.

Sunny, N.E., Satapati, S., Fu, X., He, T., Mehdibeigi, R., Spring-Robinson, C., Duarte, J., Potthoff, M.J., Browning, J.D., and Burgess, S.C. (2010). Progressive adaptation of hepatic ketogenesis in mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E1226-1235.

Svensson, P.A., Jernås, M., Sjöholm, K., Hoffmann, J.M., Nilsson, B.E., Hansson, M., and Carlsson, L.M. (2011). Gene expression in human brown adipose tissue. *Int J Mol Med* 27, 227-232.

T

Taggart, A.K., Kero, J., Gan, X., Cai, T.Q., Cheng, K., Ippolito, M., Ren, N., Kaplan, R., Wu, K., Wu, T.J., *et al.* (2005). (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem* 280, 26649-26652.

Tao, R., Wei, D., Gao, H., Liu, Y., Depinho, R.A., and Dong, X.C. (2011). Hepatic FoxOs regulate lipid metabolism via modulation of expression of the nicotinamide phosphoribosyltransferase gene. *J Biol Chem*.

Tardif, A., Julien, N., Pelletier, A., Thibault, G., Srivastava, A.K., Chiasson, J.L., and Coderre, L. (2001). Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E1205-1212.

Thumelin, S., Forestier, M., Girard, J., and Pegorier, J.P. (1993). Developmental changes in mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene expression in rat liver, intestine and kidney. *Biochem J* 292 (Pt 2), 493-496.

Tong, X., Muchnik, M., Chen, Z., Patel, M., Wu, N., Joshi, S., Rui, L., Lazar, M.A., and Yin, L. (2010). Transcriptional repressor E4-binding protein 4 (E4BP4) regulates metabolic hormone fibroblast growth factor 21 (FGF21) during circadian cycles and feeding. *J Biol Chem* 285, 36401-36409.

Tynnismaa, H., Carroll, C.J., Raimundo, N., Ahola-Erkkilä, S., Wenz, T., Ruhanen, H., Guse, K., Hemminki, A., Peltola-Mjøsund, K.E., Tulkki, V., *et al.* (2010). Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Hum Mol Genet* 19, 3948-3958.

U

Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., and Evans, R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-1266.

V

Van der Lee, K.A., Vork, M.M., De Vries, J.E., Willemsen, P.H., Glatz, J.F., Reneman, R.S., Van der Vusse, G.J., and Van Bilsen, M. (2000). Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J Lipid Res* 41, 41-47.

Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-159.

Veech, R.L. (2004). The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 309-319.

Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20, 1868-1876.

Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 615-619.

Vousden, K.H. (2010). Alternative fuel--another role for p53 in the regulation of metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7117-7118.

W

Wang, H., Qiang, L., and Farmer, S.R. (2008). Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol Cell Biol* 28, 188-200.

Wang, Y., Solt, L.A., and Burris, T.P. (2010). Regulation of FGF21 expression and secretion by retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha. *J Biol Chem* 285, 15668-15673.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.

Wentz, A.E., d'Avignon, D.A., Weber, M.L., Cotter, D.G., Doherty, J.M., Kerns, R., Nagarajan, R., Reddy, N., Sambandam, N., and Crawford, P.A. (2010). Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment. *J Biol Chem* 285, 24447-24456.

Westman, E.C., Yancy, W.S., Edman, J.S., Tomlin, K.F., and Perkins, C.E. (2002). Effect of 6-month adherence to a very low carbohydrate diet program. *Am J Med* 113, 30-36.

Williams, P.M., Chang, D.J., Danesch, U., Ringold, G.M., and Heller, R.A. (1992). CCAAT/enhancer binding protein expression is rapidly extinguished in TA1 adipocyte cells treated with tumor necrosis factor. *Mol Endocrinol* 6, 1135-1141.

Williamson, D.H., Bates, M.W., Page, M.A., and Krebs, H.A. (1971). Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem J* 121, 41-47.

Wu, J.W., Wang, S.P., Alvarez, F., Casavant, S., Gauthier, N., Abed, L., Soni, K.G., Yang, G., and Mitchell, G.A. (2011). Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. *Hepatology*.

Y

Yamazaki, T., Kishimoto, K., Miura, S., and Ezaki, O. (2011). Dietary β -conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 protein. *J Nutr Biochem*.

Ye, J., Li, J.Z., Liu, Y., Li, X., Yang, T., Ma, X., Li, Q., Yao, Z., and Li, P. (2009). Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B. *Cell Metab* 9, 177-190.

BIBLIOGRAFIA

Yi, W., Fu, P., Fan, Z., Aso, H., Tian, C., Meng, Y., Liu, J., Yamori, Y., Nara, Y., and Ying, C. (2010). Mitochondrial HMG-CoA synthase partially contributes to antioxidant protection in the kidney of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. In *Nutrition*, pp. 1176-1180.

Yu, S., Matsusue, K., Kashireddy, P., Cao, W.Q., Yeldandi, V., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Gonzalez, F.J., and Reddy, J.K. (2003). Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* 278, 498-505.

Z

Zhang, D., Yang, H., Kong, X., Wang, K., Mao, X., Yan, X., Wang, Y., Liu, S., Zhang, X., Li, J., *et al.* (2010). Proteomics analysis reveals diabetic kidney as a ketogenic organ in type 2 diabetes. In *Am J Physiol Endocrinol Metab.*

Zhou, W., Han, W.F., Landree, L.E., Thupari, J.N., Pinn, M.L., Bililign, T., Kim, E.K., Vadlamudi, A., Medghalchi, S.M., El Meskini, R., *et al.* (2007). Fatty acid synthase inhibition activates AMP-activated protein kinase in SKOV3 human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67, 2964-2971.

Zhou, Z., Yon Toh, S., Chen, Z., Guo, K., Ng, C.P., Ponniah, S., Lin, S.C., Hong, W., and Li, P. (2003). Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet* 35, 49-56.

Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. In *Nat Rev Mol Cell Biol* (England), pp. 21-35.

Zschocke, J., Penzien, J., Bielen, R., Casals, N., Aledo, R., Pié, J., Hoffmann, G., Hegardt, F., and Mayatepek, E. (2002). The diagnosis of mitochondrial HMG-CoA synthase deficiency. *J Pediatr* 140, 778-780.

APÈNDIX

MISCEL.LANI D'ABREVIATURES

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACO	Acil-CoA oxidasa
ACS	Acetil-CoA sintetasa
AG	Àcids grassos
AKT/PKB	Protein quinasa B
AMPc	Adenosina monofosfat cíclic
AMPK	Proteïna quinasa activada per AMP
APS	Persulfat amònic
ATP	Adenosina trifosfat
bp	Parells de bases
BSA	Albúmina sèrica bovina
CACT	<i>Carnitine-acylcarnitine translocase</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CBP	Proteïna d'unió a CREB
CD36	<i>Fatty acid translocase 36</i>
cDNA	DNA còpia
CIDEC/FSP27	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor-45-like effector C/ Fat Specific protein 27</i>
CMV	Citomegalovirus
CoA	Coenzim A
COUP-TF	<i>Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor</i>
CPT1	carnitina palmitoiltransferasa
CRE	Element de resposta a AMPc
CREB	<i>cAMP responsive element binding</i>
CREB	cAMP responsive element binding protein
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonuclíc
dNTPs	Desoxiribonucleòtid trifosfat

APÈNDIX

DR1	<i>Direct repeat 1</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EGTA	àcid etilenglicoltetraacètic
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
FADH₂	Flavina adenina dinucleòtid reduït
FBS	Sèrum boví fetal
FGF21	Fibroblast growth factor 21
FOXO	<i>Forkhead Box O</i>
G6Pase	Glucosa 6-fosfatasa
GAMT	Guanidinoacetat metiltransferasa
GFP	Proteïna fluorescent verda
GPR109A	Receptor acoplat a proteïna G 109A
GST	Glutatió-S-Transferasa
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histones desacetilases
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HMGCS1	HMG-CoA sintasa citosòlica
HMGCS2	HMG-CoA sintasa mitocondrial
HNF4	<i>Hepatocyte nuclear factor 4</i>
HSL	Lipasa sensible a hormones
IPTG	Isopropil- α -D-tiogalactosidasa
IRE	Element de resposta a insulina
Kb	Kilobases
kDa	Kilodàltons
LB	Luria-Bertrani Broth
LCAD	<i>Long-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
LTR	<i>Long terminal Repeats</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCAD	<i>Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>

MCD	Malonil-CoA decarboxilasa
MLV	<i>Murine Leukemia virus</i>
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
mTORC1	<i>Mammalian Target of Rapamycin complex 1</i>
NAD⁺	Nicotinamida adenosina dinucleòtid oxidat
NADH	Nicotinamida adenosina dinucleòtid reduït
NcoR	<i>Nuclear corepressor Receptor</i>
NEFAs	Àcids grassos no esterificats
NR	Receptors nuclears
NRRE	Element de resposta a receptors nuclears
OD	Densitat òptica
PBS	Tampó fosfat salí
PCK1	Fosfoenol piruvat carboxiquinasa citosòlica
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PGC1α	<i>Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ Coactivator-1 α</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKA	Proteïna quinasa dependent d'AMPc
PPAR	Receptors nuclears activats per proliferadors de peroxisomes
PPRE	Element de resposta a PPAR
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Difluorid polivinilidina
RNA	Àcid ribonucleic
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
rpm	Revolucions per minut
RXR	<i>Retinoic-X-Receptor</i>
SDS	Dodecil sulfat sòdic
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>

APÈNDIX

SV40	Virus 40 de simi
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBS	Tampó borat salí
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetraetiletilendiamina
TG	Triacilglicerols o triglicèrids
Tm	<i>Melting temperature</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
Tris	Tris-hidroximetil-aminometà
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
UTR	Regió no traduïda (<i>Untranslated region</i>)
VLDL	Lipoproteïnes de molt baixa densitat
xg	Gravetats

OLIGONUCLEÒTIDS UTILITZATS

Per genotipar clons de cèl·lules mare embrionàries:

DH1200	G TTCCTCTTGAAAACCACACTGCTCG
DH1143	GGAAGTCAGAGAACAATTGTGGGAGTCAG
DH1141	GACCAAAGTACCTGGAAAAGTTCAACAATG
DH1160	GAAGTGGGCACCGAGACCATCATTGAC
DH1161	CAAGCCCTTTACCCATTAAGCCTATTGCC

Per generar construccions:

DH958	<u>GGA TCC</u> GTG GGG AAG TCA TAG
DH959	<u>GGA TCC</u> AAA GCT GGG GTT TTA G
Braç 5' bis Fw	<u>CTCGAGCTAGTACACTCATGATCATAAGTCCTG</u>
Braç 5' bis Rv	<u>CTCGAGCATGGTAAACTGAACTGTAGAAGTGTG</u>
DH967 bis	GATCTTATCTAGGTCGACCTGTATTTACTGAGC
DH968 bis	GAATCAAGTTGTCGACTAAGCCATATTGC
DH1198	CTAGAAGCTTGATGCAGCGGCTTTTGGCTCCAG
DH1199	CATCGATATCTTAGACGGGACACCGGGCATAAC

Per seqüenciar construccions:

DH1016	GGATCGATCCGGAAC
DH1015	GGAAAGAACCAGCTGGG
DH1095	GATCTTTGAGATTAGGTTAGCTTCTGG
DH1096	GTTATATTAGGGTTCCG
DH1097	CTCCGGCTCGTATGTTGTG
PFLOX 3	GATTAAGTTGGGTAACGCCAG

PFLOX4	GATCCGGAACCCCTTAATATAAC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
DH1227	CCTAAGGTAGCGATTTAAATAC
DH1228	GTATATCTGGCCCGTACATC

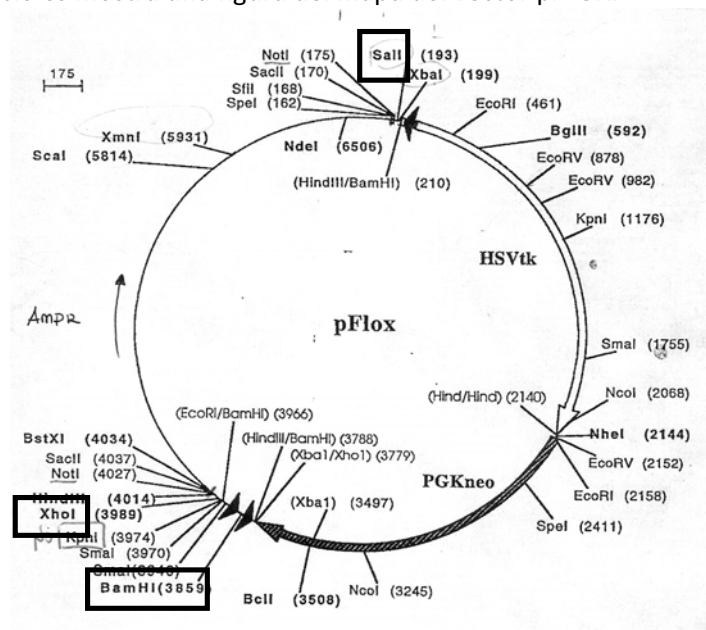
CONSTRUCCIONS GENERADES

- pGEMT-EXON2

Es va amplificar un fragment de 1.5kb corresponent a l'exó 2 del gen HMGCS2 de ratolí més dues regions intròniques a 5' i 3' de l'exó a partir de DNA genòmic obtingut de fetge de ratolins de la soca 129Sv amb els oligonucleòtids DH958 i DH959 que contenen la diana BamHI (veure llista l'oligonucleòtids, diana subratllada). El fragment amplificat es va clonar en el vector comercial pGEMT (Promega).

- pFLOX-EXON2

Aquesta construcció es va obtenir mitjançant la digestió enzimàtica del vector pFLOX i la construcció prèviament generada pGEMT-EXON2 amb BamHI. La correcta orientació es va comprovar per patró de restricció i per seqüenciació amb els oligonucleòtids DH1016 i DH1015. A continuació es mostra una figura del mapa del vector pFLOX.



- pGEMT-5'ARM

Es va amplificar un fragment de 4kb corresponent a l'intró 1 del gen *Hmgcs2* a partir de DNA genòmic de fetge de ratolins de la soca 129Sv amb els oligonucleòtids Braç 5' bis Fw i Braç 5' bis Rv que contenen la diana de restricció XhoI (veure llista l'oligonucleòtids, diana subratllada). El fragment obtingut va ser clonat en el vector comercial pGEMT Easy (Promega).

APÈNDIX

- pGEMT-T 3'ARM

Es va amplificar un fragment de 3.4kb corresponent a l'intró 2 del gen *Hmgcs2* a partir de DNA genòmic de fetge de ratolins de la soca 129Sv amb els oligonucleòtids DH967 bis i DH968 bis que contenen la diana de restricció Sall (veure llista l'oligonucleòtids, diana subratllada). El fragment obtingut va ser clonat en el vector comercial pGEMT Easy (Promega).

- pFIOX-5'ARM-EXON2-3'ARM

En col·laboració amb *GenScript Corporation* (Piscataway, NJ) es van introduir els fragments corresponents als braços d'homologia 5' i 3' (de 4 i 3.4kb respectivament) en la construcció pFLOX-EXON2 mitjançant la digestió enzimàtica de les construccions amb XhoI (pel braç d'homologia 5') o Sall (pel braç d'homologia 3'). Així, es va obtenir la construcció final pFLOX-5'ARM-EXON2-3'ARM que va ser comprovada per patró de restricció i per seqüenciació amb els oligonucleòtids DH1095, DH1096, DH1097, pFLOX3 i pFLOX4.

- pcDNA3-Hmgcs2 de ratolí

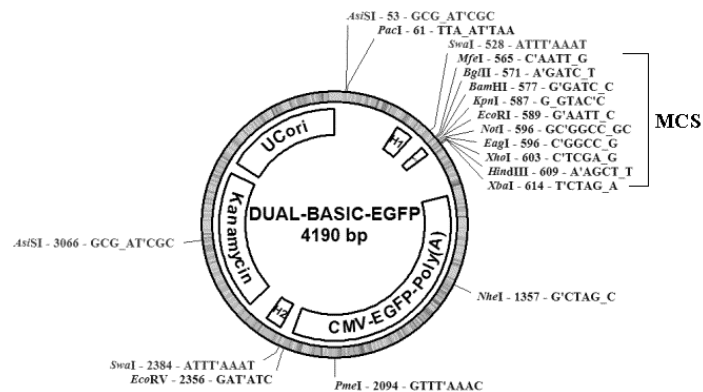
Es va amplificar el cDNA de *Hmgcs2* de ratolí (1.5kb) a partir de cDNA obtingut de fetge de ratolins C57Bl6 amb els oligonucleòtids DH1198 i DH1199 que contenen les dianes HindIII i EcoRV respectivament (veure llista l'oligonucleòtids, diana subratllada). El fragment amplificat va ser clonat en el vector comercial pGEMT (Promega). La construcció pcDNA3-Hmgcs2 de ratolí es va generar mitjançant la digestió del vector pcDNA3 i de la construcció pGEMT-Hmgcs2 amb les dianes HindIII i EcoRV.

- pDUAL BASIC VECTOR-U6shRNA#78

Aquesta construcció consisteix en el subclonatge del promotor U6 i la seqüència shRNA específica (415bp) en el vector inicial per la generació d'adenovirus, Dual basic EGFP. Es va obtenir per digestió del plasmidi pRS-GFP-shRNA#78 i el plasmidi Dual basic EGFP amb les dianes EcoRI i HindIII. Per seqüenciar la construcció generada es van utilitzar els oligonucleòtids DH1227 i DH1228. A continuació es mostra una figura del vector dual basic vector:

DUAL-BASIC-EGFP Map

- (1) Expression Cassette should be cloned into the MCS region
- (2) No PacI site in the cloned DNA region



PLASMIDIS UTILITZATS

1. D'expressió

- pcDNA3-Hmgcs2 de ratolí (generada en aquesta tesi doctoral veure apartat anterior)
- pcDNA3-HMGCS2 humà (Mayordomo, Tesi Doctoral 2007)
- pSG5-PPAR α de ratolí (Facilitat per S. Green, Macclesfield, UK)
- pJXR8 (Facilitat per R.M. Evans, Salk Institute, San Diego, CA)
- pGEX-4T-PPAR α humà (Barrero *et al*, 2003)
- pEGFP-N3 (Clontech, Ref: 6080-1)

2. Plasmidis codificants per shRNAs

- pRS inespecífic (Origene, Ref: TR30003)
- pRS shRNA contra HMGCS2 humà (Origene, Ref. TR312391). Seqüència escollida T1349559 (shRNA#59) : CGTCTGTTGACTCCAGTGAAGCGCATTCT
- pGFP-V-RS inespecífic (Origene, Ref : TR30013)
- pGFP-V-RS shRNA contra Hmgcs2 de ratolí (Origene, Ref: TG513393) : seqüència escollida G1579478 (shRNA#78). Seqüència escollida T1349559 (shRNA#59) : GGCTTCTGTTTCAGTCCAGGAGGACATCAA

3. Reporters

- pGL3-promotor humà HMGCS2 : conté la seqüència promotora del gen humà HMGCS2 corresponent a les coordenades -1149 a +28 (Mayordomo, Tesi Doctoral 2007)
- pGL3-CPT1Aintluc: conté el promotor proximal, el primer exó i part del primer intró del gen humà CPT1A (Napal *et al*, 2005).

PUBLICACIONES

Human HMGCS2 Regulates Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and *FGF21* Expression in HepG2 Cell Line*

Received for publication, March 11, 2011, and in revised form, April 13, 2011. Published, JBC Papers in Press, April 18, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.235044

Anna Vilà-Brau¹, Ana Luísa De Sousa-Coelho^{2,3}, Cristina Mayordomo³, Diego Haro, and Pedro F. Marrero⁴

From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy and the Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

HMGCS2 (hydroxymethylglutaryl CoA synthase 2), the gene that regulates ketone body production, is barely expressed in cultured cell lines. In this study, we restored HMGCS2 expression and activity in HepG2 cells, thus showing that the wild type enzyme can induce fatty acid β -oxidation (FAO) and ketogenesis, whereas a catalytically inactive mutant C166A did not generate either process. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α expression also induces fatty acid β -oxidation and endogenous HMGCS2 expression. Interestingly, PPAR α -mediated induction was abolished when HMGCS2 expression was down-regulated by RNAi. These results indicate that HMGCS2 expression is both sufficient and necessary to the control of fatty acid oxidation in these cells. Next, we examined the expression pattern of several PPAR α target genes in this now "ketogenic" HepG2 cell line. *FGF21* (fibroblast growth factor 21) expression was specifically induced by HMGCS2 activity or by the inclusion of the oxidized form of ketone bodies (acetoacetate) in the culture medium. This effect was blunted by SirT1 (sirtuin 1) RNAi, so we propose a SirT1-dependent mechanism for FGF21 induction by acetoacetate. These data suggest a novel feed-forward mechanism by which HMGCS2 could regulate adaptive metabolic responses during fasting. This mechanism could be physiologically relevant, because fasting-mediated induction of liver *FGF21* was dependent on SirT1 activity *in vivo*.

The liver plays a central role in the adaptive response to fasting. The plasma hormone profile in this situation, low insulin and high glucagon, induces the release of large amounts of fatty acids from the adipose tissue to be used by peripheral tissues to spare glucose consumption. Therefore, the liver of a starved animal actively oxidizes fatty acid, which provides the energy necessary to sustain gluconeogenesis. It also supplies the acetyl-CoA needed for active ketone body synthesis, which replaces

glucose as the energy substrate for the brain and other tissues (1).

Two enzymes determine the metabolic fate of fatty acids in the liver of starved animals: carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1) A (EC 2.3.1.21) and hydroxymethylglutaryl CoA synthase 2 (HMGCS2) (EC 4.1.3.5). *CPT1A* encodes a malonyl-CoA-sensitive protein that regulates mitochondrial long chain fatty acid oxidation (1), whereas *HMGCS2* encodes a mitochondrial protein that controls the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)⁵ cycle, by which acetoacetate, β -hydroxybutyrate, and NAD⁺ are generated (2). The expression of both genes is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) (3–6), a fatty acid-activated nuclear receptor that regulates metabolic changes in the liver associated with starvation (7). Another gene directly regulated by PPAR α in liver is *FGF21* (fibroblast growth factor 21), a signaling molecule induced in the ketotic state (8, 9).

Consistently, during starvation, PPAR α null mice show severe hypoglycemia and hypoketonemia (7). The hypoglycemia is due to a reduced capacity for hepatic gluconeogenesis secondary to a 70% lower rate of fatty acid oxidation (10). However, the decrease in fatty acid oxidation is not due to inappropriate expression of hepatic *CPT1A*, which is similar in both genotypes, but to impaired *HMGCS2* expression in the PPAR α null mouse liver (10).

It has been proposed that HMGCS2 interacts with PPAR α and acts as a co-activator to up-regulate transcription from the PPRE of its own gene (11, 12). The HMGCS2-PPAR α interaction is enhanced by HMGCS2 palmitoylation (12), underlying a putative mechanism by which PPAR α is activated by one of its target gene products when fatty acids are available. However, this is a specific mechanism for HMGCS2, because other PPAR α target genes are not co-activated by HMGCS2 expression (11).

In addition to this network of genes regulated by PPAR α activation, another enzyme may contribute to the metabolic adaptation to fasting: SirT1 (sirtuin 1). This NAD⁺-dependent protein deacetylase is a general regulator of energy homeostasis in response to nutrient availability (13). Hepatic deletion of *SIRT1* alters PPAR α signaling, especially the induction of *FGF21* mRNA by PPAR α ligands (14).

A common feature in hepatoma cell lines is the low capacity for long chain fatty acid oxidation and ketone body production, which correlates with low expression of *HMGCS2* (15). Over-

* This work was supported by Grants BFU2007-67322/BMC (to P. F. M.) and SAF2010-15217 (to D. H.) from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and RCMNC03/08 (to D. H.) and also by funding from the Catalan government (Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya Grants 2005SGR00857 and 2009SGR163).

¹ Supported by Scholarship from Catalan government (Ajut al Personal Investigador, FI 2007–2011).

² Supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia through the Portuguese government.

³ Both authors contributed equally to this work.

⁴ To whom correspondence should be addressed: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: 34-934034500; Fax: 34-934024520; E-mail: pedromarrero@ub.edu.

⁵ The abbreviations used are: HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; 3-HB, 3-hydroxybutyrate; AcAc, acetoacetate.

HMGCS2 Regulates FAO and FGF21 Expression

expression of PPAR α in HepG2 cell can restore the expression of this and other genes, and it induces fatty acid β -oxidation (6). Therefore, we examined whether PPAR α -mediated expression of HMGCS2 acts as co-activator of this process.

In this paper we show that, in HepG2 cells, wild type human HMGCS2 expression induces both fatty acid oxidation and ketogenesis. Using shRNAs, we also show that HMGCS2 expression is necessary for PPAR α -mediated induction of fatty acid oxidation. In addition, we show that HMGCS2 expression stimulates FGF21 expression. We also report that FGF21 is induced by starvation by a mechanism involving SirT1 activity. Finally, we show that these events are dependent on HMGCS2 activity, because a catalytic dead mutant (C166A) failed to induce either fatty acid β -oxidation or FGF21 expression, whereas acetoacetate (an oxidized form of ketone bodies) can stimulate FGF21 mRNA induction by a SirT1-dependent mechanism. We propose a feed-forward model in which ketogenesis activates a SirT1-mediated response and long chain fatty acid oxidation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids—pcDNA3-HMGCS2-wt was cloned by EcoRI digestion of human HMGCS2 cDNA (16) and ligated into pcDNA3. pcDNA3-HMGCS2-C166A mutant plasmid was generated from pcDNA3-HMGCS2-wt by site-directed mutagenesis using QIAquick mutagenesis kit (Qiagen) with the following oligonucleotides: forward, 5'-gataccaccaatgccgctcactcgggtgactgctccc-3', and reverse, 5'-ggaggcagttaccacgtagcgccattggtgtatc-3', following the manufacturer's instructions. For GST pulldowns, pGEX-4T-human PPAR α (17) was used.

Animal Experiments—SirT1 liver-specific knock-out (SirT1-LKO) mice were a gift from Dr. L. Guarente (18). SirT1-LKO mice were generated by crossing a mice with a SirT1 allele containing a floxed exon 4 (19) with Cre-expressing mice driven by the liver-specific albumin promoter on the C57BL/6 background. All of the mice were housed in cages on a 12 h light:12 h dark cycle at controlled temperature (25 ± 1 °C).

Four-month-old SirT1 LKO mice and their age-matched littermate Lox controls (Cre^{-/-}, SirT1^{fllox/fllox}) were either fed *ad libitum* a standard laboratory chow diet or subjected to a 15-h overnight fast. All of the animals were sacrificed at Zeitgeber time 3 (*i.e.* 3 h after the onset of the 12-h light span). The livers were extracted and immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. Blood was collected by cardiac puncture and kept on ice until centrifugation ($1500 \times g$, 15 min at 4 °C). The serum obtained was either used immediately for assays or stored at -80 °C until analysis. All of the experimental protocols with mice were performed with approval of the animal ethics committee of the University of Barcelona (Barcelona, Spain).

Cell Culture—The human hepatocellular carcinoma cells HepG2 were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in Eagle's minimum essential medium supplemented with 100 units/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin, and heat-inactivated 10% fetal bovine serum. HEK293 cell line was cultured in DMEM supplemented with antibiotics and 10% fetal bovine serum. All of the cell culture products were

obtained from Invitrogen. Acetoacetate and 3-hydroxybutyrate were obtained from Sigma-Aldrich.

Adenoviruses Generation—Recombinant adenoviruses were constructed as described previously (20). Briefly, cDNAs from WT and mutant forms of HMGCS2 were obtained from pcDNA3-HMGCS2-wt and pcDNA3-HMGCS2-C166A, respectively, by KpnI and XhoI digestion and cloned into pAdTrack-CMV shuttle vector. The resultant plasmid was linearized by digesting with PmeI and co-transformed into *Escherichia coli* BJ5183 cells with pAdEasy-1 plasmid, which contains the adenoviral backbone. This *E. coli* strains allows homologous recombination between both plasmids, giving rise to recombinant adenoviruses. When their identity had been confirmed by restriction endonuclease analyses, these viruses were transfected into the adenovirus packaging cell line HEK293. Recombinant adenoviruses were amplified in these cells, purified by CsCl gradient and titrated using the Adeno-X rapid titer kit (BD Biosciences). As a negative control, we generated adenoviruses expressing only GFP. The parent plasmids were a gift from B. Vogelstein (The John Hopkins Oncology Center).

Adenoviral Infection—In general, HepG2 cells were seeded 24 h before infection. The cells were infected with minimum essential medium supplemented with 10% FBS at a multiplicity of infection of 40 for 48 h.

HepG2 shRNA Stable Cell Lines—Several retroviral-based plasmids containing a shRNA to human HMGCS2 were purchased from Origene (Rockville, MD). Scrambled shRNA was used as a negative control. The sequence of the human HMGCS2-specific 29-mer shRNA with highest efficacy reported here was CGTCTGTTGACTCCAGTGAAGCGCATTCT. Stable clones were generated using a PhoenixTM retroviral expression system (Orbigen, San Diego, CA). Briefly, Phoenix cells were seeded at 3×10^6 cells/100-mm plate and transfected with 10 μ g of shRNA plasmids using Lipofectamine LTX (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations 18 h later. 48 h after transfection, retrovirus in the supernatant were harvested and filtered with a 0.45- μ m low binding protein filter and added to HepG2 cells with 4 μ g/ml Polybrene (Sigma Aldrich). HepG2 cells were placed under selection with 1.0 μ g/ml puromycin (Sigma-Aldrich) until clones were formed. The clones were recovered with glass cylinders (Sigma-Aldrich) and split when they reached confluence. Successful knockdown of specific gene products was confirmed by Western blot.

siRNA Transfection—HepG2 cells were seeded 24 h before transfection at a density of 4×10^5 cells/well in 6-well plates. Specific siGENOME SMARTpool against human HMGCS2 (M-010179-01) and SIRT1 (T2004-01) were purchased from Thermo Scientific Dharmacon. siGENOME nontargeting siRNA 1 (D-001210-01-05) was used as a control. A concentration of 10 nM was transfected with Dharmafect 4 (Thermo Scientific Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. The cells were harvested 72 h post-transfection, and successful knockdown was assessed Western blot analysis.

Mitochondria Isolation—To assay HMGCS2 activity, mitochondria were obtained from 48-h infected HepG2 cells with indicated adenoviruses. The cells were harvested in cold PBS

HMGCS2 Regulates FAO and FGF21 Expression

pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40), supplemented with 0.5% nonfat milk, protease inhibitor mixture (Sigma), and 1 mM DTT for 4 h at 4 °C with agitation. The samples were then centrifuged for 1 min at 500 × g, and the resin was washed twice in NETN at room temperature. After that the samples were boiled, mixed with 2× Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE in a 8% polyacrylamide gel. Bound proteins were detected by immunoblot using anti-HMGCS2 (24) or RXR α antibody from Santa Cruz Biotechnologies (1:500, catalog number sc-553).

Real Time RNA Analysis—Total RNA was extracted from cells or liver by Tri-Reagent (Ambion) and was further treated with DNase I (Ambion). For real time PCR analysis, cDNA was synthesized from total RNA by murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) with random hexamers (Roche Diagnostics). cDNA was subjected to PCR real time analysis using TaqMan universal PCR master mix (Invitrogen catalog number 11743) and the specific gene expression primer pair TaqMan probes from Applied Biosystems (for HepG2, human gene probes were used: FGF21, Hs00173927_m1; CPT1A, Hs00157079_m1; HMGCS2, Hs00985427_m1; cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, Hs00159918_m1; CPT2, Hs00988962_m1; and PPAR α , Hs00231882_m1; for mice experiments, mouse probes were used: HMGCS2, Mm00550050_m1; FGF21, Mm00840165_g1; CPT1A, Mm00550438_m1; and SIRT1, Mm00490758_m1). Relative mRNA abundance was obtained by normalizing to 18 S levels (Applied Biosystems).

Measurement of Serum FGF21—Mouse FGF21 ELISA kit was obtained from Millipore (catalog number EZRMFGF21-26K) for the quantification of FGF21 in mice serum. The assay was conducted according to the manufacturer's protocol. Briefly, a calibration curve was constructed by plotting the difference of absorbance values at 450 and 590 nm versus the FGF21 concentrations of the calibrators, and concentrations of unknown samples (performed in duplicate) were determined by using this calibration curve.

Statistical Analysis—The data are expressed as the means \pm standard deviation. The significance of differences was determined using SPSS statistical software (SPSS Worldwide Headquarters, Chicago, IL). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Human HMGCS2 Expression Induces Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis in HepG2 Cell Line—Wild type or a mutant form of HMGCS2 enzymes and human PPAR α were expressed in HepG2 cell line by using adenoviral vector systems. The HMGCS2 C166A mutant was predicted as a dead enzyme because an equivalent cysteine residue 129 has been characterized as the catalytic site in the homologous HMGCS1, the cytosolic enzyme involved in cholesterol synthesis (25, 26). Fig. 1 shows recombinant expression of human HMGCS2 in terms of activity (Fig. 1A) and protein (Fig. 1C, bottom panels) levels. The HMGCS2 enzymatic activity (approximately 0.5 milliunit/mg) that was achieved from adenoviruses-mediated expression was similar to that observed in liver mitochondria from feed mouse (data not shown and Ref. 27). Fig. 1A also shows that the

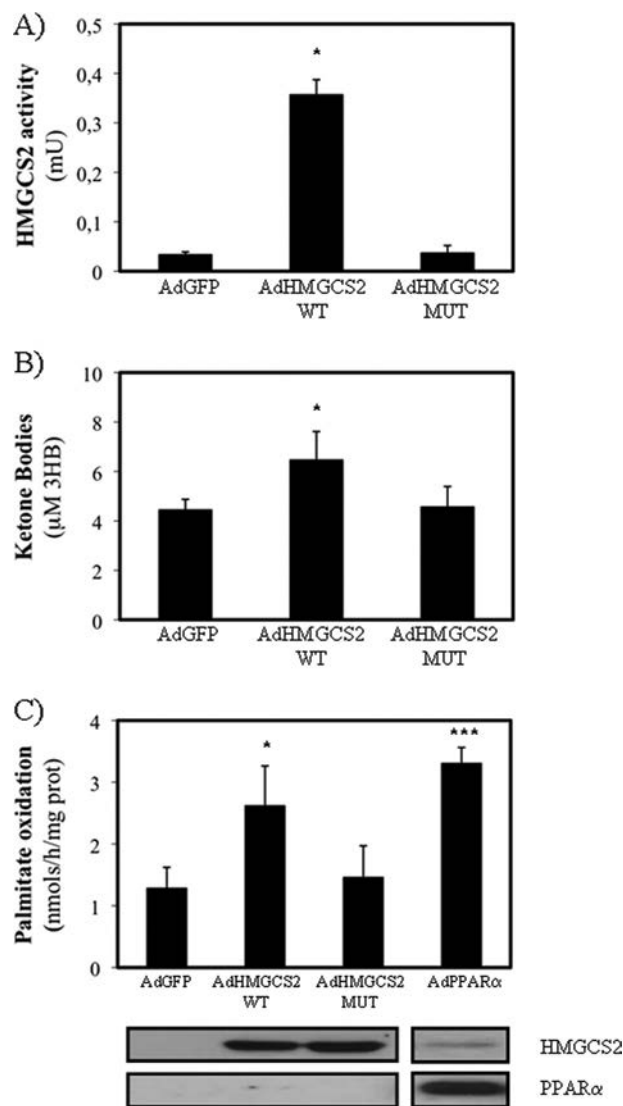


FIGURE 1. Effect of wild type or mutant HMGCS2 expression on activity, ketogenesis, and fatty acid β -oxidation. HepG2 cells were infected with adenovirus control (*AdGFP*) or expressing wild type (*AdHMGCS2 WT*) or C166A mutant (*AdHMGCS2 MUT*) human HMGCS2 for 48 h. **A**, enzymatic activity was measured in dialyzed mitochondria preparation. **B**, total ketone bodies were determined in the medium. **C**, total [14 C]palmitate oxidation was measured in HepG2 cells infected with adenoviruses expressing human HMGCS2 variants or human PPAR α (*AdPPAR α*). The average of three independent experiments is shown. The bottom panel shows a representative Western blot of recombinant PPAR α and recombinant (left) or endogenous (right) HMGCS2. 10 μ g of whole cell extract were loaded to show recombinant HMGCS2 expression, and 70 μ g were loaded to show endogenous HMGCS2. *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.

C166A mutant (*AdHMGCS2 MUT*) expresses an inactive HMGCS2 enzyme. Fig. 1B shows that expression of HMGCS2 was sufficient to induce ketone body production by the HepG2 cells, and as expected, the expression of the dead enzyme lacks this ability. Interestingly, Fig. 1C shows that recombinant expression of human HMGCS2 was also sufficient to induce fatty acid oxidation. Fig. 1C also shows that the induction of β -oxidation mediated by HMGCS2 expression is similar to the induction mediated by PPAR α expression that, as expected (6), also induces HMGCS2 protein levels (Fig. 1C, bottom panels) and HMGCS2, CPT1a, and FGF21 mRNA levels (Table 1). These data suggest that expression of HMGCS2 in HepG2 cell

and centrifuged ($500 \times g$ for 10 min). The pellet obtained was resuspended in 0.4 ml of homogenization buffer (150 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.2) and lysed by 10 cycles with each of the pestles of a mechanical Douncer homogenizer. The supernatant of a first centrifugation ($250 \times g$ for 10 min) was submitted to a second centrifugation ($16,000 \times g$ for 30 min). The resulting pellet was resuspended in three volumes of resuspension buffer (0.4 mM DTT, 1.5% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 8) and desalted through a Bio-Spin chromatography columns (Bio-Rad). Mitochondrial protein was quantified following Bradford and stored at -80°C .

Enzymatic Activity Assay—HMGCS activity determination was carried out as described previously (21). HMGCS activity was measured as the incorporation of [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetyl-CoA into HMG-CoA at 30°C in 10 min. The reaction was initiated by adding mitochondrial protein preparation to a reaction mixture (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, $20\ \mu\text{M}$ acetoacetyl-CoA, $200\ \mu\text{M}$ [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetyl-CoA 12,000 cpm/nmol (ITISA Biomedica)) in a final volume of $200\ \mu\text{l}$. After 10 min, the enzymatic reaction was stopped by adding $300\ \mu\text{l}$ of 6 N hydrochloric acid and was incubated for 2 h at 100°C . Radiolabeled HMG-CoA was recovered from the vials, diluted in Ecolite scintillation liquid (ICN) and counted in an automatic analyzer. HMGCS activity is expressed as nmol of produced HMG-CoA per minute.

Palmitate Oxidation—Palmitate oxidation was performed in MW24 plates as described previously (22). Briefly, the cells were incubated with 0.5 ml/well of forced medium (glucose and pyruvate-deprived DMEM containing 0.5 mM palmitate, 0.1 mM fatty acid-free BSA, 3 mM glucose, and 0.2 mM carnitine) for 16 h before the assay. Then the cells were incubated for 2 h in forced medium with radiolabeled palmitate at a final concentration of 0.5 mM ($2.8\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate; Amersham Biosciences). The reaction was stopped with 0.7 mM perchloric acid, and radiolabeled released $^{14}\text{CO}_2$ was recovered for 1 h in Whatman paper soaked with $25\ \mu\text{l}$ of β -phenylethylamine (Sigma-Aldrich). Then the trapped $^{14}\text{CO}_2$ in the Whatman paper was quantified in a scintillation analyzer. To measure the acid-soluble products, we followed the assay as described previously (23). Briefly, the cells were scrapped, neutralized with 0.5 N KOH, and incubated at 60°C for 30 min. The medium was then acidified by the addition of 150 mM sodium acetate and 0.3 N H_2SO_4 . The cells were centrifuged at $1,000 \times g$ for 7 min and extracted with 1:1 chloroform/methanol. The aqueous phase was counted in a scintillation analyzer (acid-soluble product). Total palmitate oxidation was calculated as the sum of CO_2 trapped plus acid-soluble products recovered.

Ketone Body Determination—The concentration of total ketone bodies in the medium of infected HepG2 cells was determined using Autokit Total Ketone Bodies (Wako, Germany), according to the manufacturer's instructions. When the sample (medium from HepG2) is mixed with R1 (20 mM phosphate buffer, pH 7, 4.27 mM thio-NAD $^+$) and R2 (0.2 M Good's buffer, pH 9.0, 3200 IU/ml 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, and 2.65 mM NADH), AcAc, and 3-HB present in the medium are converted to 3-HB and AcAc, respectively, in the presence of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, NADH, and thio-NAD. Then the 3-HB and AcAc produced in the enzymatic reactions are reverted to AcAc and 3-HB, again. During these cyclic reac-

tions, NAD $^+$ and thio-NADH are produced. The concentration of total ketone bodies in each sample is determined by measuring the rate of thio-NADH production. Thio-NADH is measured spectrophotometrically at 405 nm using a calibration curve previously performed by plotting the absorbance corresponding to 3-HB standards of known concentrations.

Western Blot Analysis—Whole protein cell extracts were obtained from infected HepG2 cells or liver of mice. Briefly, the cells were homogenized in Nonidet P-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% Nonidet P-40) supplemented with a mixture of protease inhibitors (Sigma Aldrich) and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma Aldrich). Proteins from mouse liver were obtained by homogenization in radioimmune precipitation assay buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.0) containing protease inhibitor mixture (Sigma Aldrich). Protein extracts were subjected to centrifugation at $16,000 \times g$ for 15 min. The supernatant (whole protein cell extract) was quantified following Bradford and stored at -80°C . Whole protein cell extracts were loaded in a 8% SDS-PAGE gel and then transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA) and probed with different antibodies. The antibodies used were: human HMGCS2 polyclonal antibody obtained as described previously (24) or mHMGCS from Santa Cruz Biotechnologies (1:500, catalog number sc-33828); SIRT1 antibody from Upstate Biotechnologies (1:1000, catalog number 07-131) or from Santa Cruz Biotechnologies (1:500, catalog number sc-15404); PPAR α antibody from Santa Cruz Biotechnologies (1:1000, catalog number sc-1985); RXR α antibody from Santa Cruz Biotechnologies (1:500, catalog number: sc-553); actin antibody from Sigma-Aldrich (1:1000, catalog number A2066); and tubulin antibody from Calbiochem (1:1000, catalog number: CP06). Detection was carried out using an ECL kit Chemiluminescence detection kit for HRP (Biological Industries).

Immunocytochemistry—HepG2 were seeded onto coverslips (6×10^5 cell/p60) 24 h before infection. HepG2 cells were infected with adenovirus, as indicated in the figure legends, and after 48 h of infection they were fixed with 4% paraformaldehyde. Antibody staining on fixed cells was done using a standard protocol. The cells were permeabilized using 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich). The primary antibodies used were goat anti-PPAR α (1:1000, Santa Cruz Biotechnologies, sc-1985) and rabbit anti-HMGCS2 (1:100, Santa Cruz Biotechnologies, sc-33828). Secondary antibodies were obtained from Invitrogen: Alexa Fluor $^{\text{®}}$ 488 donkey anti-goat IgG (H+L) *2 mg/ml (1:1000), Alexa Fluor $^{\text{®}}$ 647 chicken anti-rabbit (H+L) *2 mg/ml (1:500). DAPI (6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma) was used to label DNA. Fluorochrome-labeled samples were analyzed and captured using a Leica SP2 confocal microscope. Final artwork was processed using ImageJ software.

Pulldown Assay—GST and GST-PPAR α fusion proteins were produced in *E. coli* and purified on glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences), as described previously (17). The amount and integrity of GST was checked by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. $250\ \mu\text{g}$ of whole cell protein extracts from HepG2-infected cells were incubated in the presence of equivalent amounts of immobilized GST or GST-PPAR α (12.5 μg) in 1 ml of binding buffer NETN (20 mM Tris,

TABLE 1
mRNA induction of different PPAR α target genes

HepG2 cells were infected with adenovirus expressing human PPAR α or human wild type or C166A mutant of HMGCS2. The mRNA levels were determined by real time PCR. The data represent the fold of induction of the specific mRNA after adenovirus infection of at least three independent experiments. PCK1, cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase; ND, not determined.

	AdPPAR α	AdHMGCS2 WT	AdHMGCS2 MUT
HMGCS2	45.0 \pm 15.7 ^a	ND	ND
CPT1A	2.74 \pm 0.9 ^b	1.27 \pm 0.7	0.86 \pm 0.2
CPT2	7.35 \pm 5.1	ND	ND
PCK1	5.95 \pm 3.3 ^b	ND	ND
FGF21	15.4 \pm 5.8 ^b	3.3 \pm 1.03 ^b	1.0 \pm 0.3
PPAR α	ND	1.41 \pm 0.2	1.61 \pm 0.3

^a $p < 0.001$.

^b $p < 0.05$.

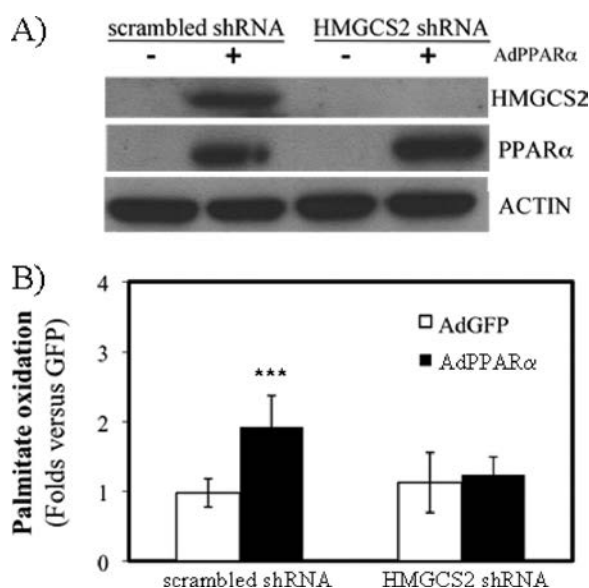


FIGURE 2. Effect of HMGCS2 expression on PPAR α -mediated induction of fatty acid β -oxidation. HepG2 stable cell lines expressing a shRNA control (scrambled shRNA) or a shRNA specific for HMGCS2 were infected with human PPAR α expressing adenovirus (AdPPAR α). *A*, representative Western blot analysis of recombinant PPAR α , endogenous HMGCS2, and actins as loading control. 70 μ g of whole cell extract were loaded. *B*, total [¹⁴C]palmitate oxidation was measured in HepG2 cells expressing (scrambled shRNA) or not expressing (HMGCS2 shRNA) HMGCS2. The results are expressed in PPAR α fold induction versus GFP infection. The average of three independent experiments is shown. ***, $p < 0.001$.

line is sufficient to restore the HMG-CoA cycle (28) and that activation of ketogenesis from acetyl-CoA in turn activates fatty acid β -oxidation.

Human HMGCS2 Expression Is Necessary for PPAR α -mediated Induction of Fatty Acid Oxidation—PPAR α expression in HepG2 cells induces both HMGCS2 and mitochondrial fatty acid oxidation (6). Therefore, we hypothesized that active ketogenesis could be necessary for PPAR α -mediated induction of fatty acid β -oxidation. Fig. 2*A* shows that a specific shRNA abrogated HMGCS2 induction mediated by PPAR α . Fig. 2*B* shows that β -oxidation induction mediated by PPAR α was blunted by down-regulation of HMGCS2 expression. These data suggest that PPAR α induces fatty acid oxidation but importantly that the expression of the ketogenic key enzyme HMGCS2 is needed for the induction.

HMGCS2 Regulates FGF21 Expression in HepG2 Cell Line—The effect of HMGCS2 on PPAR α -mediated stimulation of fatty acid oxidation could be mediated by direct HMGCS2 co-

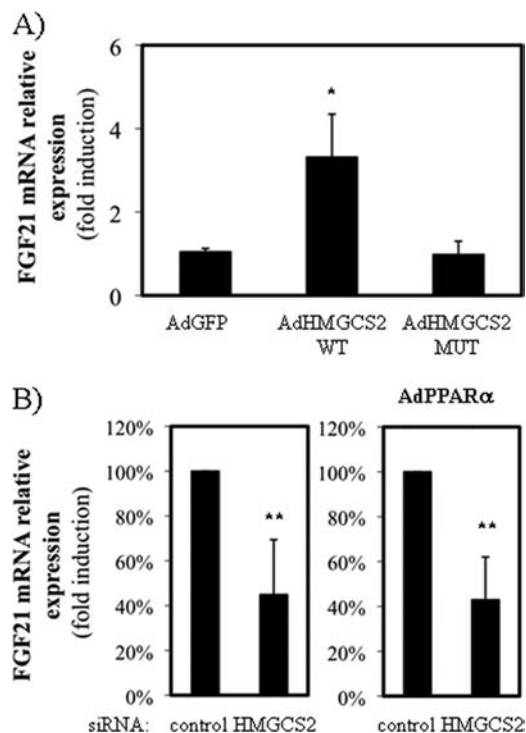


FIGURE 3. HMGCS2 regulates FGF21 expression in HepG2 cell line. *A*, FGF21 mRNA levels of cells infected with adenoviruses expressing GFP (AdGFP), wild type (AdHMGCS2 WT), or C166A dead mutant (AdHMGCS2 MUT) human HMGCS2. *B*, FGF21 mRNA levels of HepG2 transfected with siRNA control siRNA (nontargeting) or specific siRNA against HMGCS2 and infected with adenoviruses expressing GFP (left panel) or human PPAR α (AdPPAR α ; right) is shown. The results are expressed as the percentages of induction by PPAR α in the presence of HMGCS2 (100%) or in the absence of HMGCS2. The average of five independent experiments is shown. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

activation (11, 12) or a metabolic effect driven by stimulation of fatty acid degradation (Fig. 2). Therefore, we analyzed the effect of HMGCS2 expression on PPAR α target genes. Fig. 3*A* shows that overexpression of HMGCS2 induced FGF21 expression and that catalytic activity of the enzyme was needed for this mRNA induction. Fig. 3*B* shows that knockdown of HMGCS2 down-regulated FGF21 mRNA levels in the absence (Fig. 3*B*, right panel) or presence (Fig. 3*B*, left panel) of PPAR α . This effect was specific for FGF21, because the mRNA levels of other PPAR α target genes were not affected by HMGCS2 expression (Table 1).

To follow the activator effect of HMGCS2, we performed luciferase promoter assays in which no co-activation by HMGCS2 was observed on PPAR α mediated-induction of CPT1a or HMGCS2 promoters (data not shown). These data are consistent with the lack of nuclear co-localization of recombinant PPAR α and endogenous HMGCS2 shown by immunohistochemistry analysis in HepG2 cells (Fig. 4*A*). In addition, pull-down experiments showed that no interaction of HMGCS2 overexpressed in HepG2 with the GST-PPAR α purified protein that can interact with its RXR α partner (Fig. 4*B*). These results indicate that the effect on FGF21 expression observed in HepG2 cells was not related to co-activation of PPAR α by HMGCS2.

FGF21 Is a Sirt1 Target Gene during Fed-to-Fast Transition—An alternative metabolic hypothesis for HMGCS2 stimulation of FGF21 is that the effect of HMGCS2 on ketogenesis and

HMGCS2 Regulates FAO and FGF21 Expression

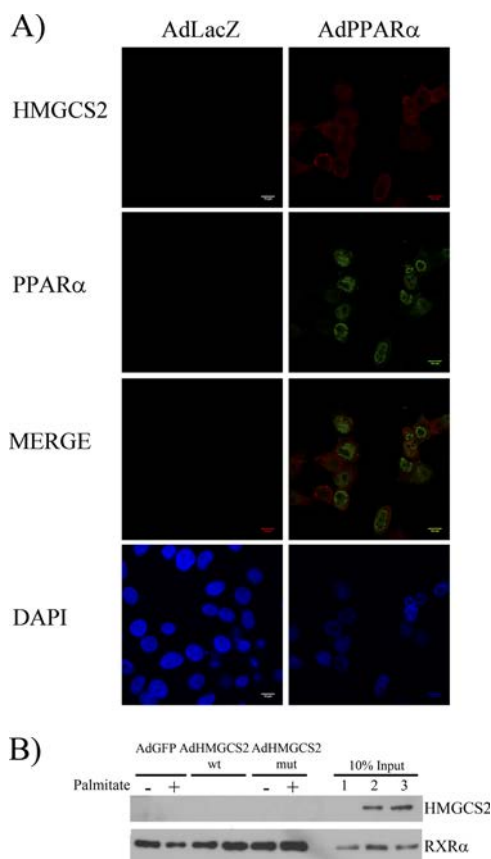


FIGURE 4. Recombinant PPAR α does not co-localize nor interact with endogenous HMGCS2. *A*, immunohistochemical analysis of recombinant PPAR α and endogenous HMGCS2 expression in HepG2 cell. Cells infected with adenovirus control (*AdLacZ*) or adenovirus encoding human PPAR α (*AdPPAR α*) were fixed and stained with DAPI and incubated with anti-PPAR α or anti-HMGCS2 antibody followed by Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 647, respectively, and viewed with a confocal microscope. *B*, pull-down experiment of recombinant GST-PPAR α . HepG2 cells were infected with adenoviruses expressing GFP (*AdGFP*), wild type (*AdHMGCS2 WT*), or C166A dead mutant (*AdHMGCS2 MUT*) human HMGCS2 were treated (+) or not (–) with palmitate 0.5 mM for 16 h. Whole protein cell extracts of the infected HepG2 cells were incubated with GST-PPAR α generated in *E. coli*. GST recombinant protein was captured by glutathione-Sepharose beads, and the recovered beads were immunoblotted with anti-HMGCS2 and RXR α antibodies. Inputs show endogenous RXR α and recombinant HMGCS2 variants in whole protein cell extracts.

FGF21 expression could be correlated throughout the NAD⁺ intracellular levels because: (i) ketone body production implies the reduction of acetoacetate to β -hydroxybutyrate with the concomitant generation of NAD⁺ (2) and (ii) the effect of PPAR α ligands on FGF21 expression are dependent on SirT1 activity (14). Therefore, we hypothesize that HMGCS2 could affect FGF21 expression via a mechanism relaying on ketogenesis stimulation of SirT1 activity. To confirm this hypothesis, we studied the mRNA expression FGF21 in wild type or SirT1 liver knock-out mice during the fed-to-starved transition. Fig. 5A shows that FGF21 induction mediated by starvation was dependent on SirT1. Fig. 5A also shows a specific effect for FGF21, because the starvation-associated induction of other PPAR α target genes, like CPT1A and HMGCS2, was not affected (*black bars* compared with *dark gray bars*). Fig. 5B shows that the circulating levels of FGF21 protein were impaired in starved SirT1 LKO, indicative of the physiological

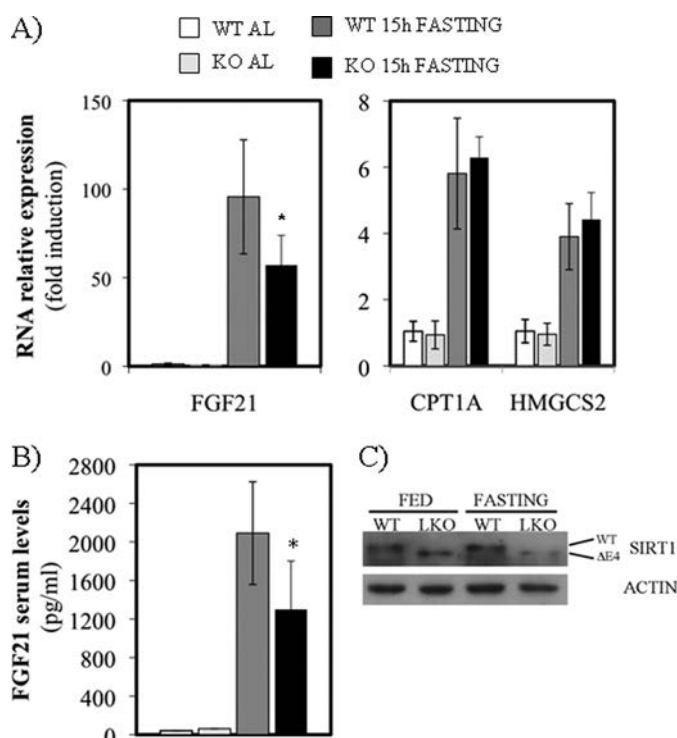


FIGURE 5. FGF21 is a SIRT1 target gene during fed-to-fast transition. *A*, quantitative RT-PCR analysis of FGF21 (*left panel*) and HMGCS2 and CPT1A (*right panel*) gene expression in liver from mice fed *ad libitum* (AL) or fasted for 15 h normalized to 18 S expression. *B*, ELISA measurement of FGF21 in serum. *C*, Western blot of liver extracts from mice WT and LKO between 5 and 10 animals/group were used. *Open bars* represent WT mice fed *ad libitum*, *pale gray bars* represent SIRT1 LKO fed *ad libitum*, *dark gray bars* represent 15-h fasted WT mice, and *closed bars* represent 15-h fasted SIRT1 LKO. *, $p < 0.05$.

relevance of SIRT1 dependence. Fig. 5C shows that SirT1 is specifically knocked out in the livers of SirT1 LKO mice (18).

Acetoacetate Modulates FGF21 mRNA Expression by a SirT1-dependent Mechanism—Next, to pursue the hypothesis about NAD⁺ levels, we treated HepG2 cells with the oxidizing (acetoacetate) or reducing (β -hydroxybutyrate) partners of ketone bodies. Fig. 6A shows that acetoacetate induced FGF21 expression in a dose-dependent manner, whereas β -hydroxybutyrate did so to a lesser extent. Fig. 6B (*left panel*) shows that acetoacetate mediated induction of FGF21 expression was dependent on SirT1 expression. Fig. 6B (*right panel*) shows that acetoacetate did not affect endogenous SirT1 levels and that the siRNA treatment was efficient. These results suggest that the products of ketogenesis can stimulate gene expression through the SirT1 activity and therefore that HMGCS2 could control metabolic processes other than ketogenesis in this cell line.

DISCUSSION

Fatty acid β -oxidation and ketogenesis are induced during fasting or lactation (1) and also in pathological situations such as diabetes (reviewed in Ref. 29). PPAR α mediates the induction of genes responsible for controlling both processes. The HMGCS2 gene controls ketogenesis (2) and is a PPAR α target (4–6). Studies with the homologous HMGCS1 (19, 20) (an isotype that catalyzes the same reaction in the cytosol, where it controls the mevalonate pathway) suggested that cysteine 166 is part of the active site of the mitochondrial HMGCS2 enzyme.

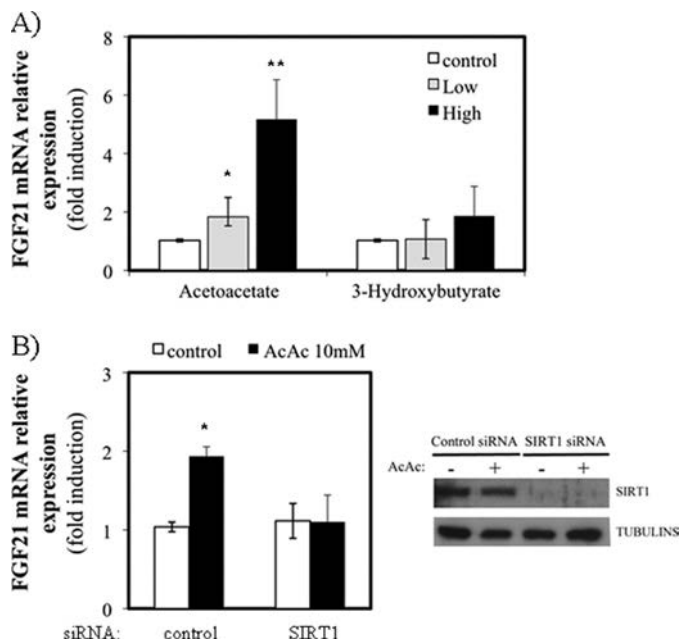


FIGURE 6. **FGF21 is induced by acetoacetate in HepG2 cell line.** A, HepG2 cells were treated with acetoacetate 1 (low) or 10 mM (high) or with 3-hydroxybutyrate 2 (low) or 20 mM (high) for 5 h in regular growth medium. Relative expression of FGF21 mRNA was assessed by real time PCR. The average of three independent experiments is shown. B, left panel, levels of mRNA of FGF21 in cells transfected with a siRNA control or siRNA specific for SIRT1 in the absence (open bars) or 10 mM acetoacetate (closed bars). Right panel, the levels of SIRT1 protein cells transfected with a control siRNA or specific SIRT1 siRNA, in the absence (–) or the presence (+) of 10 mM acetoacetate. The average of three independent experiments is shown. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

Therefore, in this paper, we generated two adenoviruses expressing wild type and a catalytically inactive mutant (C166A; Fig. 1A) of the human HMGCS2. When HMGCS2 activity was expressed, HepG2 cells become ketogenic (Fig. 2B). Interestingly, we also observed that these cells had a greater capacity to oxidize long chain fatty acids. The β -oxidation induction was similar to that seen in PPAR α -infected cells (Fig. 1C). These results suggest that expression of the gene not only controls ketogenesis but can also control the β -oxidation pathway in certain circumstances.

Recombinant PPAR α expression in HepG2 cells induces β -oxidation of fatty acids and the expression of genes such as FGF21, HMGCS2, and CPT1A (Ref. 6 and Table 1). It has been proposed that HMGCS2 is a co-activator of PPAR α (11) through a mechanism involving the HMGCS2 palmitoylation of Cys-166 (12). In fact, we found that expression of HMGCS2 was involved in the induction of fatty acid oxidation mediated by PPAR α (Fig. 2). However, our data do not support the role of HMGCS2 as a PPAR α co-activator. We did not observe an interaction between PPAR α and HMGCS2 nor a nuclear co-localization of both proteins (Fig. 4). In addition, no effect of co-activation was observed at the level of reporter gene even for HMGCS2, which was proposed (12) as the target of PPAR α co-activation (data not shown). Therefore, we have sought an alternative hypothesis to explain the role of HMGCS2 in controlling fatty acid oxidation.

Liver synthesizes acetoacetate through the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) cycle, which is driven by the three mitochondrial located enzymes acetoacetyl-CoA thiolase

(EC 2.3.1.9), hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (HMGCS2; EC 4.1.3.5), and hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (EC 4.1.3.4) and produces 1 mol of acetoacetate, 1 mol of acetyl-CoA, and 2 mol of free CoA from three molecules of acetyl-CoA (2). Acetoacetate is further reduced to β -hydroxybutyrate through mitochondrial β -hydroxybutyrate dehydrogenase (EC 1.1.1.30), driven by high levels of NADH in hepatic mitochondria. Interestingly, in humans (30) and other mammals (31), a cytosolic isotype of β -hydroxybutyrate dehydrogenase has been characterized, suggesting a reversible conversion between acetoacetate and β -hydroxybutyrate depending on the $[NAD^+]/[NADH]$ ratio. In addition, diet manipulation, like caloric restriction, affects the $[NAD^+]/[NADH]$ ratio in liver and muscle (18). In this study we hypothesized that HMGCS2, widely expressed in human tissues (16), could modulate $[NAD^+]/[NADH]$ ratio by feed-forward ketogenesis. HMGCS2 activity specifically induces FGF21 mRNA levels in HepG2 cells (Fig. 3A), whereas other PPAR α target genes remained unaffected (Table 1). Also, knockdown of HMGCS2 clearly affected FGF21 expression and its induction by PPAR α (Fig. 3B). FGF21 has been shown to be highly sensitive to SirT1 activity on ligand-dependent PPAR α transactivation (14), and our data clearly indicate that fasting-induced expression of FGF21 was blunted in SirT1 liver-specific knock-out, whereas other PPAR α target genes were unaffected in this experimental condition (Fig. 5). This result indicates that FGF21, in terms of mRNA levels or the circulating protein, is highly sensitive to SirT1 activity during fasting.

To explain our data, we propose that under certain circumstances HMGCS2 activity, through acetoacetate generation, could modulate the cytosolic $[NAD^+]/[NADH]$ ratio and therefore SirT1 activity. Consistent with this hypothesis, we observed that the addition of acetoacetate, but not β -hydroxybutyrate, to the HepG2 cell medium induces FGF21 expression in a mechanism dependent on SirT1 (Fig. 6). Therefore, HMGCS2 seems to have a specific effect on gene expression, which does not depend on PPAR α co-activation. However, our results do not fully explain why HMGCS2 expression is necessary for the induction of β -oxidation mediated by PPAR α . It is possible that changes in the mitochondrial $[NAD^+]/[NADH]$ ratio are also partly responsible for this phenomenon. However, it is also possible that removal of acetyl-CoA, as acetoacetate, accelerates the catabolic process and that both FGF21 mRNA expression and β -oxidation are stimulated by HMGCS2 through independent mechanisms.

Proliferating cells do not express HMGCS2 activity (10, 15). The human gene is a target of *c-Myc*, and its expression is characteristic of differentiated cells of the colon (24). The role of oxidative metabolism in cell transformation has recently been highlighted (reviewed in Ref. 32). In fact, it has been found that p53 up-regulates fatty acid oxidation induced by glucose starvation (33), and it is proposed that this effect would be part of its role as a tumor suppressor gene because active β -oxidation would protect the cell from Warburg effect (reviewed in Ref. 34). We have not observed a clear effect of HMGCS2 gene expression on cell proliferation, a target gene of p53 (data not shown). However, we have shown how HMGCS2 expression produces metabolic effects capable of inducing the expression

HMGCS2 Regulates FAO and FGF21 Expression

of genes such as *FGF21* and altering the oxidative flux of long chain fatty acids.

In conclusion, our results suggest that *HMGCS2* expression affects the PPAR α -mediated response. However, we propose an alternative mechanism to the previously proposed co-activation of PPAR α (11, 12). Our mechanism would be related to changes in the metabolites of the cell induced by the acceleration of ketogenesis, although these changes could be related to factors other than SirT1 activity.

Acknowledgments—We are truly grateful to Dr. Leonard Guarente and Dr. Hung-Chun Chang (Department of Biology, MA Institute of Technology) for liver-specific SirT1 KO mice.

REFERENCES

1. McGarry, J. D., and Foster, D. W. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 395–420
2. Hegardt, F. G. (1999) *Biochem. J.* **338**, 569–582
3. Napal, L., Marrero, P. F., and Haro, D. (2005) *J. Mol. Biol.* **354**, 751–759
4. Rodríguez, J. C., Gil-Gómez, G., Hegardt, F. G., and Haro, D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18767–18772
5. Ortiz, J. A., Mallolas, J., Nicot, C., Bofarull, J., Rodríguez, J. C., Hegardt, F. G., Haro, D., and Marrero, P. F. (1999) *Biochem. J.* **337**, 329–335
6. Hsu, M. H., Savas, U., Griffin, K. J., and Johnson, E. F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27950–27958
7. Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999) *J. Clin. Invest.* **103**, 1489–1498
8. Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., Elmquist, J. K., Gerard, R. D., Burgess, S. C., Hammer, R. E., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2007) *Cell Metab.* **5**, 415–425
9. Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (2007) *Cell Metab.* **5**, 426–437
10. Le May, C., Pineau, T., Bigot, K., Kohl, C., Girard, J., and Pegorier, J. P. (2000) *FEBS Lett.* **475**, 163–166
11. Meertens, L. M., Miyata, K. S., Cechetto, J. D., Rachubinski, R. A., and Capone, J. P. (1998) *EMBO J.* **17**, 6972–6978
12. Kostiuik, M. A., Keller, B. O., and Berthiaume, L. G. (2010) *FASEB J.* **24**, 1914–1924
13. Nemoto, S., Fergusson, M. M., and Finkel, T. (2004) *Science* **306**, 2105–2108
14. Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X., and Li, X. (2009) *Cell Metab.* **9**, 327–338
15. Prip-Buus, C., Bouthillier-Voisin, A. C., Kohl, C., Demaugre, F., Girard, J., and Pegorier, J. P. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 291–298
16. Mascaró, C., Buesa, C., Ortiz, J. A., Haro, D., and Hegardt, F. G. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 385–390
17. Barrero, M. J., Camarero, N., Marrero, P. F., and Haro, D. (2003) *Biochem. J.* **369**, 721–729
18. Chen, D., Bruno, J., Easlon, E., Lin, S. J., Cheng, H. L., Alt, F. W., and Guarente, L. (2008) *Genes Dev.* **22**, 1753–1757
19. Cheng, H. L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J. P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F. W., and Chua, K. F. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 10794–10799
20. He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2509–2514
21. Clinkenbeard, K. D., Reed, W. D., Mooney, R. A., and Lane, M. D. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 3108–3116
22. García-Martínez, C., Marotta, M., Moore-Carrasco, R., Guitart, M., Camps, M., Busquets, S., Montell, E., and Gómez-Foix, A. M. (2005) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C1264–C1272
23. Zhou, W., Han, W. F., Landree, L. E., Thupari, J. N., Pinn, M. L., Bililign, T., Kim, E. K., Vadlamudi, A., Medghalchi, S. M., El Meskini, R., Ronnett, G. V., Townsend, C. A., and Kuhajda, F. P. (2007) *Cancer Res.* **67**, 2964–2971
24. Camarero, N., Mascaró, C., Mayordomo, C., Vilardell, F., Haro, D., and Marrero, P. F. (2006) *Mol. Cancer Res.* **4**, 645–653
25. Misra, I., Narasimhan, C., and Mizioro, H. M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12129–12135
26. Rokosz, L. L., Boulton, D. A., Butkiewicz, E. A., Sanyal, G., Cueto, M. A., Lachance, P. A., and Hermes, J. D. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 1–13
27. Valera, A., Pelegrin, M., Asins, G., Fillat, C., Sabater, J., Pujol, A., Hegardt, F. G., and Bosch, F. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6267–6270
28. Quant, P. A. (1994) in *Essays in Biochemistry* (Tipton, K. F., ed) pp. 13–24, Portland Press, London
29. Eledrisi, M. S., Alshanti, M. S., Shah, M. F., Brolosy, B., and Jaha, N. (2006) *Am. J. Med. Sci.* **331**, 243–251
30. Guo, K., Lukacik, P., Papagrigoriou, E., Meier, M., Lee, W. H., Adamski, J., and Oppermann, U. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 10291–10297
31. Koundakjian, P. P., and Snoswell, A. M. (1970) *Biochem. J.* **119**, 49–57
32. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C. B. (2008) *Cell Metab.* **7**, 11–20
33. Ide, T., Brown-Endres, L., Chu, K., Ongusaha, P. P., Ohtsuka, T., El-Deiry, W. S., Aaronson, S. A., and Lee, S. W. (2009) *Mol. Cell.* **36**, 379–392
34. Levine, A. J., and Puzio-Kuter, A. M. (2010) *Science* **330**, 1340–1344

