



Control transcripcional i caracterització molecular de l'alanina aminotransferasa mitocondrial en l'orada (*Sparus aurata*)

María del Carmen Salgado Martín

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 (FARMÀCIA)

CONTROL TRANSCRIPCIONAL I CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE L'ALANINA AMINOTRANSFERASA MITOCONDRIAL EN L'ORADA (*Sparus aurata*)

María del Carmen Salgado Martín
2011



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOTECNOLOGIA
BIENNI 2005-2007

CONTROL TRANSCRIPCIONAL I CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE L'ALANINA AMINOTRANSFERASA MITOCONDRIAL EN L'ORADA (*Sparus aurata*)

Memòria presentada per María del Carmen Salgado Martín per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directors:

Autora:

Isabel Vázquez Baanante

Isidoro Metón Teijeiro

María del Carmen Salgado Martín

María del Carmen Salgado Martín
2011

"In God we trust, all others must bring data"
Dr. W. Edwards Deming

AGRAÏMENTS

Al final, més aviat o més tard, tot arriba i ja estic dessitjant tenir entre els braços el ram de flors (que si han pres nota els meus companys portarà uns preciosos girasols) la qual cosa indicaria que, per fi, ja sóc doctora!!!

A nivell emocional, definiria el període de la tesi com a un estat de transtorn maníac depressiu temporal, alternant períodes d'eufòria, degut a la consecució d'algun resultat, amb períodes més obscurs quan després de mooolt de temps de dedicació de temps i esforç a un projecte se'n va a norris. Sortosament, després de tant de temps aprens a gestionar millor aquesta espècie de "mercat de valors" boig que representa aquest període d'aprenentatge i madures a nivell emocional.

Personalment, el que més valoro d'aquesta etapa no són els coneixements tècnics, ni les habilitats que he anat adquirint, que certament són importants i m'ajudaran a avançar professionalment. Amb lo que de debò em quedo és amb totes les persones que han estat amb mi des del principi i les que he anat coneixent durant aquest temps, amb les que he passat molt bons moments i m'han ajudat en tot moment, i a les que vull donar les gràcies.

Voldria començar agraint a la meva família, especialment als meus pares, a la meva germana i al Lluís, així com als meus amics de sempre, el recolçament que he rebut d'ells durant tot aquest temps. Sempre han estat al meu costat, preguntant-me com anava la tesi i per tant, algun "rollo" sobre l'HNF4, etc han hagut de patir..., especialment Lluís, pobre.

Agrair als meus directors de tesi, Maribel i Isidoro la confiança que van depositar en mi des del moment que vaig entrar al laboratori com a estudiant de treball pràctic i la seva dedicació en la meva formació, incloent la correcció de la tesi que pobres, li han donat mil voltes!!! També agrair a Felipe la seva dedicació, i fer-la extensiva al grup de biologia, que molt altruïstament van cuidar de les orades.

Als meus companys de laboratori, que són fantàstics tots ells!!!!, i que els trobaré a faltar moltíssim quan ja no hi sigui al departament. He passat molts, molts bons moments amb vosaltres i sou realment meravellosos, i he rebut una ajuda enorme de tots vosaltres. Miriam, ha sigut un plaer

compartir poiata amb tu, has sigut molt més que una companya, i ets una persona excel·lent. No oblidaré mai els moments de riure al lab, les sortides a Manaus, els viatges... Diego, el business man del lab!!! Eres un crack y sí, te echamos de menos!! Tus chistes, tu sentido del humor, los “momentos bananeros”... Nos hemos reído un montón contigo y he pasado muy buenos momentos en el lab, en los viajes y las salidas nocturnas!!. Además he ampliado mi vocabulario: remera, boludo, no sé qué del marrón...jaja!! el toc argentí del lab!!! A Ginny, hem passat moments molt divertits amb tu, ets tota una sorpresa!! Gràcies a Marina, la freak del labo!! I la que ens ha posat en ordre la vida!!! Mai et podré agrair prou tota l'ajuda que m'has donat, ets de les



persones més altruistes que conec i ets súper divertida, i sempre maquinant algo... serèbro frito!!! et trobaré molt a faltar, em quedaré “triste i azul”!!! Ivan! O como diría Diego... I-van! Otro altruista en el lab, muchas gracias por todo y por haberme enseñado el GraphPad!! Como te dije un día, entre tú



y Lilia me habéis cambiado completamente la visión de los portugueses (considerando los más televisivos del ámbito futbolero), sois adorables y bellísimas personas!!! Eso sí, un poco mentirosillo eh!! Que dices que no sabes cocinar y te presentas un día con solomillo a la reducción de oportó!! Tú sí que te cuidas!! Albert!! Què feies allà amagat a biologia!! Hauries d'haver vingut

aquí des del principi!! El freak dels peixos!! Ets un tros de pa!! Junt amb Marina, els artistes del laboratori!!! Nois, teniu un talent enorme!! Per cert, els dibuixos són realitzats per Marina (els còmics) i Albert (la sardina flamenca). Ahmad!! It's been a short stage, but I will remember you! I've learned a lot about your culture, your food... you are a great chef!! Thank you very much for all!! Y esos italianos!!! Vittorio!!! Don Corleone!! Al principio creíamos que eras muy reservado, pero nada de eso!! Eres súper gracioso, “viriquino”!! Desde luego con nosotros tuviste que aprender castellano sí o sí... cuando estuviste pasamos una época genial, junto con Diego y Marina,



gracias!!!. Fabio!! Lasaña más buena no he probado en mi vida!! Qué pena que la receta sea secreto familiar!! Gràcies també a totes les noies que han passat pel lab fent treball pràctic o màster: Loly, Anna Palau, Anna Aguilar, Judith del Castillo, Ana, María José, Pablo... especialment a Sonia, Judith i Andreia. Sonia i Judith, ens ho vam passar genial amb vosaltres, sou unas fiesteras!! Andreia! La chica más alegre, vital y simpática que he conocido nunca!! Echo en falta los momentos pasarinho y los champiñones... y el piri piri!!

Als meus companys d'altres laboratoris!!! Em sento molt afortunada d'haver estat en aquest departament, sembla un pol d'atracció de gent estupenda!!

Els meus veïns!! Vero, Marta, Toni, Benjamín, Pahissa, Massimo, Dani, Oriol, Paola, David!! Juntament amb Lilia y Sebas, ché culeado!! Ese trío argentino!!! Esos mendozinos!! Soys súper vitales, cariñosos... además de haberme enseñado argentino, que soy ya una experta, me descubristeis la cocina argentina, vaya asados y empanadas que habéis preparado chicos!! Vero, la chica "chiqui guau guau", la organizadora de eventos... sin ti no hubiésemos echo la mitad de cosas!! Sebas y Diego, me habéis echo reir un montón!! Subís la moral a cualquier mina!! Jaja!! Dani!! Echamos de menos tus visitas imprevistas al lab, siempre sorprendiéndonos con alguna de tus ocurrencias... Marta, Toni, Benjamín, Pahissa... una época inolvidable, gràcies nois!! Las paellas, els "cerebritos", les sortides a la Mola...

Gràcies també a la resta de companys amb els que he passat també molts bons moments: al congrés de Saragossa, a les sortides de departament...!! Als Colis, Lucía, la andaluza más simpática, y compañera de sufrimientos del carné de conducir!, Laia, David, Fernando, Eva, Rafa, Laura, Elaine, la brasileña más graciosa y vital que he conocido, mujer de armas tomar!!, Carla, la sushi-adicta, Lorena!! A las Ciudad!, que he passat també moltes estones divertides als monòlegs, a Sant Joan de les Abadesses..! Alicia, Eli, Carlota, Xènia, Núria, sou fantàstiques!! Als Tauler, Lilia, Sebas, Chandru, Natalie!! Als Fausto, Chandru, Pep, Paula, Kamil, Mida... súper bones persones y Laura, que siempre estás con una sonrisa y con optimismo!! También gràcies a les STs, Xisca, Núria, Joana, Cris, Anna, Mariona, Mar, Ana Lu, Elena, Cédric!!

Moltes gràcies també a les secretàries del departament, Mari Carmen, Brugués, Tina i Montse, que ens ajudeu en tot moment, amb la burocràcia, les comandes... i que no sempre us facilitem del tot les coses... perdent albarans, etc. Gràcies als tècnics, Sílvia, Andrés, que s'ha esforçat un munt per apendre-ho tot de cero, i a Quim, que gràcies a ells tot funciona millor al departament i s'encarreguen de tots els problemes. Gràcies també a tots els professors del departament, Albert Ferrer, Montse, Diego, Pedro, Joan Carles, Pepita, Laura Baldomà, Rosa, Albert Tauler, Fausto, Guillermina, Dolors, Laura Herrero, dels que he après molt el temps que he estat amb ells a les pràctiques.

ABREVIATURES

AF	factor d'activació
ALT	alanina aminotransferasa
ALDH2	aldehid deshidrogenasa 2
AMP	adenosina monofosfat
AMPK	proteïna quinasa activada per AMP
cALT	alanina aminotransferasa citosòlica
CBP	<i>CREB binding protein</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CMV	citomegalovirus
COUP-TF	<i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
CRM1	<i>exportin 1</i>
CYP	<i>Cytochrome P450</i>
DBD	domini d'unió al DNA
ddNTP	didesoxinucleòtid trifosfat
DEPC	dietilpirocarbonat
DIG	digoxigenina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	dimetil sulfòxid
DN-HNF4 α	dominant negatiu d'HNF4 α
DTT	ditiotreitòl
EDTA	àcid etilendiamino tetra acètic
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FBPasa	fructosa-1,6-bifosfatasa
Foxo	<i>forkhead box</i>
fru-2,6P ₂	fructosa-2,6-bifosfat
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
GDH	glutamat deshidrogenasa
GK	glucoquinasa
GLUT	transportador de glucosa
GRIP-1	<i>glutamate receptor-interacting protein 1</i>
Hepes	4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etansulfat
HDAC	histona desacetilasa
HDL	lipoproteïnes d'alta densitat
HNF	factor nuclear hepatocitari
HMG-Coa sintetasa	hidroximetil glutaril coenzim A sintetasa
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IRS	substrat del receptor de la insulina
K _m	constant de Michaelis-Menten
KLF	<i>Krüppel-like factors</i>
L-CPT1	carnitina palmitoiltransferasa I hepàtica
LB	medi de cultiu Luria-Bertrani
LBD	domini d'unió al lligand
LDL	lipoproteïnes de baixa densitat
LPS	lipopolisacàrid

Luc	gen de la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>
mALT	alanina aminotransferasa mitocondrial
MCD	dieta deficient en metionina i colina
MIB	tampó d'aïllament de mitocondris
MODY	<i>maturity-onset diabetes of the young</i>
MOPS	àcid 3-[<i>N</i> -morfolino] propansulfònic
NRs	receptors nuclears
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranòsid
PBS	tampó fosfat salí
PC4	<i>positive cofactor 4</i>
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PEPCK	fosfoenol piruvat carboxiquinasa
PFK	6-fosfofructo-1-quinasa
PFKFB	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa
PGC-1	<i>PPARα coactivator factor-1</i>
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PK	piruvat quinasa
PKA	proteïna quinasa depenent d'AMPc
PL	vitamina B ₆
PLP	piridoxal-5-fosfat
PMP	fosfat de piridoxamina
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorur
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRMT1	<i>protein arginine N-methyltransferase</i>
qRT-PCR	PCR a temps real
RACE	amplificació ràpida d'extremes de cDNA
RCC	carcinoma de cèl·lules renals
RT	transcriptasa inversa o retrotranscriptasa
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SBL	<i>sea bass larvae</i>
SD	standard deviation
SDS	dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida i SDS
SHP	<i>small heterodimer partner</i>
SMRT	<i>silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>
Sp1	<i>specific protein 1</i>
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SSC	solució salí-citrat sòdic
Stat	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STZ	estreptozotocina
TAE	Tris-acetat-EDTA
TAFs	<i>TBP associated factors</i>
TBE	Tris-borat-EDTA
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TCA	àcid tricloroacètic
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametiletildiamina

TFIIB	<i>transcription factor II B</i>
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TR β	<i>thyroid hormone receptor beta</i>
TRPC1	<i>transient receptor potential channel 1</i>
UDP-	glucuroniltransferasa
UOC	cicle de l'ornitina urea
V_{\max}	velocitat màxima de reacció
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

ÍNDEX

1. OBJECTIUS	3
2. INTRODUCCIÓ	7
2.1 Metabolisme de carbohidrats en peixos	7
2.1.1 Els peixos carnívors com a models d'intolerància a la glucosa	7
2.1.2 Regulació nutricional de la glicòlisi i gluconeogènesi en peixos	11
2.2 Metabolisme de proteïnes en peixos	15
2.2.1 Funcions dels aminoàcids	15
2.2.2 Catabolisme dels aminoàcids. Origen de l'amoni excretat	17
2.2.3 Gluconeogènesi a partir d'aminoàcids	19
2.2.4 Producció d'amoni: compartimentació	20
2.2.5 Detoxificació d'amoni mitjançant glutamina	21
2.2.6 Transaminases: l'alanina aminotransferasa	22
2.2.6.1 Isoformes de l'ALT	26
2.2.6.2 Característiques cinètiques de l'ALT	28
2.2.6.3 Estructura i inhibidors de l'ALT	32
2.2.6.4 Regulació de l'expressió de l'ALT	34
2.2.6.5 Implicacions clíniques de l'ALT	36
2.2.6.6 Regulació transcripcional de l'expressió gènica	37
2.2.6.7 Control transcripcional de l'ALT	38
2.3 Factor Nuclear Hepatocitari 4	39
2.3.1 Estructura	39
2.3.2 HNF4 α com a factor de transcripció	42
2.3.3 Regulació de l'expressió d'HNF4 α	44
2.3.4 Funció	45

2.3.5	Funció d'HNF4 α en fetge, ronyó i pàncrees	46
2.3.6	Altres consideracions	48
2.3.7	Malalties associades	50
2.3.8	HNF4 α en peixos	51

3. MATERIALS I MÈTODES **55**

3.1	Animals utilitzats en l'experimentació	55
3.1.1	Manipulació dels animals i presa de mostres	55
3.1.2	Efecte de l'estat nutricional. Distribució tissular	56
3.1.3	Efecte de l'alimentació	57
3.1.4	Administració d'insulina i estreptozotocina	57
3.2	Oligonucleòtids	57
3.3	Plasmidis	59
<u>Tècniques generals de biologia molecular</u>		<u>61</u>
3.4	Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	61
3.5	Aïllament i purificació de fragments de DNA	62
3.6	Electroforesi de DNA	63
3.7	Digestió enzimàtica de DNA	63
3.8	Conversió d'extrems de DNA protuberants en roms	64
3.9	Lligació de fragments de DNA	64
3.10	Transformació de cèl·lules competents	65
3.10.1	Obtenció de cèl·lules <i>E. coli</i> competents	65
3.10.2	Transformació per xoc tèrmic	66
3.11	Obtenció de DNA plasmídic	66
3.12	Seqüenciació del DNA	67
3.13	Anàlisi informàtica i introducció de seqüències en bases de dades	67
3.14	Cribatge per PCR	67

3.15	Tècnica del passeig genòmic	68
3.15.1	Construcció de les llibreries GenomeWalker	68
3.15.2	Purificació del DNA	68
3.15.3	Lligació de DNA genòmic als adaptadors GenomeWalker	69
3.15.4	PCR	69
3.16	Tècnica d'RT-PCR semiquantitativa	70
3.17	Amplificació d'extremes de cDNA per RACE: <i>SMART RACE cDNA amplification</i>	70
3.17.1	Disseny d'oligonucleòtids	71
3.17.2	Síntesi de la primera cadena de cDNA per al RACE 5' i 3'	72
3.17.3	Amplificació primària per al RACE 5' i 3'	72
3.17.4	Amplificació secundària	73
3.18	<i>Northern blot</i>	73
3.18.1	Aïllament d'RNA	73
3.18.2	Electroforesi d'RNA	73
3.18.3	Transferència i fixació de l'RNA a membranes de niló	74
3.18.4	Síntesi de la sonda	75
3.18.5	Dot blot	75
3.18.6	Prehibridació, hibridació i rentats dels filtres amb l'RNA fixat	76
3.18.7	Immunodetecció, exposició i revelat	76
3.19	RT-PCR a temps real (qRT-PCR)	77
3.20	<i>Western blot</i>	79
3.20.1	Electroforesi de proteïnes	79
3.20.2	Transferència de proteïnes a membrana	81
3.20.3	Bloqueig de la membrana	81
3.20.4	Immunodetecció	82
3.21	Obtenció d'extractes citosòlic i mitocondrial	83
3.22	Quantificació de proteïnes: mètode de <i>Bradford</i>	83

3.23	Assaig de retardació en gel (unió DNA-proteïna)	83
3.23.1	Obtenció d'extractes nuclears	84
3.23.2	Preparació d'oligonucleòtids marcats	84
3.23.3	Reacció d'interacció proteïna-DNA marcat i electroforesi	85
3.23.4	Transferència i fixació a la membrana	86
3.23.5	Immunodetecció	86
<u>Cultiu de llevats. Obtenció de proteïnes</u>		<u>87</u>
3.24	Transformació de llevats	87
3.25	Preparació d'extractes proteics de llevat	88
3.25.1	Obtenció dels extractes citosòlics	88
3.25.2	Obtenció dels extractes mitocondrials	89
<u>Cinètica enzimàtica</u>		<u>90</u>
3.26	Determinació de l'activitat ALT (reacció directa)	90
3.27	Determinació de l'activitat ALT (reacció inversa)	90
3.28	Anàlisi estadístic dels resultats	92
<u>Cultius de línies cel·lulars eucariotes i transfeccions</u>		<u>93</u>
3.29	Arrencada, manteniment i congelació del cultiu cel·lular	93
3.29.1	Arrencada del cultiu cel·lular	93
3.29.2	Manteniment dels cultius cel·lulars: tripsinització	94
3.29.3	Congelació de cèl·lules	94
3.30	Transfecció transitòria de cèl·lules	94
3.30.1	Transfecció mitjançant el mètode del fosfat càlcic	94
3.31	Anàlisi de l'activitat transcripcional	95
3.31.1	Recol·lecció de cèl·lules	95
3.31.2	Assaig de l'activitat β -galactosidasa	96
3.31.3	Assaig de l'activitat luciferasa	96
3.31.4	Anàlisi dels resultats	96

4. RESULTATS	99
4.1 Clonació de fragments de cDNA corresponents als enzims GlnS, AST2 i GDH d'orada	99
4.2 Distribució tissular d'mALT, GlnS, AST2 i GDH en orada	100
4.3 Regulació hormonal i nutricional de l'expressió d'mALT, GlnS, AST2 i GDH	102
4.3.1 Efecte de l'estat nutricional	102
4.3.2 Efecte de l'estreptozotocina i la insulina sobre l'expressió d'mALT, GlnS, AST2 i GDH	105
4.3.3 Seguiment de l'efecte de l'alimentació sobre l'expressió d'mALT durant 24 hores	108
4.4 Caracterització cinètica de l'mALT de fetge d' <i>Sparus aurata</i>	109
4.5 Clonació del promotor de l'mALT d'orada	117
4.5.1 Caracterització del promotor de l'mALT d'orada	119
4.6 Paper d'HNF4 α en la regulació de l'activitat transcripcional de l'mALT	121
4.6.1 Activació del promotor d'mALT per HNF4 α	121
4.6.2 HNF4 α s'uneix a la caixa HRE -63/-39	123
4.6.3 La mutació de la caixa HRE elimina la transactivació produïda per HNF4 α	124
4.7 Clonació i regulació de l'expressió d'HNF4 α	125
4.7.1 Clonació d'HNF4 α d'orada	125
4.7.2 Expressió d'HNF4 α en teixits d'orada	128
4.7.3 Regulació hormonal i nutricional de l'expressió d'HNF4 α	129
5. DISCUSSIÓ	133
5.1 Metabolisme d'aminoàcids en diferents condicions nutricionals i hormonals	134
5.2 Caracterització del promotor de l'mALT	144
6. CONCLUSIONS	153
7. REFERÈNCIES	157

Seqüències parcials de cDNA dels enzims GlnS, AST2 i GDH d'orada

185

Publicacions:

- A. Salgado, M. C., Metón, I., Anemaet, I., González, J. D. & Baanante, I. V. (2011). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α transactivates the mitochondrial alanine aminotransferase gene in the kidney of *Sparus aurata*. *Marine Biotech*, DOI 10.1007.
- B. Anemaet, I. G., González, J. D., Salgado, M. C., Giralt, M., Fernández, F., Baanante, I. V. & Metón, I. (2010). Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol*, 45, 119-132.
- C. Anemaet, I. G., Metón, I., Salgado, M. C., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2008). A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2833-2844.
- D. Salgado, M. C., Metón, I., Egea, M. & Baanante, I. V. (2004). Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish *Sparus aurata*. *J Mol Endocrinol*, 33, 783-795.
- E. Salgado, M. C., Metón, I. & Baanante, I. V. ALT2 gene is regulated by Activating Transcription Factor 4 (en preparació)

1. OBJECTIUS

1. OBJECTIUS

Els peixos carnívors estan adaptats a la ingesta de dietes amb un elevat contingut en proteïnes. En aquests organismes, el principal destí dels aminoàcids després de per a la síntesi de proteïna és per a la producció d'energia, essent una font d'energia més important que els carbohidrats (Cowey i Walton, 1989). De fet, els peixos carnívors presenten baixa capacitat per utilitzar els carbohidrats i mostren hiperglucèmia perllongada després de l'administració de glucosa o l'alimentació amb una dieta rica en carbohidrats. Les característiques metabòliques dels peixos carnívors en resposta als tractaments esmentats mimetitzen a les dels diabètics tipus 2 en humans. El contingut en proteïna de la dieta és el principal factor que afecta la producció d'amoni en peixos (Beamish i Thomas, 1984; Carvalho i col·l, 2009). La via més important en la producció d'amoni és el sistema de transdesaminació, on diverses aminotransferases transfereixen el grup amino dels L-aminoàcids a l' α -cetoglutarat per formar glutamat, que és posteriorment desaminat per la glutamat deshidrogenasa (GDH) amb la conseqüent producció d'amoni. L'amoni és eliminat per les brànquies al medi o convertit a glutamina per la glutamina sintetasa (GlnS).

En aquesta tesi, ens vam proposar estudiar la distribució tissular i la regulació de l'expressió de l'alanina aminotransferasa mitocondrial (mALT) sota diferents condicions hormonals i nutricionals, determinar les característiques cinètiques de l'enzim, així com la caracterització del promotor que regula el gen mALT. Addicionalment, es va estudiar l'expressió tissular i la regulació a nivell d'RNAm dels enzims GDH, GlnS i aspartat aminotransferasa mitocondrial (AST2), relacionats amb el metabolisme aminoacídic.

L'alanina aminotransferasa (ALT) catalitza la transaminació reversible entre l'L-alanina i l' α -cetoglutarat per formar L-glutamat i piruvat. Mitjançant la interconversió d'aquests quatre metabòlits, l'ALT esdevé un nexa d'unió entre el metabolisme d'aminoàcids, el de carbohidrats i l'energètic.

Prèviament, s'havia reportat que l'activitat ALT en fetge és considerada un bon indicador de l'estat nutricional i de la utilització de proteïna en peixos (Fynn-Aikins i col·l, 1995; Sánchez-Muros i col·l, 1998; Metón i col·l, 1999a, Fernández i col·l, 2007). Més recentment, el nostre grup va clonar tres isoenzims ALT a partir de fetge d'*S. aurata*, indicant l'existència de dues isoformes citosòliques,

cALT1 i cALT2, i una isoforma mitocondrial mALT, el primer enzim mitocondrial reportat en el regne animal (Metón i col·l, 2004b; Anemaet i col·l, 2008).

Malgrat la utilització rutinària de l'activitat ALT en clínica com a marcador de patologies hepàtiques, actualment hi ha pocs estudis sobre la regulació transcripcional i control de l'expressió de l'ALT. El coneixement de la regulació de l'expressió d'aquest enzim en peixos pot ser beneficiós des d'un punt de vista biotecnològic i biomèdic. En piscicultura, la identificació de mecanismes que controlen la regulació de la transcripció de les isoformes ALT i la determinació de la funció d'mALT, pot ajudar a dissenyar estratègies biotecnològiques per efectuar una substitució parcial de les proteïnes de la dieta destinada a la producció d'energia per carbohidrats. Aquesta intervenció podria contribuir, per una part, a reduir el cost de la producció de peixos en cultiu, i per l'altra, a la disminució de l'eutrofització de les aigües causada per l'increment en l'excreció de compostos nitrogenats procedents de la utilització dels aminoàcids com a font d'energia.

Per altra banda, ALT és un marcador d'una gran diversitat de malalties humanes, entre elles les hepàtiques. A més, recentment s'ha indicat la seva relació amb la diabetis tipus 2, i considerant que els peixos carnívors mostren intolerància a la glucosa, els estudis del control transcripcional i els mecanismes de regulació de l'expressió d'ALT podria obrir noves perspectives al desenvolupament de fàrmacs i tecnologia biomèdica per a un diagnòstic més específic en malalties associades amb l'increment de l'activitat ALT.

Per determinar els mecanismes de regulació i la implicació en el metabolisme intermediari de la isoforma mitocondrial mALT, així com la regulació de l'expressió d'altres enzims que intervenen en el metabolisme d'aminoàcids (GDH, AST2 i GlnS) en un peix d'elevat interès comercial com és l'orada (*Sparus aurata*), els objectius d'aquest estudi foren:

- A) Estudiar la distribució tissular i la regulació nutricional i hormonal de l'expressió d'mALT, GDH, AST2 i GlnS.
- B) L'anàlisi dels paràmetres cinètics per a mALT.
- C) Clonar i caracteritzar el promotor del gen mALT d'*S. aurata*.

2. INTRODUCCIÓ

2. INTRODUCCIÓ

2.1 METABOLISME DE CARBOHIDRATS EN PEIXOS

2.1.1 ELS PEIXOS CARNÍVORS COM A MODELS D'INTOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

Els peixos carnívors presenten baixa capacitat per metabolitzar carbohidrats i mantenir la glucèmia (Christiansen i Klungsoyr, 1987, Cowey i Walton, 1989, Wilson, 1994; Stone, 2003; Enes i col·l, 2009). L'elevat percentatge de proteïnes i la baixa quantitat de carbohidrats presents a la seva dieta natural fa que els aminoàcids resultin importants substrats gluconeogènics per a la síntesi *de novo* de glucosa i glicogen. En aquests organismes, la baixa capacitat per metabolitzar carbohidrats condueix a estats d'hiperglucèmia més marcats i sostinguts que els descrits per a mamífers, després de l'administració de glucosa o la ingesta de dietes amb elevat contingut de carbohidrats (Palmer i Ryman, 1972; Baños i col·l, 1998; Péres i col·l, 1999; Legate i col·l, 2001; Moon, 2001; Novoa i col·l, 2004; Couto i col·l, 2008; Enes i col·l, 2011). Aquest perfil metabòlic mimetitzava els símptomes postprandials que caracteritzen la diabetis tipus 2 en humans (Cowey i Walton, 1989; Wright i col·l 1998; Moon, 2001). Els peixos omnívors, com ara la carpa (*Cyprinus carpio*), presenten major capacitat per metabolitzar glucosa que els peixos carnívors, encara que aquesta és menor que en mamífers (Furuichi i Yone, 1981).

Encara que els peixos presenten un ús limitat dels carbohidrats de la dieta i intolerància a la glucosa, diversos estudis han indicat que els carbohidrats poden utilitzar-se per reemplaçar parcialment les proteïnes en la dieta. Els nivells òptims en carbohidrats de la dieta depèn de l'espècie de peix, tipus de carbohidrat i tractament previ, així com del contingut en proteïnes i lípids. Per tant, per a cada espècie de peix, el tipus i nivell òptim de carbohidrats ha de determinar-se prèviament de manera experimental (Furuichi i Yone, 1980; Wilson, 1994; Shiao, 1997; Hemre i col·l, 2001). El midó tractat (gelatinitzat, dextrinitzat, extrusionat) és un component de la dieta adient per a l'orada (*Sparus aurata*) (Georgopoulos i Conides, 1999; Venou i col·l, 2003; Fernández i col·l, 1996, 1998, 2007; Enes i col·l, 2010) i altres espècies de peixos (Bergot, 1979; Bergot i Breque, 1983; Jeoung i col·l, 1991; Takeuchi i col·l, 1994; Wilson, 1994; Péres i Olivia-Teles, 2002; Kumar i col·l, 2010).

El reemplaçament parcial de proteïna per carbohidrats en les dietes és relativament ben tolerat en orada, on s'ha observat que l'activitat d'enzims clau involucrats en la glicòlisi-gluconeogènesi, ruta

de les pentoses fosfat i metabolisme d'aminoàcids es modula en funció de la ració i del contingut de carbohidrats de la dieta (Metón i col·l, 1999b; Fernández i col·l, 2007).

Són vàries les hipòtesis formulades per explicar la baixa utilització dels carbohidrats en peixos. Una d'elles va ser atribuïda a la possible presència de baixos nivells d'insulina endògena. No obstant, els nivells d'insulina en peixos són similars o superiors als observats en mamífers (Mommsen i Plisetskaja, 1991; Plisetskaya, 1998). Una altra hipòtesi seria la inadequada secreció d'insulina activada per la presència de nivells elevats de glucèmia. La glucosa estimula la secreció d'insulina en peixos, però és un estimulador dèbil (Mommsen i Plisetskaya, 1991; Mazur i col·l, 1992; Milgram i col·l, 1994; Andoh i Nagasawa, 1997; Enes i col·l, 2011). El nivell d'insulina alliberada després de l'administració de glucosa en llenguado barfin (*Verasper mosei*) i anguila europea (*Anguilla anguilla*) és molt inferior que en mamífers, arribant com a màxim a dues vegades el nivell basal, mentre que en humans és més de vuit vegades superior (Lerner i Porte, 1971; Ince i Thorpe, 1977). Aquest estudi va confirmar que en peixos, sota condicions fisiològiques, la glucosa no pot estimular suficientment la secreció d'insulina per disminuir els nivells de glucèmia i que la insulina resulta ser un regulador feble de la glucèmia en aquests organismes. No obstant, en peixos els aminoàcids són insulínotrops més importants que la glucosa (Plisetskaya i col·l, 1991; Andoh i Nagasawa, 1998; Navarro i col·l, 2002; Andoh, 2007). L'activitat insulínotròpica és específica dels L-aminoàcids i els efectes insulínotròpics dels diferents aminoàcids difereixen entre espècies. A més, s'ha demostrat en diferents espècies de peixos que la insulina està implicada en la regulació dels nivells d'aminoàcids en sang. La concentració dels aminoàcids lliures en plasma disminueix significativament després de l'administració intramuscular d'insulina (Ince i Thorpe, 1974, 1978; Inui i col·l, 1975; Murai i Ogata, 1990; Andoh, 2007).

Els peixos presenten receptors d'insulina i receptors del factor de creixement *insulin growth factor* (IGF)-I semblants als que en humans es comporten com a mediadors de les accions de la insulina i IGF-I (Gutiérrez i Plisetskaya, 1991; Gutiérrez i col·l, 1993; Drakenberg i col·l, 1993). Les propietats d'unió d'aquests receptors al lligand en diferents teixits i espècies de peixos, mostren algunes diferències amb les dels mamífers, malgrat les similituds estructurals que presenten (Párrizas i col·l, 1995). Méndez i col·l (2001) detectaren la presència de receptors IGF-II/mannosa 6-fosfat en embrions de peixos, similars en la seva estructura i especificitat pel lligand als trobats en mamífers. No obstant, el nombre de receptors d'insulina en el múscul de peixos és relativament baix en comparació amb la rata (Gutiérrez i Plisetskaya, 1991; Párrizas i col·l, 1994).

El transport de glucosa a través de la membrana plasmàtica cel·lular és un altre aspecte important en la regulació de la glucèmia (Burant i col·l, 1991; Thorens B., 1993). L'absència de transportadors de glucosa funcionals (GLUTs) va ser considerada com a una altra possible causa de la intolerància a la glucosa en peixos. No obstant, la captació de glucosa realitzada per transportadors homòlegs als GLUT1, GLUT2, GLUT3 i GLUT4 de mamífers ha estat reportada en peixos (Teerijoki i col·l, 2000, 2001; Krasnov i col·l, 2001; Capilla i col·l, 2002; Zhang i col·l, 2003; Hall i col·l, 2004, 2005, 2006; Díaz i col·l, 2007). La funcionalitat del GLUT2 ha estat verificada en peixos mitjançant estudis de microinjecció en ous de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) amb un vector d'expressió que conté el cDNA de GLUT2. Els embrions resultants exhibien un increment en el transport de glucosa (Krasnov i col·l, 2001). La caracterització de la funcionalitat de GLUT4 de salmó coho (*Oncorhynchus kisutch*), s'ha demostrat per expressió en oòcits de *Xenopus laevis* i adipòcits de truita. La insulina estimula la captació de glucosa i la translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica (Capilla i col·l, 2004). No obstant, els transportadors de glucosa de peixos GLUT2 i GLUT4 es caracteritzen per presentar menor afinitat per la glucosa (Krasnov i col·l, 2001; Capilla i col·l, 2004) i s'ha descrit un baix nombre de receptors de tipus GLUT4 en múscul de peixos (Wright i col·l, 1998).

Adicionalment, un altre punt important en la regulació de la glucèmia són els enzims que controlen el cicle de substrat glucosa/glucosa-6-fosfat. En mamífers, la glucoquinasa (GK, EC2.7.1.2) actua com a sensor de glucosa i es requereix pel manteniment d'uns nivells de glucèmia normals, mutacions en aquest gen donen lloc a l'aparició de MODY2 (Maturity Onset Diabetes of the Young 2) que es caracteritza per un increment en els nivells de glicèmia (Gat-Yablonski i col·l, 2006). La sobreexpressió de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa, EC3.1.3.9), porta a una excessiva producció hepàtica de glucosa, i com a conseqüència a intolerància a la glucosa i hiperglucèmia (O'Brien i Granner, 1996; Seoane i col·l, 1997; Trinh i col·l, 1998). La relativa incapacitat que presenten els peixos carnívors per metabolitzar els carbohidrats ha estat durant molt de temps atribuïda en part a la manca d'una activitat GK induïble al fetge (Nagayama i Ohshima, 1974; Cowey i col·l, 1977; Cowey i Walton, 1989; Steffens, 1989; Wilson, 1994). Les anàlisis bioquímiques realitzades per Tranulis i col·l (1996, 1997), però, indicaren la presència d'activitat GK-like en fetge de salmó atlàntic (*Salmo salar*) i en els cossos de Brockmann de l'halibut atlàntic (*Hippoglossus hippoglossus*). El nostre grup va aïllar el cDNA de la GK a partir de fetge d'*S. aurata* i va estudiar la modulació de l'expressió d'aquest gen en funció de l'estat nutricional (Caseras i col·l, 2000, 2002). Paral·lelament, durant aquest període, es van reportar seqüències de GK d'altres espècies de peixos (Panserat i col·l, 2000a). La GK de fetge de peixos és funcional, com es va demostrar en expressar la GK d'*S. aurata* en cèl·lules COS-7, però exhibeix menor afinitat per la glucosa que la GK de rates alimentades, encara que similar a la descrita

per a les rates en dejú o diabètiques (Caseras i col·l, 2000). Per tant, una menor activitat GK en fetge de peixos podria contribuir a les característiques diabètiques descrites per a peixos carnívors.

La manca de regulació de l'expressió de la G6Pasa en fetge de peixos també fou proposada com a un altre factor que expliqués la prolongada hiperglicèmia que presenten aquests animals després de la ingesta de carbohidrats (Panserat i col·l, 2000b). La subunitat catalítica de la G6Pasa d'orada va ser clonada i caracteritzada (Metón i col·l, 2004a) i es va clonar la primera regió promotora d'una G6Pasa de peix i animals no mamífers (Salgado i col·l, 2004). Atès que en absència de glucosa la insulina pràcticament no va afectar l'activitat promotora del gen que codifica per a la G6Pasa en fetge d'orada, el nostre grup va proposar que la baixa capacitat de la insulina per reprimir la G6Pasa de peix podria contribuir a la resistència a la insulina en peixos carnívors (Salgado i col·l, 2004).

Caseras i col·l (2002) van demostrar que en orada existeix una regulació concertada en l'expressió d'enzims que controlen el cicle de substrat glucosa/glucosa-6-fosfat. L'expressió hepàtica de la GK a nivell d'activitat enzimàtica i RNAm en fetge d'orades en situació de dejú o sotmeses a restricció de dieta disminueix dràsticament, mentre que l'expressió de la G6Pasa es troba incrementada. Per altra banda, en els estudis de variacions diürnes, no es va observar inducció de la GK hepàtica fins les 4h després de la ingesta d'aliments i l'activitat màxima s'assoleix a les 4-8h després de la ingesta. En contrast, els nivells més baixos de l'RNAm de la G6Pasa es van trobar entre les 4-15h postprandials. Comparat amb rata, aquests resultats suggereixen que la hiperglicèmia perllongada observada en peixos pot ser resultat d'un retràs en l'estimulació de l'expressió de la GK després de la ingesta de la dieta rica en carbohidrats (Caseras i col·l, 2000, 2002). L'efecte de l'alimentació amb diferents dietes sobre l'expressió de la GK i la G6Pasa, indiquen que el metabolisme intermediari dels peixos alimentats amb una dieta baixa en proteïnes i alta en carbohidrats és empès cap a la utilització dels carbohidrats de la dieta, fonamentalment per modulació dels nivells d'RNAm de la GK, més que no pas de l'expressió de la G6Pasa (Caseras i col·l, 2002; Metón i col·l, 2003a, Egea i col·l, 2007, 2008).

Els peixos passen llargs períodes de dejú relacionats amb les èpoques de migració o reproducció. A diferència de l'observat en mamífers, els nivells de glicogen hepàtic es mantenen elevats en peixos després de períodes llargs de dejú. Malgrat que la mobilització de glicogen varia entre les diferents espècies de peixos, la seva degradació no sembla ser un punt important en les etapes inicials que contribueixen al manteniment de la glucèmia, essent necessaris períodes més llargs que en mamífers per observar un descens significatiu dels nivells de glicogen hepàtic en aquests organismes (Nagai i

Ikeda, 1971; Larsson i Lewander, 1973; French i col·l, 1983; García de Frutos i col·l, 1990; Hemre i col·l, 1990). En orada, les reserves de glicogen hepàtic disminueixen significativament després de 8 dies de dejú i arriben a nivells mínims als 20 dies sense alimentació (Baanante i col·l, 1991; García de Frutos i col·l, 1991; Metón i col·l, 1999b). Resultats similars van ser trobats en truita irisada (Hickling i March, 1982) i truita comuna (*Salmo trutta fario*) (Navarro i col·l, 1992). No obstant, en anguila europea sotmesa a dejú, la concentració de glicogen no va disminuir fins a passats 96 dies i el glicogen del múscul va restar igual que els nivells inicials durant els primers 64 dies de dejú (Dave i col·l, 1975). La intolerància relativa a la glucosa (Cowey i Walton, 1989; Wilson, 1994; Stone, 2003; Enes i col·l, 2009) sembla estar relacionada doncs, amb la utilització preferent de lípids i proteïnes en lloc de glicogen com a font primerenca d'energia per part dels peixos en condicions de dejú.

2.1.2 REGULACIÓ NUTRICIONAL DE LA GLICÒLISI I GLUCONEOGÈNESI EN PEIXOS

L'homeòstasi de la glucosa és majoritàriament controlada pel fetge mitjançant dues vies metabòliques, glicòlisi i gluconeogènesi. Sota condicions aeròbiques, la glucosa és catabolitzada a través de la via glicolítica, el cicle de Krebs (TCA) i la cadena respiratòria per obtenir ATP, o mitjançant el cicle de les pentoses fosfat donant lloc a la producció de NADPH per a la biosíntesi de lípids i ribosa-5-fosfat, necessària per a la síntesi de nucleòtids. L'excés de glucosa pot ser emmagatzemat com a glicogen (glicogènesi) o bé convertit a lípids. Sota condicions de dejú, els requeriments de glucosa poden ser satisfets a partir de la degradació del glicogen a glucosa (glicogenolisi) o bé per la gluconeogènesi, camí metabòlic que permet generar glucosa a partir de precursors no glicosídics com piruvat, lactat, glicerol, intermediaris metabòlics del TCA o derivats del catabolisme d'aminoàcids. Enzims reguladors específics controlen el flux net cap a la glicòlisi o la gluconeogènesi mitjançant tres cicles de substrat, depenent dels requeriments cel·lulars (figura 1) (Pilkis i Granner, 1992; Metón i col·l, 2003a,b, 2006).

En peixos, el manteniment de la homeòstasi energètica durant el **dejú** està directament relacionat amb la capacitat del fetge per mobilitzar reserves energètiques com ara lípids i glicogen, si més no durant els estadis inicials del dejú, i depèn de la subseqüent activació de la gluconeogènesi hepàtica i de la reducció de la taxa d'utilització de la glucosa. Així, durant el dejú es produeix:

Increment de la glicogenolisi. La glicogen fosforilasa (GPasa, EC2.4.1.1), en la seva forma activa (GPasa-a) incrementa en salmó atlàntic en dejú, donant lloc a la degradació de glicogen hepàtic (Sundby i col·l, 1991; Soengas i col·l, 1996). Peixos com ara el llobarro (*Dicentrarchus labrax*), orada, truita irisada i truita comuna (*Salmo trutta fario*) mobilitzen el glicogen durant la fase inicial del dejú, mostrant una depleció significativa en el contingut de glicogen hepàtic (García de Frutos, 1990, Navarro i Gutiérrez, 1995; Soengas i col·l, 1996, 2006; Metón i col·l, 2003a; Kirchner i col·l, 2005; Polakof i col·l, 2006, 2007, Pérez-Jiménez i col·l, 2007).

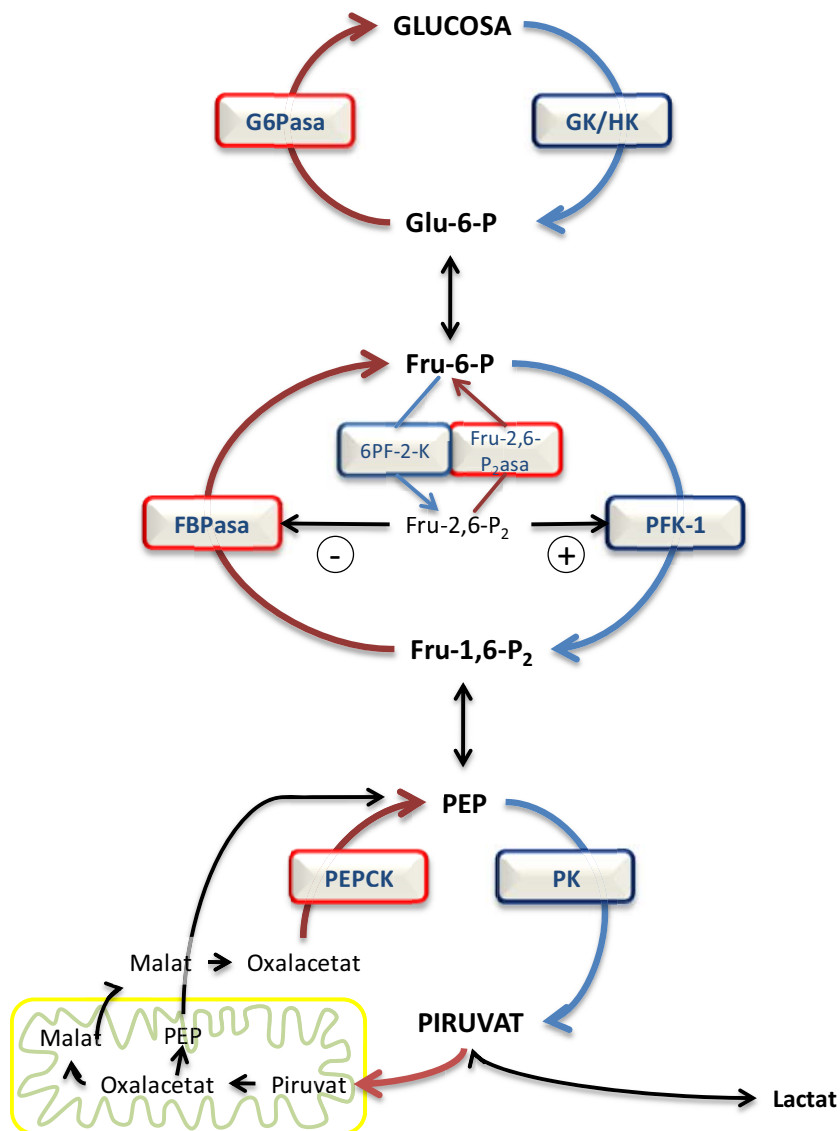


Figura 1. Cicles de substrat en la glicòlisi/gluconeogènesi.

Els enzims implicats en els cicles de substrat de la via glicolítica són la hexoquinasa/glucoquinasa (HK, EC2.7.1.1/GK), 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1, EC2.7.1.11), i piruvat quinasa (PK, EC2.7.1.40), mentre que els enzims implicats en els cicles de substrat de la via gluconeogènica són fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK, EC4.1.1.32/38/49), fructosa-1-6-bifosfatasa (FBPasa, EC3.1.3.11) i glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). L'enzim bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa (PFKFB, EC3.1.3.46) que controla els nivells de fructosa 2,6 bifosfat també està representat.

Increment de la gluconeogènesi. En truita irisada, l'activitat PEPCCK, incrementa significativament en resposta a dejú (Kirchner i col·l, 2003, 2008). En fetge d'orada, el dejú provoca una disminució en l'expressió de l'enzim bifuncional hepàtic PFKFB1 i un fort decrement en els nivells de fructosa-2,6-P₂ (García de Frutos i col·l, 1990; Metón i col·l, 1999b). Els baixos nivells de fructosa-2,6-P₂ donen lloc a una activitat PFK1 disminuïda i a un increment en l'activitat FBPasa, incrementant, per tant, el flux gluconeogènic (García de Frutos i col·l, 1990; Metón i col·l, 1999b). En fetge d'orada i truita irisada, l'activitat FBPasa incrementa significativament, mantenint-se elevada després de la realimentació a curt termini (2 dies) i restaurant els seus valors inicials, en orades, després de 21 dies de realimentació (Metón i col·l, 2003a; Kirchner i col·l, 2003, 2008). Aquesta elevada activitat FBPasa present durant els primers dies després de la realimentació podria estar relacionada amb una via indirecta per restaurar el glicogen hepàtic a partir de compostos amb 3 àtoms de carboni via gluconeogènesi, com ha estat observat en rates (Pilkis i Granner, 1992). El dejú també incrementa l'activitat i l'expressió gènica de la G6Pasa en orada i truita irisada (Morata i col·l, 1982; Caseras i col·l, 2002; Kirchner i col·l, 2003; Metón i col·l, 2004a; Polakof i col·l, 2007). En orada, 1 dia de realimentació després del dejú, va ser suficient per disminuir els nivells de G6Pasa fins als nivells observats en orades normalment alimentades (Metón i col·l, 2004a).

Disminució de la capacitat d'emprar glucosa exògena. El dejú promou un fort decrement en l'RNAm i l'activitat de la GK en fetge d'orada i truita irisada (Caseras i col·l, 2000; Kirchner i col·l, 2003, 2005; Metón i col·l, 2004a; Soengas i col·l, 2006). Per altra banda, en llobarro, el dejú a curt termini (9 dies) no va tenir efecte en l'activitat GK hepàtica (Pérez-Jiménez i col·l, 2007). Les activitats hepàtiques PFK-1 (Fideu i col·l, 1983; Bonamusa i col·l, 1992; Metón i col·l, 1999b, 2003a) i PK en truita irisada i orada disminueixen significativament en peixos sotmesos a dejú (Fideu i col·l, 1983; Bonamusa i col·l, 1992; Metón i col·l, 1999b, 2003a; Kirchner i col·l, 2003). En orada, la realimentació a curt termini, després de 18 dies de dejú, no fou suficient per produir canvis significatius en l'activitat PK hepàtica (a diferència de l'activitat quinasa de la PFKFB1, que es recupera ràpidament, provocant una recuperació en els nivells de fructosa-2,6-P₂). Aquests resultats suggereixen que l'efecte inicial dels nutrients de la dieta després d'un període de dejú perllongat és el de restaurar els nivells de glicogen, que foren restablerts entre les 8h i els 2 dies de realimentació, més que ésser metabolitzats per a la glicòlisi.

La **restricció calòrica**, provoca una disminució en l'activitat dels enzims implicats en la glicòlisi i en la via de pentoses fosfat, de manera similar com succeeix en orades sotmeses a dejú (Metón i col·l, 1999a, 1999b; Caseras i col·l, 2000).

Estudis sobre l'efecte de la composició de la dieta indiquen que quan els peixos són alimentats amb **dietes amb alt contingut en carbohidrats** es produeixen una sèrie de canvis metabòlics encaminats a aprofitar aquest increment en la disponibilitat de carbohidrats:

Increment de la capacitat per emprar glucosa exògena. En espècies com ara l'orada, la truita irisada, i la carpa comuna (*Cyprinus carpio*), després de la ingesta d'una dieta alta en carbohidrats, es produeix un fort increment dels nivells d'RNAm i activitat GK hepàtica (Panserat i col·l, 2000b, 2001a; Caseras i col·l, 2002; Capilla i col·l, 2003; Metón i col·l, 2004a). De fet, els nivells de GK són pràcticament indetectables en peixos alimentats amb dietes amb baix contingut en carbohidrats (Caseras i col·l, 2002; Metón i col·l, 2004a). Així mateix, s'observa també un increment en l'expressió de PFKFB1 i PK en fetge de truita irisada i orada (García de Frutos i col·l, 1990, Metón i col·l, 1999b, 2000; Panserat i col·l, 2001c). L'alimentació d'orades amb una dieta alta en carbohidrats va provocar un increment en l'activitat quinasa de la PFKFB1 i en els nivells de fructosa-2,6-P₂, que al seu torn va promoure la glicòlisi (García de Frutos i col·l, 1990). En anguila europea, l'activitat PK també s'incrementa després de l'administració de dietes riques en carbohidrats (Suárez i col·l, 1995). L'activitat hepàtica PFK-1 incrementà en truita irisada i orades alimentades amb dietes amb alt contingut de carbohidrats (Fideu i col·l, 1983; Walton, 1986; Bonamusa i col·l, 1992; Metón i col·l, 1999b; Fernández i col·l, 2007).

Control dels nivells de gluconeogènesi. En rates, l'expressió de gens clau en la gluconeogènesi (PEPCK, FBPasa i G6Pasa) s'indueix en situacions de dejú i es reprimeixen quan s'alimenten les rates amb dietes amb un alt contingut en carbohidrats. En peixos, els enzims PEPCK, FBPasa i G6Pasa hepàtics (així com en ronyó i intestí en truita irisada) no responen als nivells de carbohidrats de la dieta i es mantenen elevats (Tranulis i col·l, 1991; Panserat i col·l, 2000c, 2001a,b,c; Caseras i col·l, 2002; Enes i col·l, 2006; Moreira i col·l, 2008, Kirchner i col·l, 2008). Alguns autors suggereixen que hi ha uns alts nivells persistents de producció de glucosa endògena en el fetge de peix degut a la manca de regulació de la gluconeogènesi pels carbohidrats aportats a la dieta (Tranulis i col·l, 1991; Panserat i col·l, 2000c, 2001a,b,c; Enes i col·l, 2006; Moreira i col·l, 2008, Kirchner i col·l, 2008). En orada, malgrat els nivells de G6Pasa no es regulen excessivament pels nivells de carbohidrats presents en la dieta, la seva expressió es modula en resposta al dejú i després de l'alimentació (Metón i col·l, 2004a).

2.2 METABOLISME DE PROTEÏNES EN PEIXOS

2.2.1 FUNCIONS DELS AMINOÀCIDS

La major part de les famílies de peixos són espècies carnívores i la seva dieta natural presenta un elevat contingut en proteïnes (aminoàcids). Els aminoàcids deriven de dos fonts principals: la dieta i el catabolisme de les proteïnes corporals que es troben en constant recanvi. En peixos, el catabolisme de proteïnes corporals proveeix menys del 50% dels aminoàcids utilitzats com a precursors per a síntesi de proteïnes, la qual cosa fa que els peixos siguin més dependents de les fonts de proteïna de la dieta que altres vertebrats. El requeriment primari dels aminoàcids és per a la síntesi de proteïna, i en menor mesura, per a la síntesi d'altres compostos com ara hormones, purines, neurotransmissors i cofactors. En peixos, el principal destí dels aminoàcids després dels requeriments per a la síntesi de proteïna és per a la producció d'energia. És més, els aminoàcids constitueixen una font d'energia més important que els carbohidrats (Cowey i Walton, 1989). De fet, els embrions i les larves de peix depenen gairebé exclusivament dels aminoàcids per a l'obtenció d'energia i el desenvolupament (Ronnestad i Fyhn, 1993; Ohkubo i Matsubara, 2002). En peixos en creixement, alimentats amb una dieta equilibrada, més del 50% del contingut en nitrogen de la dieta és utilitzat pel creixement i la majoria del romanent és utilitzat per produir energia (Atherton i Aitken, 1970; Beamish i Thomas, 1984). En termes energètics, la principal funció dels aminoàcids és proveir ATP per a processos biomecànics, sintètics i de transport. Els carbohidrats de la dieta no semblen ser un combustible aeròbic important però en canvi, existeix una elevada capacitat de gluconeogènesi a partir dels aminoàcids exògens (Bever i col·l, 1981). Els lípids, però, són certament importants, especialment en carnívors. Quan la dieta és deficient en lípids, una major proporció de la proteïna de la dieta és metabolitzada per a l'obtenció d'energia, essent els aminoàcids desaminats per a la conversió a lípids i carbohidrats. S'excreta més amoni i es reté una menor proporció de nitrogen provinent de la dieta per al creixement (Atherton i Aitken, 1970; Wood, 1993). El principal lloc de catabolisme dels aminoàcids és el fetge i el procés inclou l'eliminació del grup amino, que en els teleostis serà finalment excretat en forma d'amoni, i la formació d'un α -cetoàcid. Aquest α -cetoàcid serà majoritàriament oxidat a CO_2 i H_2O a través del TCA per a la producció d'energia; i en algunes circumstàncies serà convertit a glicogen o triglicèrids.

En peixos, els aminoàcids són insulínotropins més importants que la glucosa. Aquest efecte dels aminoàcids difereix en funció de l'espècie de peix estudiada. En llenguado barfin, l'arginina és el principal aminoàcid insulínotròpic, seguit de l'alanina, metionina i serina (Andoh, 2007). L'arginina és

també un potent agent insulinoatròpic en altres espècies de peixos, com ara anguila europea (Ince i Thorpe, 1977), peix gat americà (*Ictalurus punctatus*) (Ronner i Scarpa, 1987) i salmó coho (Plisetskaya i col·l., 1991), així com en pollastres (Honey i col·l., 1980), ratolí (Tan i col·l., 1985) i humans (Floyd i col·l., 1966). La leucina és un potent insulinoatròpic en el peix gripau (Patent i Foà, 1971), però no en llenguado barfin (Andoh, 2007). L'alanina presenta activitat insulinoatròpica al salmó coho (Plisetskaya i col·l., 1991). L'activitat insulinoatròpica és específica dels L-aminoàcids, indicant que els sensors relacionats amb la secreció d'insulina deuen reconèixer l'estructura terciària dels aminoàcids. En estudis realitzats en anguila europea (Ince i Thorpe, 1974; Inui i col·l., 1975), lluç de riu (*Esox lucius* L.) (Ince i Thorpe, 1978) i carpa comuna (Murai i Ogata, 1990) s'ha descrit que la concentració dels aminoàcids lliures en plasma disminueix significativament després de la injecció intramuscular d'insulina. Això implica que la insulina pot causar una disminució tant dels nivells d'aminoàcids com de glucosa en sang.

A més, els aminoàcids són reguladors clau del flux metabòlic i són considerats com a molècules de senyalització. En experiments duts a terme en hepatòcits primaris aïllats de truita irisada, Lansard i col·l. (2010), van comprovar que els aminoàcids, de manera dosi-depenent, incrementaren l'expressió dels enzims del metabolisme glucídic G6Pasa, mPEPCK i PK, així com la desaminasa serina deshidratasa (SD), i van disminuir els nivells d'asparagina sintetasa (AS), involucrada en el metabolisme proteic, mitjançant un mecanisme no depenent de TOR. Els aminoàcids, juntament amb la insulina, van promoure un patró d'expressió diferent, amb increments en els nivells d'RNAm dels enzims lipogènics FAS (sintasa d'àcids grassos), ACLY (ATP citrat liasa) i SREBP1 (proteïna d'unió a l'element de resposta a esterols), dels gens glicolítics GK, 6PF1K (6-fosfofructo-1-quinasa) i PK, i de la SD, demostrant alhora que l'habilitat de la insulina per estimular l'expressió de gens glicolítics resulta potenciada en presència d'aminoàcids. Aquests efectes dels aminoàcids en combinació amb la insulina eren mediat per l'activació de la via de senyalització de TOR. Les proteïnes diana de rapamicina (TOR) formen part d'una xarxa de senyalització de resposta a nutrients que controla el metabolisme cel·lular. Estan constituïdes per dos complexos proteics, el complex TOR 1 (TORC1) i el complex TOR 2 (TORC2), que difereixen en la seva funció i regulació, així com a la seva sensibilitat a la rapamicina. TORC1 és un sensor de nutrients regulat per insulina (i altres factors de creixement) i aminoàcids, i és un regulador clau de l'homeòstasi energètica, creixement cel·lular i traducció de proteïnes mitjançant la subseqüent activació de la proteïna quinasa S6 ribosomal p70 (S6K1) i la proteïna ribosomal S6 (Wullschleger i col·l., 2006). El mecanisme que porta a l'activació de TOR per insulina implica la participació de la proteïna quinasa B (Akt) i la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), donant lloc a la regulació del transport de glucosa, síntesi de glicogen, traducció d'RNAm i expressió

gènica (Taniguchi i col·l, 2006). En quant als gens gluconeogènics, només la G6Pasa, quan els hepatòcits foren incubats amb insulina i aminoàcids, fou inhibida d'una manera dependent de TOR. Posteriorment, en estudis *in vivo* duts a terme en truita irisada sotmesa a un dejú de 2 dies, s'ha comprovat que la realimentació amb dietes amb elevat contingut en proteïnes incrementen significativament la fosforilació d'Akt, S6K1, S6 i 4EBP1 (proteïnes involucrades en la via de senyalització Akt-TOR) en fetge i múscul, a diferència dels peixos alimentats amb dietes altes en carbohidrats. Així mateix, van reportar diferències en l'expressió de diversos enzims en funció de si les truites irisades prèviament sotmeses a dejú havien estat alimentades posteriorment amb dietes d'elevat contingut en proteïnes o carbohidrats (Seilliez i col·l, 2011).

2.2.2 CATABOLISME DELS AMINOÀCIDS. ORIGEN DE L'AMONI EXCRETAT

En els peixos, els aminoàcids en excés i que sobrepassen els requeriments per a la síntesi de proteïna no poden emmagatzemar-se directament (a diferència dels carbohidrats i lípids que ho poden fer com a glicogen o triglicèrids), són desaminats i oxidats al TCA o convertits a greixos i carbohidrats (Ballantyne, 2001; Stone i col·l, 2003).

Els peixos teleostis, com ara l'orada, són amoniotètics, essent l'amoni el principal producte final de la degradació dels aminoàcids. L'amoníac (NH_3) és molt tòxic, però a pH fisiològic el 99% es troba en una forma menys tòxica, ió amoni (NH_4^+). L'amoníac i l'amoni poden ser excretats directament a l'aigua de l'entorn, majoritàriament a través de les brànquies (Wilkie, 1997, 2002; Weihrauch i col·l, 2009), lloc principal d'excreció d'amoni en peixos, ja que posseeixen una gran àrea superficial (Evans i col·l, 2005). En animals terrestres, l'amoni és eliminat en forma d'urea en el cas d'animals ureotètics (així com també en alguns peixos com els elasmobranquis) o bé com a àcid úric en els uricotètics. Donat que la glutaminasa (Glnasa; EC3.5.1.2) i la glutamat deshidrogenasa (GDH; EC1.4.1.3) són enzims mitocondrials, l'amoni es produeix dins del mitocondri. En algunes espècies de peixos, particularment sota condicions mediambientals adverses, quan l'excreció d'amoni és deficient, es desencadena l'excreció d'urea (Wood i col·l, 1995; Saha i Ratha, 1998; Polez i col·l, 2003; Moraes i Polez, 2004). Anàlisis tissulars en carpa (*Cyprinus carpio*) mostraren que el fetge és el principal lloc de formació d'amoni (Pequin i Serfaty, 1963).

El contingut en proteïna de la dieta és el principal factor que influeix en la producció d'amoni en peixos (Beamish i Thomas, 1984; Carvalho i col·l, 2009). Els nivells d'amoni incrementen marcadament després d'un àpat (Brown i Cameron, 1991; Wicks i Randall, 2002a; Ip i col·l, 2004; Bucking i Wood, 2008; Carvalho i col·l, 2009). En peixos alimentats a sacietat, la producció d'amoni és

més de 10 vegades superior a la dels peixos en dejú; un cop l'aliment s'ha acabat, la producció disminueix ràpidament i s'aconsegueixen nivells estables en 5 a 10 dies (Guerin-Ancey, 1976; Kaushik i Teles, 1985). Aquests organismes exhibeixen una marcada capacitat per utilitzar les seves proteïnes estructurals durant un dejuni prolongat; la proporció utilitzada varia depenent dels nivells de lípids de reserva (van Waarde, 1983; Kaushik i Médale, 1994; Steffens, 1996; Caballero i col·l, 1999). Les reserves de glicogen tendeixen a dosificar-se durant el període de dejú, probablement pel seu valor com a combustible anaeròbic durant l'exercici explosiu o l'anòxia.

Les principals vies de desaminació dels aminoàcids són la transdesaminació, la desaminació directa dels aminoàcids i el cicle dels nucleòtids purina.

La via majoritària de desaminació es pensa que és el sistema de **transdesaminació**, proposat per Braunstein i Bychkov el 1939. Consisteix en què les aminotransferases transfereixen el grup amino dels L-aminoàcids a l' α -cetoglutarat (α -KG) per formar glutamat (Glu), que pot ser posteriorment desaminat per acció de la GDH (figura 2). Això té lloc principalment al fetge, on aquestes activitats enzimàtiques són més elevades, encara que també es troben en altres teixits com ara l'intestí, el ronyó i el múscul (Van den Thillart i Van Raaij, 1995; Anderson i col·l, 2002).

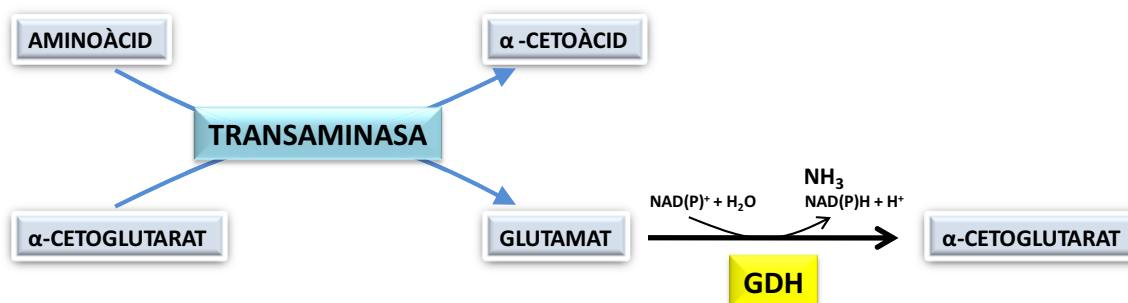


Figura 2. Procés de transdesaminació.

En el procés de transdesaminació, les transaminases transfereixen el grup amino dels L-aminoàcids a l' α -cetoglutarat per formar glutamat, que és posteriorment desaminat per acció de la glutamat deshidrogenasa (GDH; EC1.4.1.3).

La **desaminació directa** dels aminoàcids és una altra de les vies proposades. La desaminació és catalitzada per enzims com ara la histidasa, serina desaminasa, i GDH. A banda de la GDH, que juga un paper important mitjançant la seva contribució a la transdesaminació, les activitats i distribucions dels altres enzims són insuficients per a ésser considerats com a contribuents principals en la producció d'amoni (Van Waarde, 1983). La hidròlisi directa dels grups amino de la glutamina i l'asparagina són duts a terme per acció de la Glnasa (figura 3) i l'asparaginasa.

Una altra ruta de desaminació dels aminoàcids correspon al **cicle de nucleòtids purina**. La reacció s'inicia per una aminotransferasa que transfereix el grup amino de l'aminoàcid a l' α -cetoglutarat per formar glutamat. El glutamat serà utilitzat per l'AST amb l'obtenció d'aspartat. L'aspartat entra al cicle de nucleòtids purina per reacció amb l'inosina monofosfat (IMP) per formar adenilsuccinat. Aquest forma AMP amb l'alliberació de fumarat, que pot ser convertit a oxalacetat pel TCA. L'AMP desaminasa utilitza l'AMP com a substrat, per formar de nou l'IMP amb alliberació d'amoni. L'AMP desaminasa és considerada l'enzim clau de la via i es troba en nivells elevats al múscul esquelètic blanc (Kaletha i col·l, 1991; Raffin i col·l, 1993; Lushchak i Storey, 1994a,b; Lushchak i col·l, 1998, 2008). Es pensa que durant l'exercici o la hipòxia, l'amoni podria ser produït mitjançant la desaminació a AMP en el múscul esquelètic (Van Waarde, 1983; Mommsen i Hochachka, 1988).

El metabolisme del glutamat en peixos difereix del dels mamífers. En peixos el glutamat és principalment desaminat amb producció d'amoníac, mentre que en mamífers la major part del glutamat és transaminat a aspartat (Walton i Cowey, 1977; Campbell i Vorhaben, 1983). La taxa de desaminació del glutamat en mitocondris de fetge del peix gat americà (*I. punctatus*) pot ser responsable del total de l'amoníac excretat (Campbell i Vorhaben, 1983). El destí metabòlic del glutamat també varia en funció de l'espècie. El glutamat és oxidat principalment via GDH al fetge del carpí daurat (*Carassius auratus*) (Van Waarde i Kesbeke, 1982), truita irisada (Walton i Cowey, 1977), llobarro (Péres i Olivia-Teles, 2006) i bagre jundiá (*Rhamdia quelen*) (Melo i col·l, 2006). En els mitocondris de fetge del peix gat americà, el 40% del glutamat és transaminat a aspartat i la resta és desaminat (Campbell i Vorhaben, 1983).

2.2.3 GLUCONEOGÈNESI A PARTIR D'AMINOÀCIDS

El fetge juga un paper important en la regulació dels nivells d'aminoàcids en sang i la gluconeogènesi, amb els aminoàcids essent la principal font de carboni. En alimentar els peixos amb alts continguts en proteïna, el fetge és exposat a elevades concentracions d'aminoàcids i hormones a la sang de la vena porta hepàtica. Això estimula l'activitat dels enzims involucrats en el catabolisme d'aminoàcids en la dieta. Aproximadament el 40-60% del nitrogen de la dieta és excretat en 24 hores (Ip i col·l, 2004; Lim i col·l, 2004a). A banda de la dieta, les proteïnes musculars poden servir com a font d'aminoàcids, que són catabolitzats per a la producció d'ATP o carbohidrats en animals en situació de dejú (Houlihan i col·l, 1995). La gluconeogènesi es dona principalment durant la inanició o quan es proporcionen dietes pobres en carbohidrats. Entre els aminoàcids gluconeogènics, French i

col·l (1981) van trobar que la serina, i no l'alanina era el principal substrat gluconeogènic en peixos. No obstant, *in vivo*, es pensa que l'alanina és quantitativament l'aminoàcid més important. Durant el dejú perllongat o la migració reproductiva del salmó, l'alanina és l'únic aminoàcid que s'allibera del múscul significativament (Mommssen i col·l, 1980). Com en el cas dels mamífers, la gluconeogènesi a partir d'alanina és quantitativament el camí més important en peixos (Newsholme i Leech, 1983). Les taxes de síntesi de glucosa a partir d'aminoàcids en hepatòcits aïllats de truita segueix l'ordre: serina > asparagina > alanina > glicina > prolina > valina. Walton i Cowey (1979) van mostrar que *in vitro* la incorporació de precursors marcats en glucosa esdevé principalment a partir de lactat i en menor mesura a partir d'alanina i piruvat.

2.2.4 PRODUCCIÓ D'AMONI: COMPARTIMENTACIÓ.

La major part de l'amoni produït pels peixos és resultat de la metabolització del grup α -amino dels aminoàcids. La taxa de degradació d'alanina i glutamina pels hepatòcits del peix gat americà pot representar un 50 i 85% respectivament, del total de l'amoni excretat pels peixos (Campbell i col·l, 1983). En el carpí daurat, el fetge és responsable del 50-70% de la producció d'amoni (Van den Thillart i Van Raaij, 1995). L'amoni pot ser produït directament al citosol dels hepatòcits mitjançant l'acció de desaminases específiques (histidasa, asparaginasa, serina deshidratasa, treonina deshidratasa) o a través de l'acció combinada d'aminotransferases citosòliques i la GDH mitocondrial (Walton i Cowey, 1977; French i col·l, 1981), però la transdesaminació és el principal mecanisme pel catabolisme dels aminoàcids al fetge dels peixos (Ballantyne i col·l, 2001). Donat que la GDH es troba localitzada exclusivament a la matriu mitocondrial del fetge dels peixos, aquest és el compartiment on l'amoni és alliberat a través de la ruta de transdesaminació que inclou la desaminació del glutamat. La glutaminasa, que allibera NH_3 del grup amida de la glutamina és també present a la matriu mitocondrial d'algunes espècies de peixos. Per tant, l'amoniàc alliberat de la matriu mitocondrial en fetge ha de passar a través de les membranes mitocondrials abans d'ésser excretat. Per tal d'evitar la disrupció del gradient de protons de la membrana interna mitocondrial pel sistema de transport d'electrons, l'amoniàc (NH_3) produït a la matriu mitocondrial pot sortir fora del mitocondri com a ió amoni (NH_4^+) mitjançant un putatiu transportador d' NH_4^+ (AMT) o un intercanviador Na^+/H^+ en els hepatòcits de peixos amoniotèlics. Alternativament, l'amoniàc podria sortir fora a través d'un canal d'aquaporines com a NH_3 acompanyat amb el transport d'un protó (H^+) mitjançant una H^+ -ATPasa. L'amoniàc també pot ser detoxificat per la GlnS mitocondrial a glutamina, que no té càrrega, abans de passar a través de la membrana mitocondrial interna. La glutamina

synthetitzada pot ser emmagatzemada per ser utilitzada posteriorment en altres processos anabòlics com ara la síntesi de purines, pirimidines i mucopolisacàrids.

2.2.5 DETOXIFICACIÓ D'AMONI MITJANÇANT GLUTAMINA

En els animals ureogènics i ureotèlics, inclosos els éssers humans, el principal mecanisme per mantenir la concentració interna d'amoniac baixa és la detoxificació mitjançant la transformació d'amoniac en urea que s'elimina en l'orina. La síntesi d'urea es produeix principalment al fetge a través del cicle de l'ornitina-urea (UOC). En altres teixits, incloent-hi el cervell, que no posseeixen un UOC funcional, l'amoniac és principalment detoxificat a glutamina, que és alliberada al torrent sanguini i pot servir com un transportador no tòxic d'amoniac en teixits no hepàtics. En els peixos no ureogènics, la formació de glutamina juga un paper important en la detoxificació d'amoniac exogen i endogen, especialment en el cervell, durant l'exposició a amoniac extern o de l'ambient (Arillo i col·l, 1981; Dabrowska i Wlasow, 1986; Mommsen i Walsh, 1992; Peng i col·l, 1998; Lim i col·l, 2004a; Ip i col·l, 2005; Veauvy i col·l, 2005; Wee i col·l, 2007; Wright i col·l, 2007; Tng i col·l, 2009; Sanderson i col·l, 2010) o després de l'alimentació (Wicks i Randall, 2002a; Lim i col·l, 2004b). Pel que fa als peixos ureogènics i ureosmòtics, la glutamina pot actuar com a substrat per a la síntesi d'urea, que és essencial per a l'osmoregulació en un ambient hiperosmòtic.

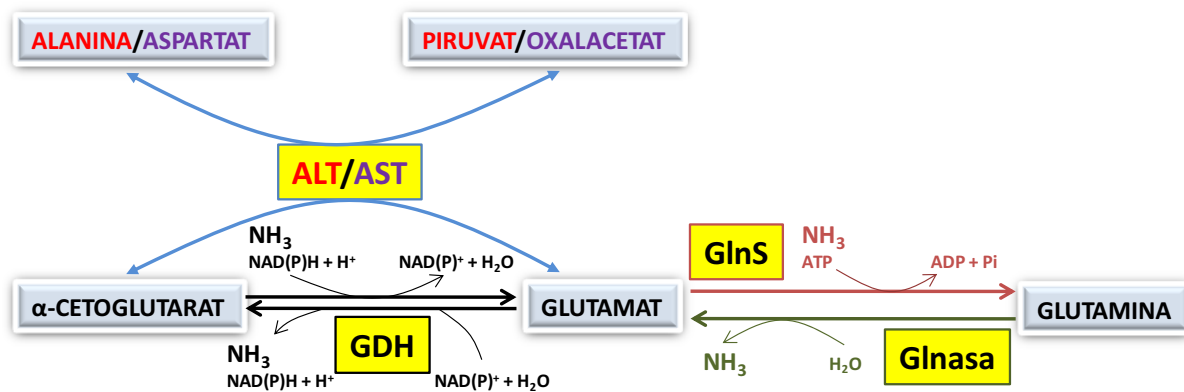


Figura 3. Principals enzims implicats en el metabolisme proteic en peixos.

Es representen les principals transaminases, alanina aminotransferasa (ALT; EC2.6.1.2) i aspartat aminotransferasa (AST; EC2.6.1.1), així com els enzims glutamat deshidrogenasa (GDH; EC1.4.1.3), glutamina sintetasa (GlnS; EC6.3.1.2) i glutaminasa (Glnasa; EC3.5.1.2).

La glutamina es produeix a partir de glutamat i NH_4^+ mitjançant una reacció catalitzada per la GlnS (figura 3). En truita irisada, s'han reportat múltiples gens que codifiquen per a GlnS (Murray i col·l, 2003; Walsh i col·l, 2003; Wright i col·l, 2007). La glutamina sintetasa (GlnS, EC6.3.1.2) es troba

en diferents òrgans i serveix per detoxificar els nivells d'amoni quan els nivells interns d'aquest augmenten (figura 3) (Iwata i col·l., 2000; Ip i col·l., 2001; Essex-Fraser i col·l., 2005; Wright i col·l., 2007). En cervell, és particularment important la protecció davant la toxicitat de l'amoni i consegüentment, és en aquest teixit on l'activitat GlnS és més alta (Danulat i Kempe, 1992; Essex-Fraser i col·l., 2005; Wright i col·l., 2007). S'ha suggerit que la glutamina podria servir com a mitjà de transport de nitrogen entre els teixits proteolítics i els desaminatius (Van Waarde, 1988), encara que sembla que l'alanina i l'amoni per sí mateix serien els vehicles més importants. El glutamat, per la seva banda, pot ser produït a partir d' α -KG i NH_4^+ , en una reacció catalitzada per l'activitat aminativa de la GDH (figura 3), en els mitocondris de les cèl·lules que no estan orientades cap al catabolisme dels aminoàcids a través de la transdesaminació. També es pot produir a partir d' α -KG i altres aminoàcids mitjançant una reacció catalitzada per diferents transaminases en els mitocondris i/o el citosol (figura 3). El cervell de la truita irisada presenta una major activitat GlnS que no pas activitat GDH (Wright i col·l., 2007). La compartimentació de la GlnS dins de la cèl·lula, en citosol o mitocondri, determina si la síntesi de glutamina comença amb el glutamat o l' α -KG i depèn de l'espècie de peix i teixit analitzats (Webb i Brown Jr, 1976, 1980; King i Goldstein, 1983).

Per a la detoxificació d'amoníac endogen (produït per transdesaminació) a glutamina o, finalment, a urea en els peixos ureogènics, és essencial que la GlnS es trobi a la matriu mitocondrial. L'amoníac circulant en el plasma exerceix els seus efectes tòxics sobre el cervell, i el cervell dels peixos posseeix un alt nivell d'activitat GlnS per protegir-lo contra la toxicitat de l'amoni (Peng i col·l., 1998; Ip i col·l., 2005; Wright i col·l., 2007). Al cervell dels peixos la GlnS es localitza en el citosol, cosa que facilita la detoxificació d'amoni circulant en sang, prevenint així la intoxicació del cervell originada per amoni. En el cas dels elasmobranquis marins que depenen de la urea sintetitzada al fetge per a osmoregulació, existeixen dues isoformes de GlnS en el cervell i el fetge, que estan localitzades al citosol i els mitocondris, respectivament (Smith Jr i col·l., 1983). Com a resultat, el cervell és sovint l'òrgan que experimenta els majors increments en el contingut de glutamina en els peixos exposats a amoníac.

2.2.6 TRANSAMINASES: L'ALANINA AMINOTRANSFERASA

A la degradació de la majoria d'aminoàcids, el pas inicial consisteix en una transaminació, mitjançant la qual es transfereix el grup α -amino de l'aminoàcid a un α -cetoàcid.

Hi ha diverses aminotransferases, cadascuna de les quals és específica per a un aminoàcid en concret o per a un grup d'aminoàcids semblants químicament, com ara els aminoàcids ramificats

leucina, isoleucina i valina. L' α -cetoàcid que accepta el grup amino és l' α -cetoglutarat. La reacció de transaminació és reversible, per tant, ambdós glutamat i α -cetoglutarat són substrats per a cadascuna de les transaminases. El mecanisme general de la reacció és del tipus *Ping Pong Bi Bi* i consisteix en la unió d'un dels substrats al centre actiu de l'enzim seguit de la unió del segon substrat una vegada el primer producte ha sortit del centre actiu.

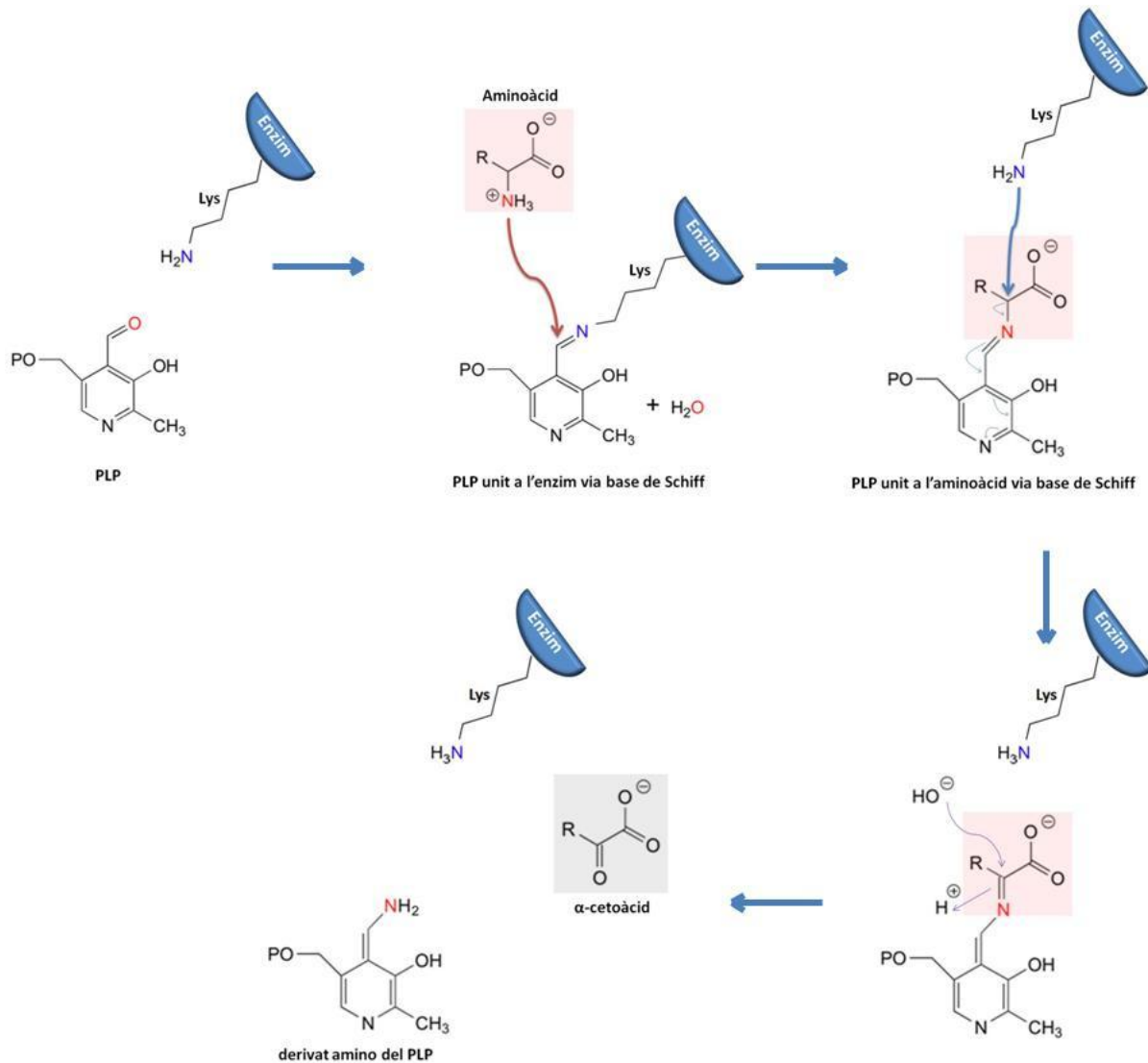


Figura 4. Reacció esquemàtica del mecanisme de transaminació: implicació del coenzim piridoxal-5-fosfat.

A l'inici de la reacció el PLP es troba unit al grup amino d'un residu de lisina del centre actiu de l'enzim com a una base de Schiff. La unió entre el PLP i l'enzim es trenca i el PLP forma una base de Schiff amb el grup amino de l'aminoàcid lliure. El residu de lisina de l'enzim que es troba ara lliure, captura un hidrogen de l'aminoàcid en forma de protó, la qual cosa origina que l'electró que queda s'incorpora a l'anell del PLP, originant una base de Schiff entre el carboni i el nitrogen. La base de Schiff s'hidrolitza per donar lloc a l' α -cetoàcid i el derivat amino de la base de Schiff.

El piridoxal-5-fosfat (PLP) en les seves formes diverses s'ubica en el centre actiu de l'enzim mitjançant l'establiment d'una base de Schiff entre el seu propi grup carbonil i el ϵ -amino d'un residu de lisina de l'enzim. El PLP és la forma activa de la vitamina B6 (PL) i és freqüentment descrit com el coenzim més versàtil de la natura. El PLP es requereix per nombrosos enzims que catalitzen reaccions de síntesi, catabolisme i interconversió d'aminoàcids (Snell, 1990; Leklem, 1991).

L'enzim piridoxal quinasa fosforila al PL per a formar PLP en presència d'ATP i el catió divalent Zn^{2+} en fetge. En la reacció catalitzada per les transaminases, el PLP accepta el grup α -amino dels aminoàcids i es converteix en piridoxamina fosfat (PMP). El PLP transferirà el grup amino a un α -cetoàcid mitjançant un mecanisme invers al de l'acceptació per a regenerar el PLP i produir de nou un α -aminoàcid (figura 4).

L'**alanina aminotransferasa**, també coneguda com a glutamat piruvat transaminasa (GPT, EC 2.6.1.2), catalitza la reacció reversible de transferència del grup α -amino de l'alanina al grup ceto de l' α -cetoglutarat per formar piruvat i glutamat (figura 5). Utilitza com a cosubstrat el piridoxal fosfat (Welch, 1972).

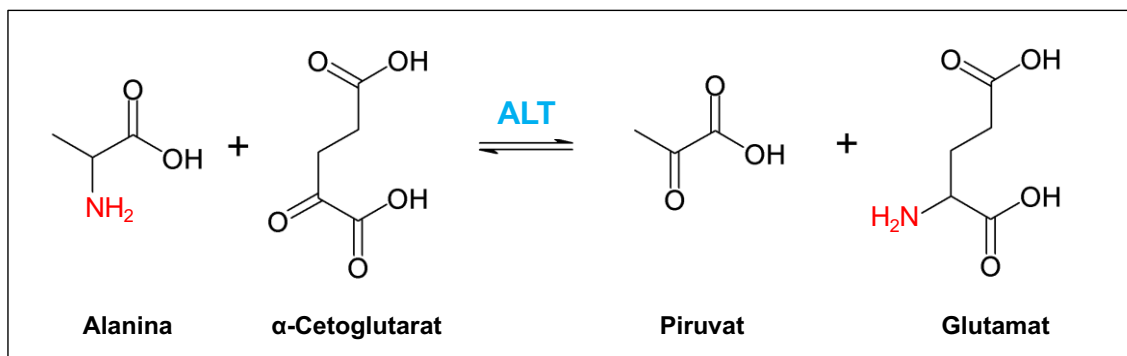


Figura 5: Reacció catalitzada per l'enzim ALT.

L'ALT transfereix de manera reversible el grup amino de l'alanina a l' α -cetoglutarat per formar piruvat i glutamat.

Per mediació de la conversió d'aquests quatre metabòlits, l'ALT esdevé un nexa d'interacció entre el metabolisme de carbohidrats, aminoàcids i l'energètic (Felig, 1973) (figura 6). L'alanina és reconeguda com l'aminoàcid més efectiu com a precursor de gluconeogènesi hepàtica (Yamamoto i col·l, 1974, MacDonald i col·l, 1976; Remesy i col·l, 1978); és l'aminoàcid principalment alliberat pel múscul esquelètic durant el dejú, originat per transferència del grup α -amino del glutamat al piruvat

recombinant AmphiALT inhibeix el creixement d'*Escherichia coli* i causa la seva lisi per interacció amb l'LPS de bacteris Gram-negatius, com ara *E. coli* i *Aeromonas hydrophila* (Jing i Zhang, 2010). De manera similar, un increment significatiu en l'activitat ALT també va ser observat en rates tractades amb LPS (Kim i Kim, 2002) i en ratolins infectats amb el patògen oportunista *A. hydrophila* (Brenden i Huizinga, 1986). L'ALT no és l'única transaminasa que sembla tenir un altre paper a banda de l'inicialment establert: l'aspartat aminotransferasa mitocondrial (AST2) pot localitzar-se a la membrana citoplasmàtica on contribueix al transport d'àcids grassos lliures cap a l'interior de la cèl·lula (Zhou i col·l, 1998).

2.2.6.1 Isoformes de l'ALT

L'ALT és un enzim altament conservat durant l'evolució dels organismes procariotes i eucariotes (Brown i Voelker, 1980; Metón i col·l, 2004b; Miyashita i col·l, 2007; García-Campusano i col·l, 2009).

Els estudis bioquímics primerencs en mamífers indicaren la presència d'isoformes ALT solubles en citoplasma i mitocondri. Emprant centrifugacions diferencials d'homogenats de fetge de rata, Hopper i Segal (1964) i Swick i col·l (1965) mostraren que la major part de l'activitat ALT es trobava al citosol, mentre que tan sols un 10 i 20% de l'activitat total era deguda a la fracció mitocondrial. Katanuma i col·l (1962) i Takeda i col·l (1964) reportaren la separació de dues activitats ALT mitjançant tècniques cromatogràfiques.

En vertebrats s'han reportat les seqüències de cDNA que codifiquen per a isoenzims ALT d'humans, ximpanzé comú (*Pan troglodytes*), *Bos taurus*, rata, ratolí, gos, granota (*Xenopus laevis*), peix zebra (*Danio rerio*), salmó (*Salmo salar*) i orada (Sohocki i col·l, 1997; Klein i col·l, 2002; Yang i col·l, 2002; Jadhao i col·l, 2004; Metón i col·l, 2004b; Rajamohan i col·l, 2006; Steinke i col·l, 2006; Anemaet i col·l, 2008; Zimin i col·l, 2009; Leong i col·l, 2010; Kim i col·l, 2011). Dues isoformes ALT, ALT1 i ALT2, codificades per gens diferents, s'han clonat a partir d'humà, ratolí i rata (Sohocki i col·l, 1997; Yang i col·l, 2002; Jadhao i col·l, 2004; Yang i col·l, 2009). El gen ALT1 humà fou clonat a partir de la seqüència citosòlica de l'ALT hepàtica (Ishiguro i col·l, 1991) i es troba situat al cromosoma 8q24.3 (Sohocki i col·l, 1997). Yang i col·l (2002) varen clonar un altre isoenzim ALT humà, ALT2, i situaren aquest gen al cromosoma 16q12.1. El processament alternatiu d'ALT2 pot donar lloc a una proteïna de 523 aminoàcids (ALT2_1) o, degut a l'ús d'un codó d'inici alternatiu, a una proteïna més curta de 423 aminoàcids (ALT2_2). Recentment, Glinghammar i col·l (2009), mitjançant detecció per *Western blot* van demostrar que ALT2 presenta localització mitocondrial.

Els isoenzims ALT1 i ALT2 **humans** presenten diferent distribució tissular, suggerint un paper dependent de teixit pels isoenzims ALT. Estudis de *Northern blot* indiquen que l'ALT1 humana s'expressa majoritàriament en ronyó, i en nivells moderats en fetge, múscul i cor. L'ALT2 humana es troba en grans quantitats en múscul, greix, ronyó i cervell i en menor mesura en fetge i glàndula mamària (Yang i col·l, 2002). Els anàlisis per *Western blot* indiquen que ALT1 s'expressa majoritàriament en fetge, múscul esquelètic, ronyó i en menor quantitat en cor, mentre que ALT2 ho fa en cor i múscul esquelètic. Estudis immunohistoquímics indiquen expressió d'ALT1 en hepatòcits i cèl·lules epitelials derivades dels túbuls renals i la glàndula salival, mentre que ALT2 es troba a l'escorça de la glàndula adrenal, cossos neuronals, miòcits cardíacs, fibres de múscul esquelètic i pàncrees endocrí. Addicionalment, assajos d'immunoprecipitació demostren que ALT1 és la isoforma predominant en fetge humà i és la que contribueix de manera més important als nivells basals circulants d'activitat ALT en humans (Lindblom i col·l, 2007).

Les isoformes de **ratolí** corresponents a les isoformes ALT humanes ALT1 i ALT2, van ser clonades per Jadhao i col·l (2004). Els gens *alt1* i *alt2* murins es van localitzar als cromosomes 15 i 8 respectivament. El missatger murí ALT1 s'expressa principalment en fetge i en menor proporció en teixit adipós blanc, intestí i còlon. Pel contrari, l'RNAm d'ALT2 s'expressa en quantitats elevades en múscul, fetge i teixit adipós blanc, i en nivells moderats en cervell i ronyó. L'expressió d'ALT1 i ALT2 de ratolí en *E. coli* confirmaren que els cDNAs murins d'ALT1 i ALT2 codifiquen enzims funcionals.

Les isoformes de **rata** corresponents a les isoformes ALT humanes ALT1 i ALT2, van ser clonades per Yang i col·l (2009). Estudis de qRT-PCR mostraren que ALT1 es troba àmpliament distribuïda en els teixits analitzats, presentant una major expressió en intestí prim i fetge, trobant-se en quantitats significatives en teixit adipós marró, teixit adipós blanc, cor, múscul i còlon i en baixa quantitat en ronyó i cervell. L'expressió d'ALT2 és més restringida i presenta una major expressió en múscul i fetge, seguit de teixit adipós blanc i cervell, i en menor quantitat en cor, ronyó i còlon. Els experiments de *Western blot* corroboraren el patró de distribució mostrat per qRT-PCR: la proteïna ALT1 és present de forma majoritària en intestí, múscul, fetge i teixit adipós blanc i marró, mentre que ALT2 es troba fonamentalment a fetge, múscul i en menor proporció en cervell i teixit adipós. En fetge de rates mascle hi ha 4 vegades més proteïna ALT2 que no pas en femelles essent a més l'activitat ALT en fetge de mascles un 30% superior. Vedavathi i col·l (2004) van indicar l'existència de dues isoformes citosòliques ALT, de masses moleculars corresponents a 17.7 i 112.2 kDa, en fetge de rates sotmeses a dejú.

El cDNA d'ALT1 **caní** (Rajamohan i col·l, 2006) va ser expressat en *E. coli*, amb una cua d'histidina N-terminal (6x). L'activitat de l'enzim recombinant ALT1 purificat fou de 229.81 U/mg de proteïna, aproximadament 38 vegades superior que l'activitat total soluble trobada en els lisats d'*E. coli* control, confirmant que el cDNA clonat codifica una proteïna funcional. La determinació per RT-PCR dels nivells de missatger d'ALT1 en teixits canins revelaren que s'expressa de forma predominant en cor, seguida de fetge, greix, cervell, intestí i per últim ronyó. Una anàlisi d'immunoblot, emprant anticossos específics, va mostrar que ALT1 és present al fetge, i que tant ALT1 com ALT2 es detecten al múscul (Miyazaki i col·l, 2009).

El nostre grup va reportar el clonatge i la localització subcel·lular de dos isoenzims ALT a partir de fetge d'*Sparus aurata*, anomenats cALT i mALT, que corresponen a les isoformes citosòlica i mitocondrial, respectivament (Metón i col·l, 2004b). La isoforma mALT, presenta una regió N-terminal que conté una senyal de direccionament a mitocondri, i va ser la primera seqüència reportada per a una ALT mitocondrial en animals. Posteriorment, es va clonar una tercera isoforma: cALT2, de localització citosòlica i generada a partir del processament alternatiu del gen cALT (Anemaet i col·l, 2008). Les isoformes citosòliques cALT1 i cALT2 es diferencien per la presència en cALT2 d'un exó extra de 85 pb que inclou un inici de traducció que origina la inclusió de 23 aminoàcids addicionals en l'extrem N-terminal de l'enzim. Aquest pèptid N-terminal presenta una regió rica en asparagines que podria estar involucrada en processos d'interacció proteïna-proteïna, la qual cosa indicaria que l'activitat enzimàtica cALT2 podria estar regulada per agregació o interacció amb altres proteïnes. En quant a la distribució tissular, estudis d'RT-PCR semiquantitatiu en teixits d'orades alimentades, indiquen que cALT1 s'expressa de forma majoritària en fetge, cervell, múscul esquelètic, intestí i ronyó. La major expressió de cALT2 la trobem en els teixits on cALT1 és indetectable: cor, brànquies i melsa; nivells moderats de cALT2 es troben en intestí, ronyó i fetge i en menor quantitat en cervell i múscul esquelètic (Anemaet i col·l, 2008).

2.2.6.2 Característiques cinètiques de l'ALT

L'activitat ALT es pot mesurar en la direcció de la formació d'L-glutamat i piruvat a partir d'L-alanina i α -cetoglutarat (reacció directa) o bé en la direcció de la formació d'L-alanina i α -cetoglutarat des d'L-glutamat i piruvat (reacció inversa).

Estudis cinètics d'ALT de fetge de rata, indiquen valors de K_m estimades per a l'alanina i l' α -cetoglutarat de 34 mM i 1.1 mM, respectivament. Considerant la reacció inversa, la K_m per al glutamat i el piruvat fou 15 mM i 0.9 mM, respectivament (Hopper i Segal, 1964). Per a l'ALT

purificada a partir de cor de porc, els valors de K_m per a l'alanina i l' α -cetoglutarat foren 28 mM i 0.4 mM respectivament. Donat que es va demostrar que el piruvat inhibia la transferència del grup amino del glutamat al piruvat, la K_m aparent per al piruvat en presència de 20 mM d'L-glutamat fou estimada en 0.3 mM, mentre que la constant de dissociació glutamat-ALT fou d'aproximadament 25 mM (Saier i Jenkins, 1967a,b).

L'enzim mitocondrial obtingut a partir de fetge de porc va presentar un valor de K_m per a l'alanina d'1.9 mM (DeRosa i col·l, 1979), més d'un ordre de magnitud inferior al reportat per a l'enzim citosòlic: 34 mM (DeRosa i Swick, 1975). La K_m per a l' α -cetoglutarat, per altra banda, fou similar per a ambdós enzims. DeRosa i col·l (1979), van observar que l'ALT mitocondrial aïllada de ronyó i fetge de porc, era inhibida per L-glutamat i piruvat. En canvi, la isoforma citosòlica, no presentava aquesta inhibició per substrat.

En estudis recents es van descriure les característiques cinètiques de les isoformes ALT1, ALT2 i ALT2_2 recombinants humanes expressades en *E. coli*. Mentre que la isoforma ALT2_2 no va mostrar activitat enzimàtica, les isoformes ALT1 i ALT2 recombinants presentaren una activitat semblant, d'aproximadament 81,000 U/L per mg de proteïna total. Considerant la reacció directa, ALT1 va mostrar una K_m superior per a l'alanina que ALT2 (70 mM respecte 15 mM), mentre que per a l' α -cetoglutarat ALT-1 va mostrar una K_m 3 vegades inferior a l'observada per ALT2 (0.4 mM respecte 1.2 mM). Per a la reacció inversa, ALT1 presenta una K_m major per al piruvat (1 mM) i una K_m menor per al glutamat (6.7 mM), comparat amb ALT2, que va exhibir una K_m de 0.3 mM per al piruvat i de 30 mM per al glutamat (Glinghammar i col·l, 2009).

En estudis duts a terme amb teixit branquial del bivalve *Corbicula japonica* es va detectar activitat ALT al citosol (activitat que representa un 51% del total, atribuïda a cALT) i al mitocondri (activitat que representa un 49% del total, atribuïda a mALT). Les isoformes citosòlica i mitocondrial van ser parcialment purificades i caracteritzades cinèticament. Els valors de K_m per a l'L-alanina (5.6 mM i 7.4 mM, corresponents a cALT i mALT, respectivament), per a l' α -cetoglutarat (0.12 mM i 0.16 mM, respectivament) i pel piruvat (0.036 mM i 0.027 mM, respectivament) mostraren pràcticament els mateixos valors, tot i que la K_m pel glutamat fou més elevada per a l'mALT que no pas per a la cALT (35.6 mM i 9.5 mM, respectivament). Els valors de K_m determinats per a l'alanina van ser en tots dos casos inferiors a la seva concentració intracel·lular, indicant que ambdues cALT i mALT poden ser funcionals fisiològicament en la direcció de la formació de piruvat. Les activitats dels enzims en la direcció de la formació de piruvat (reacció directa) foren majors que les observades en la formació

d'alanina (reacció inversa). Les relacions d'activitat de la reacció directa/inversa per a mALT foren unes 4 vegades superiors a les de cALT. La concentració d'alanina en *Corbicula japonica* excedeix els valors de K_m per a l'alanina estimats per a cALT i mALT, i la concentració d' α -cetoglutarat es troba en el mateix rang que els valors de K_m per a aquest substrat en ambdós enzims. No obstant, la concentració de glutamat fou 3 i 10 vegades inferiors als valors de K_m estimats per al glutamat de cALT i mALT, respectivament. Durant l'aclimatació a alta salinitat, els nivells d'aminoàcids lliures s'incrementa, i l'alanina és l'aminoàcid que representa la major part de la reserva d'aminoàcids lliures intracel·lulars. Per a la formació d'alanina durant l'aclimatació a alta salinitat, la cALT presumiblement seria més activa que mALT donat que presenta una menor afinitat pel glutamat. Es més, la GDH, de localització mitocondrial, amb una K_m pel glutamat menor que mALT (de 1.6 mM) competiria pel substrat comú glutamat, donant prioritat a la desaminació del glutamat per la GDH, i no pas a la formació d'alanina com a grup donant amino. Al mitocondri, la reacció ALT no procediria fisiològicament en la direcció de la formació d'alanina sense una reducció de l'activitat GDH originada per alguns factors com ara un decrement en els nivells d'ADP o bé un increment en els nivells de GTP (Hayashi i col·l, 1993).

En dues espècies de peixos d'aigua dolça, *Clarias batrachus* i *Labeo rohita*, s'han estimat les constants de Michaelis per a l'ALT citoplasmàtica purificada a partir de fetge. Les K_m per a l'alanina foren de $18.5 \text{ mM} \pm 0.48$ i $23.55 \text{ mM} \pm 0.6$, i de $0.29 \text{ mM} \pm 0.023$ i $0.33 \text{ mM} \pm 0.028$ per l' α -cetoglutarat, respectivament (Srivastava i col·l, 2004).

L'expressió de les isoformes citosòliques cALT1 i cALT2 d'orada en *Saccharomyces cerevisiae* va permetre la seva caracterització cinètica (Anemaet i col·l, 2008). Els valors de K_m per a l'L-alanina i l' α -cetoglutarat són similars per a ambdues isoformes, essent de 1.82 mM i 2.21 mM per a l'alanina i de 0.048 mM i 0.051 mM per a l' α -cetoglutarat, respectivament. No obstant, la V_{max} de la reacció directa de cALT2 és 250 vegades superior a la trobada per a cALT1. Les diferències més significatives en quant a K_m es van trobar front als substrats que intervenen en la reacció inversa. cALT2 presenta major afinitat pel glutamat i el piruvat que cALT1; essent els valors de K_m estimats per al glutamat i el piruvat de 4.53 mM i 0.154 mM per a la cALT2 i de 15.91 mM i 0.690 mM per a la cALT1. A la reacció inversa, cALT2, a diferència de cALT1, presenta inhibició a alta concentració de substrat, essent les K_i per al glutamat de 34.9 mM i de 36.5 mM per al piruvat. L'anàlisi de la relació d'activitat directa/inversa duta a terme amb extractes de llevats que sobreexpressen cadascuna de les isoformes mostraren que cALT2 catalitza preferentment la conversió d'L-alanina a piruvat. Addicionalment, estudis de mutagènesi dirigida demostraren que els residus 3 a 13 de cALT2 són

essencials per dictar a l'enzim la preferència del sentit de la reacció que catalitza, de tal forma que en eliminar aquesta regió cALT2 es comporta com a cALT1 en les situacions analitzades. Per altra banda, la deleció dels aminoàcids 14 a 23 de cALT2, regió on es troba un domini poliasparagina, no fa canviar el comportament de l'enzim respecte a la preferència en el sentit de la reacció a catalitzar.

Dieterle i col·l (1978) van determinar que una part considerable del piruvat procedent de l'alanina s'origina al citoplasma, i que la contribució de l'activitat ALT mitocondrial durant la gluconeogènesi és negligible comparada amb l'activitat de l'enzim citosòlic. Donat que la constant d'equilibri d'ALT és 1.6, tant el piruvat com l'alanina poden ser formats fàcilment en mitocondris aïllats, depenent de la concentració de substrats afegits (Mendes-Mourao i col·l, 1975). No obstant, estudis realitzats en hepatòcits perfundits de rata, indiquen que a la cèl·lula l'enzim mitocondrial, en contrast amb el citoplasmàtic, és sempre posicionat vers la formació d'alanina (Groen i col·l, 1982). El flux mitocondrial sota condicions gluconeogèniques es considerablement inferior al citoplasmàtic, essent unes 25 vegades inferior que el flux simultani mitocondrial via AST. Per tant, durant la gluconeogènesi, el flux promogut a través de l'mALT és negligible i el flux cel·lular és dirigit cap a la formació de piruvat, per acció de l'ALT citosòlica (Fafournoux i col·l, 1983). En el fetge d'animals alimentats, quan predomina la glicòlisi sobre la gluconeogènesi, la relació piruvat/alanina augmenta i el flux de l'enzim citosòlic disminueix considerablement. En aquestes condicions és quan la reacció mitocondrial excedeix la citoplasmàtica i adquireix llavors importància fisiològica, amb preferència per a la formació d' α -cetoglutarat (Tischler i col·l, 1977). Aquesta major preponderància del flux mitocondrial respecte el citoplasmàtic deu ocórrer presumiblement en la regió perivenosa del lòbul hepàtic on la relació de flux glicòlisi-gluconeogènesi és major i on l'activitat específica de l'ALT mitocondrial és 10 vegades inferior que a la zona periportal. En fetge de rata, l'enzim citosòlic és present en els hepatòcits periportals dels lòbuls hepàtics, de manera consistent amb el seu paper a la gluconeogènesi (Lenartowicz i Wojtczac, 1988; Matsuzawa i col·l, 1997).

No obstant, estudis realitzats per Swick i col·l (1965) i DeRosa i Swick (1975) amb extractes cel·lulars de rata, suggereixen que la transformació d'alanina a piruvat té lloc preferentment al mitocondri, i la reacció inversa al citosol. Es basaven en els valors de K_m per a l'alanina, que era de 2 mM per a l'ALT2 i de 34 mM per a l'ALT1; en la relació de les activitats directa/inversa, superior per a ALT2; i en la concentració d'alanina en teixits de mamífer, que era unes 30 a 100 vegades inferiors als valors de K_m d'ALT1 per a l'alanina, però similars a la K_m per a ALT2. Altres estudis sobre la gluconeogènesi a partir de l'alanina suggerien que la conversió de l'alanina a piruvat ocorre de manera més probable al mitocondri. Mendes-Mourao i col·l (1975) i Quistorff i Grunnet (1987)

demostraren que l'alanina pot ser transaminada a piruvat al mitocondri en hepatòcits de rata, i que ho fa a nivells suficientment elevats per mantenir els nivells de glucèmia observats, encara que no necessàriament demostraven que és el lloc preferent per a la transaminació.

La majoria d'estudis cinètics de l'ALT es van dur a terme amb l'enzim purificat d'extractes citosòlics i mitocondrials aïllats de diversos teixits. Els resultats obtinguts no són aparentment concordants en quant al sentit de la reacció que catalitza cadascuna de les isoformes, aquest fet podria ser degut en part a la presència en el citosol d'isoformes homòlogues a cALT1 i cALT2 d'orada, encara no clonades en mamífers. De fet, diversos estudis han suggerit la presència de diverses isoformes ALT. Vedavathi i col·l (2004) purificaren i caracteritzaren dues isoformes ALT citosòliques en fetge de rates sotmeses a dejú. La massa molecular d'aquestes dues isoformes fou de 17.7 kDa i 112.2 kDa amb un punt isoelèctric de 4.2 i 5.3 respectivament. Ambdós enzims mostraren especificitat de substrat per a l'L-alanina amb valors de K_m de 0.51 mM i 1.14 mM, i de 0.12 i 0.17 mM per l' α -cetoglutarat, respectivament. Experiments d'isoelectroenfocament duts a terme amb l'ALT citosòlica purificada de fetge de rata i humana resulten en la separació de 3 i 4 bandes. Així mateix, s'ha reportat la presència d'una isoforma d'ALT2 produïda per ensamblament alternatiu del gen ALT humà (Lindblom i col·l, 2007). El desconeixement de la concentració dels quatre metabòlits que participen de la reacció catalitzada per ALT en cadascun dels compartiments cel·lulars en les diferents situacions nutricionals, la manca d'estudis de metabolòmica i la possible presència d'isoformes fins ara no caracteritzades, dificulten encara la interpretació dels resultats.

2.2.6.3 Estructura i inhibidors de l'ALT

Actualment no es disposa de cap de les isoformes ALT descrites en forma cristal·litzada. L'única informació a nivell d'estructura és la del lloc d'unió del PLP al centre actiu de l'enzim, que s'ha aconseguit per homologia amb la zona d'unió del PLP determinada per a l'enzim AST mitjançant cristal·lografia per raigs X. La majoria dels aminoàcids importants que s'uneixen per enllaços d'hidrogen al PLP, identificats en l'AST per cristal·lografia de raigs X, estan conservats en l'estructura de l'ALT. El lloc d'unió a PLP en l'ALT de fetge de rata és la Lys³¹³. En l'ALT de fetge de rata la seqüència de residus compresa entre Gln³⁰³ a Arg³²² coincideix amb la seqüència de 20 residus al voltant del lloc d'unió a PLP en l'ALT de cor de rata (Tanase i col·l, 1979) amb l'excepció d'un únic residu en què la Tyr³¹⁵ està canviada a Phe. Això suggereix que la seqüència al voltant del lloc d'unió a PLP és altament conservada en l'ALT. Malgrat la baixa homologia amb l'AST, la majoria dels aminoàcids crucials per establir ponts d'hidrogen amb el PLP en ambdues formes citosòlica i

mitocondrial de l'AST, també es conserven en l'ALT citosòlica de rata. La topologia de l'estructura secundària que envolta el lloc d'unió a PLP en l'AST, amb una estructura amb 7 fulles plegades β i vuit hèlixs intercalades, revelades per cristal·lografia de raigs X (Jansonius i col·l, 1984), probablement deuen estar conservades en l'ALT de fetge de rata.

La determinació de la seqüència i composició d'aminoàcids de l'enzim ALT citosòlic purificat de fetge de rata va indicar que la proteïna consta de 495 aminoàcids i que està acetilada a l'extrem N-terminal. El pes molecular de la proteïna es va establir en 55000 per SDS-PAGE. L'enzim actiu amb un pes molecular de 114000 Da és un homodímer compost per dues subunitats idèntiques (Ishiguro i col·l, 1991).

S'ha descrit que l'ALT pot ser modificada postraduccionament per glicació amb glucosa o altres monosacàrids. Beranek i col·l (2001) mostraren que l'ALT citosòlica de cor de porc era inhibida per sucres, essent l'ordre d'inhibició D-glucosa < D-fructosa < D-ribosa < D,L-gliceraldehid. Així mateix, Okada i col·l (1994, 1997) prèviament van descriure un efecte inhibitori de l'activitat AST després de la glicació.

Per altra banda, estudis d'inhibició, de modificació d'aminoàcids i espectroscòpics amb l'ALT de rata mostraren que el PLP i els grups -SH lliures estan directament involucrats en la catàlisi enzimàtica. La hidroxilamina, aminoòxiacetat (AOA) (antagonistes del PLP), p-hidroxibenzoat i clorur de mercuri (reactius per als grups sulfhidril), inhibiren completament l'activitat dels enzims. El glutarat i el maleat inhibiren del 65 al 80% l'activitat, mentre que l'L-ascorbat, o-fenantrolina i EDTA mostraren una menor o absència d'inhibició (Vedavathi i col·l, 2004).

Diversos estudis han reportat que l'ALT mitocondrial és més inestable que no pas la citosòlica. La inestabilitat de la isoforma mitocondrial de fetge de rata va dificultar els esforços per purificar-la (Swick i col·l, 1965). L'ús de trealosa a l'extracció va millorar l'estabilitat de l'mALT, mentre que els inhibidors de proteases no van tenir cap efecte (Mukorah i col·l, 1998). Estudis recents també posen de manifest aquesta característica, l'ALT2 humana recombinant és inestable quan s'emmagatzema en sèrum a 37°C (Liu i col·l, 2009), perdent pràcticament el 100% de la seva activitat a les 24h, mentre que l'ALT1 només en va perdre un 20%. Quan es manté el sèrum a 22°C, l'ALT2 va perdre un 50% de la seva activitat a les 24h, i un 25% quan es troba a 4°C. L'activitat ALT1, mantinguda a 22°C o 4°C no va presentar pèrdua d'activitat. Quan les proteïnes recombinants ALT1 i ALT2 van ser incubades en un tampó amb PBS, BSA (albúmina sèrica bovina) i un 25% de glicerol en comptes del sèrum humà, van mostrar una major estabilitat, en especial l'ALT2. De fet, la major estabilitat d'ALT2

en glicerol ja s'havia reportat anteriorment (Swick i col·l, 1965). La presència d'alanina, 100 mM, va ajudar a millorar l'estabilitat d'ALT2. L'ALT2 és més estable en plasma que no pas en sèrum (Glinghammar i col·l, 2009).

2.2.6.4 Regulació de l'expressió de l'ALT

L'activitat ALT, mesurada en homogenats de fetge de rata canvia marcadament en resposta a diferents tractaments nutricionals i hormonals. Rosen i col·l (1959, 1963) trobaren que l'activitat ALT s'incrementava en situacions associades a gluconeogènesi: en animals diabètics o sotmesos a dejú i després l'administració de cortisol o la ingesta de dietes amb un alt contingut de proteïna. A més, els agonistes β -adrenèrgics, com ara l'epinefrina, el glucagó i la norepinefrina, indueixen l'activitat ALT en fetge de rata (Begum i Datta, 1991, 1992).

Gavosto i col·l (1957) observaren que l'activitat AST incrementava un 67% i l'activitat ALT en un 81% en fetge de rates després de la injecció de cortisona (120 mg/Kg diàriament durant 3 dies). En altres estudis duts a terme per Beaton i col·l (1957), el tractament diari de rates amb cortisona no afectà els nivells d'AST en fetge però l'activitat ALT va ser dues vegades superior. En fetge de mamífers, el dejú prolongat produeix un increment de l'activitat citosòlica ALT, però no així en la mitocondrial (Swick i col·l, 1965).

L'anàlisi de l'expressió d'ALT1 i ALT2 en fetge de ratolins obesos, va indicar que l'expressió d'ALT2 incrementava unes dues vegades, mentre que els nivells d'ALT1 no canviaven (Jadhao i col·l, 2004), suggerint que ALT2 deu ser la responsable de l'increment de l'activitat ALT en sèrum de ratolins que presenten esteatosi.

Recentment, els estudis de Liu i col·l (2009) van mostrar que ratolins en què es va induir esteatosi hepàtica, en alimentar-los amb una dieta deficient en metionina i colina (MCD), s'incrementà l'activitat ALT sèrica. L'increment de l'activitat ALT en sèrum (d'un 4 vegades) observat en ratolins sotmesos a la dieta MCD durant 12 setmanes, era degut a l'increment en sèrum d'ALT1 (1.7 vegades) i ALT2 (1.9 vegades). Tant l'RNAm com la proteïna d'ALT1 i ALT2, incrementaren en fetge de ratolins alimentats amb la dieta MCD, unes 2 i 5 vegades respectivament. L'increment de l'expressió hepàtica observada per a ALT1 i ALT2 es dona de forma conjunta i es correlaciona amb els increments de l'activitat ALT en sèrum i no estaria relacionada amb la presència de dany o mort cel·lular.

D'altra banda, s'han descrit increments en l'activitat ALT en sèrum en resposta a l'acció de diferents agents tòxics. Yang i col·l (2009) van estudiar l'efecte del tetraclorur de carboni i l'acetaminofè, dues molècules conegudes pel seu efecte hepatotòxic sobre l'ALT murina en sèrum. Després de 24h de l'administració de 2 mL/Kg de CCl₄ en ratolins, l'activitat ALT sèrica va incrementar 66 vegades. La proteïna ALT1 en sèrum va incrementar 4.8 vegades i l'ALT2 3.9 vegades. A les 48 hores de l'administració de 1400 mg/Kg d'acetaminofè en rates, l'activitat sèrica ALT era 20 vegades superior a la presentada pel grup control. En sèrum, els nivells d'ALT1 i ALT2 es van incrementar 3 i 15 vegades, respectivament.

ALT i AST són quantitativament les aminotransferases més importants en fetge de peixos teleostis (Cowey i Walton, 1989). En fetge d'orada, Metón i col·l (1999b) trobaren que l'activitat ALT disminuïa després d'un període de dejú perllongat, mentre que l'activitat AST mostrava una lleugera tendència a augmentar. L'efecte del dejú perllongat en les activitats ALT i AST en altres espècies de peixos és variable, ja que s'han reportat casos en què no varia o bé en què incrementa. Alimentar els peixos amb una dieta amb alt contingut proteic incrementa les activitats AST i ALT en fetge d'orada (Metón i col·l, 1999b; Fernández i col·l., 2007). En salmó atlàntic (*Salmo salar*), Fynn-Aikins i col·l (1995) trobaren que el nivell d'activitat AST no depenia del tipus de font d'energia subministrada al peix, mentre que les dietes amb alt contingut en proteïna promouen l'increment de l'activitat ALT hepàtica. Lupiáñez i col·l (1989) també observaren un increment en l'activitat ALT en truita irisada alimentada amb dietes altament proteiques. En aquesta espècie, Sánchez-Muros i col·l (1998), trobaren que l'activitat ALT s'adaptava moderadament a canvis en la dieta mentre que l'AST no variava. La dieta d'alt contingut proteic incrementava les activitats GDH i ALT aproximadament un 100 % i 65% respecte al grup control. Les activitats ALT i AST incrementaren quan es va augmentar el contingut de proteïnes de la dieta en *Mugil capito* (Alexis i Papaparaskeva-Papoutsoglou, 1986). En alimentar peixos no carnívors, bagres juvenils (*Rhamdia quelen*), amb dietes hiperproteiques, l'activitat hepàtica ALT va incrementar en un 30%, es van duplicar els nivells d'AST i s'incrementaren els valors de GDH, comparat amb els peixos alimentats amb dietes amb baix contingut en proteïnes (Melo i col·l, 2006). Per altra banda, el període de reproducció va modificar la tendència anual de canvis en l'activitat ALT i altres enzims clau involucrats en la glicòlisi-gluconeogènesi en fetge d'orada (Gómez-Milán i col·l, 2007).

Anemanet i col·l (2008), mitjançant RT-PCR semiquantitatiu van analitzar la regulació nutricional i hormonal dels isoenzims citosòlics cALT1 i cALT2 en fetge d'orada. El dejú va provocar una disminució significativa dels nivells d'RNAm de cALT1, d'un 50% respecte el grup d'orades

alimentades, mentre que l'expressió de cALT2 va incrementar 2.5 vegades. Després del dejú, la realimentació va permetre a curt termini (6h) la recuperació dels nivells de cALT2 observats en el grup de peixos alimentats. Addicionalment, es va analitzar l'expressió dels nivells d'RNAm de cALT1 i cALT2 després de l'alimentació. Després de la ingesta, l'expressió de cALT1 és màxima entre les 2-8 h, mentre que els nivells d'expressió de cALT2, entre les 4-8h, eren un 75% més baixos que els observats en els peixos a temps 0h (abans de la ingesta). En relació a l'estudi de l'efecte de la glucosa i la insulina en l'expressió de cALT1 i cALT2 en fetge d'orada, s'ha observat que 6 hores després de l'administració de glucosa o d'insulina els nivells de cALT2 van disminuir 2.2 i 2.9 vegades, respectivament, mentre que els nivells de cALT1 no van variar en cap cas. Per altra banda, es va estudiar l'efecte del tractament amb estreptozotocina (STZ), un derivat de la glucosamina-nitrosourea que origina necrosi de cèl·lules β -pancreàtiques, compost àmpliament utilitzat per generar animals diabètics (Junod i col·l, 1969; Like i Rossini, 1976; Wilson i Leiter, 1990). Després de 22h, les orades tractades amb STZ presentaven uns nivells hepàtics d'RNAm de cALT2 3 vegades superiors respecte els peixos control, mentre que l'expressió de cALT1 mostrava una tendència a disminuir. A partir d'aquests resultats, es va concloure que l'expressió hepàtica de cALT2 incrementa en situacions gluconeogèniques, mentre que la de cALT1 és predominant durant el període postprandial per a la utilització dels nutrients de la dieta.

2.2.6.5 Implicacions clíniques de l'ALT

La determinació d'activitat ALT en sèrum s'utilitza rutinàriament per a la detecció de dany hepàtic; un biomarcador que s'ha emprat durant més de 50 anys (Karmen i col·l, 1955; Sherman, 1991). S'han observat elevacions sèriques en l'activitat ALT en malalties hepàtiques com ara hepatitis, cirrosi i esteatohepatopatia no alcohòlica (Dufour i col·l, 2000; Bondini i col·l, 2007; Anty i col·l, 2010). De forma similar, en assajos preclínic de fàrmacs, un increment en l'activitat ALT en sèrum s'utilitza com a marcador de dany hepatocel·lular, indicant toxicitat farmacològica. No obstant, hi ha casos en què durant les proves preclíniques dels fàrmacs s'observen increments en l'activitat ALT en sèrum de les espècies emprades pels estudis, sense que aquestes mostrin clara evidència de dany hepàtic (Draper i col·l, 1994; Valentine i col·l, 1990; O'Brien i col·l, 2002). Addicionalment, altres fàrmacs, com ara l'oxodipina, originen un descens en els nivells d'activitat ALT i AST en sèrum en associació amb dany hepàtic en gossos i rates (Waner i col·l, 1990); la cefazolina i isoniazida també disminueixen els nivells ALT o AST en diverses espècies animals estudiades (Dhami i col·l, 1979; Yamada i col·l, 1984).

Nivells elevats d'ALT en sèrum es troben freqüentment associats a malalties com ara l'obesitat (Iacobellis i col·l, 2007; De Luis i col·l, 2008), diabetis tipus 1 (Thakran i col·l, 2003; West i col·l, 2006; Leeds i col·l, 2009), malalties musculars (Begum i col·l, 2000; Nathwani i col·l, 2005, McMillan i col·l, 2011), malaltia ateroscleròtica coronària (Wannamethee i col·l, 2005; Adibi i col·l, 2007) i desenvolupament de la resistència a la insulina i diabetis tipus 2 (Vozazova i col·l, 2002; West i col·l, 2006; Sattar i col·l, 2007; Zhang i col·l, 2010). S'ha suggerit que l'increment de l'activitat ALT en sèrum podria ser degut a l'increment en la producció d'ALT en resposta a adaptacions metabòliques, particularment l'esteatosi hepàtica, o bé a l'alliberació d'ALT per part d'algun òrgan que ha patit danys. Per tant, actualment és necessari conèixer com es regula a nivell molecular l'expressió d'ALT i estudiar la implicació de la presència de les diferents isoformes ALT en teixits extrahepàtics.

2.2.6.6 Regulació transcripcional de l'expressió gènica

Els factors de transcripció són proteïnes d'unió al DNA (*trans-acting factors*) que s'uneixen a seqüències de DNA específiques (*cis-acting factors*) de l'element regulador d'un gen. Usualment, les regions de control poden trobar-se corrent amunt de l'inici de transcripció encara que en alguns casos la unió es dona a la regió codificant.

Els factors de transcripció, en unir-se a la seva seqüència diana en el DNA, interactuen amb la maquinària transcripcional i permeten la regulació i l'expressió gènica selectiva. Freqüentment aquest procés és governat per la unió de diferents proteïnes als seus llocs d'unió al DNA, per permetre el control de l'expressió gènica. Un nivell addicional de complexitat es dona mitjançant la interacció proteïna-proteïna entre els factors de transcripció i els coactivadors o corepressors. Juntament amb la maquinària transcripcional, aquestes proteïnes formen un complex multiproteic que permet la regulació de la síntesi de l'RNAm (Pabo i Sauer, 1992; Giordano i Avantaggiati, 1999; Klug, 1999; Wolberger, 1999; Goodman i Smolik, 2000).

Una transcripció gènica eficient requereix un entorn permissiu de la cromatina per permetre una interacció exitosa entre els factors de transcripció del complex multiproteic i les respectives dianes de DNA. Per tant, la modulació de l'estructura de la cromatina, amb els seus efectes en la transcripció gènica, representa un mecanisme clau per a la repressió de la transcripció, derepressió i activació transcripcional (Stein i col·l, 1999; Kornberg i Lorch, 1999).

2.2.6.7 Control transcripcional de l'ALT

Actualment són escassos els estudis sobre el control de l'expressió de l'ALT a nivell transcripcional. En dos estudis recents s'indica que el factor de transcripció KLF15X regula l'expressió d'ALT1 murí. Gray i col·l (2007) mostraren que en fetge de ratolins deficientes en KLF15X hi ha una reducció dels nivells d'RNAm d'ALT1, mentre que els nivells d'RNAm d'ALT2 no s'afecten ni en fetge ni en múscul, teixits on l'expressió d'ALT2 és elevada. De manera congruent, la sobreexpressió d'aquest factor en hepatòcits primaris en cultiu va promoure la inducció d'ALT1. En un estudi dut a terme per Takashima i col·l (2010) es mostra que la injecció d'un shRNA contra KLF15 (shKLF15) a ratolins control i diabètics db/db (ratolins homozigots per a una mutació en el gen del receptor de leptina) produeix una disminució significativa en els nivells d'RNAm de l'ALT1 hepàtic. No obstant, encara no hi cap estudi que indiqui si l'acció que exerceix KLF15 sobre el gen ALT1 és a través d'un efecte directe sobre el promotor d'aquest gen.

Thulin i col·l (2008) observaren que en tractar hepatòcits primaris humans amb l'agonista de PPAR α , àcid fenofíbric, s'incrementaven els nivells d'expressió d'ALT1 tant a nivell d'RNAm com de proteïna (que mostra un increment de 3.5 vegades respecte el control). Experiments de transfecció de cèl·lules Huh-7 amb els promotors humans ALT1 i ALT2 mostraren que el tractament amb els agonistes de PPAR α , àcid fenofíbric i l'AZD4619, induïen específicament l'activitat promotora ALT1 humana, mentre que el promotor d'ALT2 no es veia afectat. Així mateix, es va provar l'efecte d'altres agonistes de PPAR (clofibrat, agonista PPAR α ; rosiglitazona, agonista de PPAR γ i GW501516, agonista de PPAR δ) sobre el promotor d'ALT1 es va observar que exerceixen un efecte activador sobre l'activitat promotora basal. La transfecció de cèl·lules Huh-7 amb PPAR α i RXR α va induir l'activitat promotora ALT1 4 vegades, mentre que no s'observà efecte en el promotor ALT2. Els anàlisis d'EMSA mostraren la unió de l'heterodímer PPAR γ -RXR α al lloc d'unió -574 en el promotor proximal d'ALT1. Així mateix, mitjançant assajos de ChIP es va confirmar la unió de PPAR α i PPAR γ al lloc d'unió -574 en el promotor ALT1 (Thulin i col·l, 2008).

En un estudi dut a terme al nostre laboratori, es va clonar i caracteritzar el promotor del gen cALT d'*S. aurata* (Anemaet i col·l, 2010). Es va aïllar un fragment de 2235 pb adjacent a l'extrem 5' del gen cALT que, mitjançant experiments de transfecció transitòria en la línia cel·lular SBL (*Sea Bass Larvae*), va mostrar activitat promotora. Els primers 87 nucleòtids corrent amunt de l'inici de transcripció constituïen el nucli del promotor funcional. Addicionalment, assajos de transfecció transitòria en cèl·lules SBL, mutagènesi dirigida, delecions del promotor i experiments d'EMSA

demostraren que p300 participa en la transactivació del promotor cALT d'orada al formar part d'un complex proteic que s'uneix a l'element de resposta localitzat entre els nucleòtids -73 a -60 relatiu a l'inici de transcripció. Així mateix, es va observar que l'activitat histona acetiltransferasa de p300 és essencial per a l'activació transcripcional que p300 exerceix sobre el promotor de cALT. Per altra banda, el protooncogen cMyb també transactiva el promotor cALT d'orada mitjançant la unió a almenys un element de resposta localitzat entre els nucleòtids -89 a -12. Experiments de qRT-PCR utilitzant mostres hepàtiques de peixos sotmesos a diversos tractaments, indiquen que els nivells d'RNAm de p300 i cMyb incrementen en peixos en situació de dejú. La insulina promou una disminució significativa dels nivells d'RNAm de cMyb i p300. No obstant, el tractament amb STZ comporta un augment dels nivells de p300 mentre que els de cMyb disminueixen. Aquests resultats van portar a Anemaet i col·l (2010) a proposar que p300 i cMyb estarien involucrats en la sobreexpressió de cALT2 en fetge d'orades sotmeses a dejú i que p300 participaria en l'increment de l'expressió de cALT2 en peixos tractats amb STZ.

2.3 FACTOR NUCLEAR HEPATOCITARI 4

El factor nuclear hepatocitari 4 alfa (HNF4 α), és un factor de transcripció que pertany a la superfamília de receptors hormonals nuclears (Sladek i col·l, 1990). Aquest factor, és un important regulador de la fisiologia animal (Sladek i col·l, 1990; Sladek, 1993) i juga un paper clau en el desenvolupament i la diferenciació dels teixits on s'expressa (Chen i col·l, 1994; Watt i col·l, 2003). En mamífers adults, els nivells d'expressió d'HNF4 α són elevats en fetge, ronyó, intestí i pàncrees (Sladek i col·l, 1990; Miquerol i col·l, 1994; Taraviras i col·l, 1994).

2.3.1 ESTRUCTURA

HNF4 α és membre de la subfamília de factors 2A i és també conegut com a NR2A1 (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Aquesta subfamília inclou també el factor HNF4 β , fins ara només identificat en la granota, *Xenopus laevis* (Holewa i col·l, 1997), i HNF4 γ , present en humans (Drewes i col·l, 1996) i ratolí (Taraviras i col·l, 2000). Entre els dominis funcionals d'HNF4 α es troben una funció d'activació N-terminal (AF-1, també anomenada com a domini A/B) (Green i col·l, 1998), un domini d'unió al DNA (DBD), format per dos dits de zinc que consten de 4 cisteïnes cadascun (domini C), seguit d'una regió frontissa (H); un domini d'unió a lligand (LBD, domini E) i el domini F, d'uns 90 aminoàcids que es troba en la regió C-terminal (figura 7).

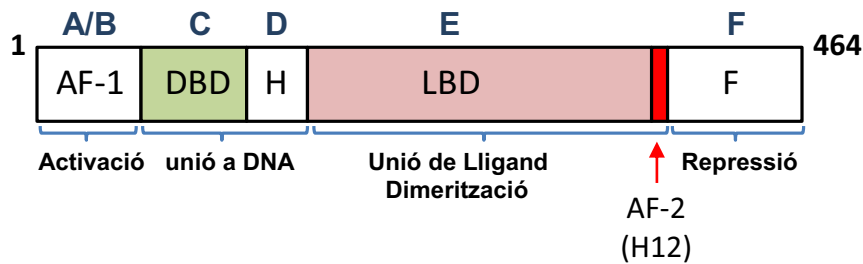


Figura 7. Estructura de dominis d'HNF4α.

A dalt s'exposen els dominis clàssics; a la part inferior s'indiquen les funcions. Es representen AF-1 (*activation factor 1* o factor d'activació 1), DBD (*DNA binding domain* o domini d'unió al DNA), H (regió frontissa), LBD (*ligand binding domain* o domini d'unió a lligand), AF-2 (*activation factor 2* o factor d'activació 2) i F (regió F).

El gen humà *HNF4α* abasta uns 74 kb en el cromosoma 20 i conté dos promotors, P1 i P2 que condueixen a l'expressió de diverses variants de processament alternatiu que generen isoformes que difereixen en els dominis A/B i F. S'han descrit nou isoformes diferents d'HNF4α en mamífers, anomenades HNF4α1 a α9 (Sladek i Seidel, 2001; Jiang i col·l, 2003; Eeckhoutte i col·l, 2003a; Huang i col·l, 2009). Aquestes isoformes exhibeixen diferents nivells d'activitat transactivacional i són expressades de manera específica temporal i espacial. Com es pot observar a la figura 8, el promotor P1 inicia els trànscripats que contenen l'exó 1A (isoformes α1 a α6), mentre que el promotor P2 inicia la formació dels trànscripats que contenen l'exó 1D (isoformes α7 a α9). Les isoformes α2 i α8 són els variants d'ensamblament alternatiu de les isoformes α1 i α7, respectivament. L'expressió de les isoformes α3 a α9 és més baixa, i és pràcticament nul·la o inexistent en el cas de les isoformes α4 a α6.

En les isoformes dirigides pel promotor P1 (HNF4α1/2), AF-1 pot activar la seva pròpia transcripció. La regió N-terminal de les isoformes originades a partir de P2 (HNF4α7/8) és més petita encara que sembla que no els hi manqui la funció AF-1. El domini F conté una funció repressora que en la isoforma HNF4α2 es troba alleujada per la inserció de 10 aminoàcids. La regió C-terminal conté una zona involucrada en la homodimerització, la funció activadora AF-2, així com una regió repressora curta. Com en altres receptors nuclears (NRs), el domini d'unió a lligand està format per 12 hèlixs α que formen una butxaca hidrofòbica. En bacteris, en expressar HNF4α, es va trobar una mescla d'àcids grassos que s'unien fortament a la butxaca d'unió del lligand (Wisely i col·l, 2002; Dhe-Paganon i col·l, 2002; Duda i col·l, 2004). En canvi, en l'HNF4α expressat en mamífers, tan sols es va trobar unit l'àcid gras essencial àcid linoleic (C18:2). La unió de l'àcid linoleic en la butxaca d'HNF4α és reversible, es troba unit en condicions d'alimentació i la seva unió es redueix dràsticament en

dejú. L'absència del lligand, no obstant, no sembla influir en la capacitat d'unió del factor al DNA (Yuan i col·l, 2009).

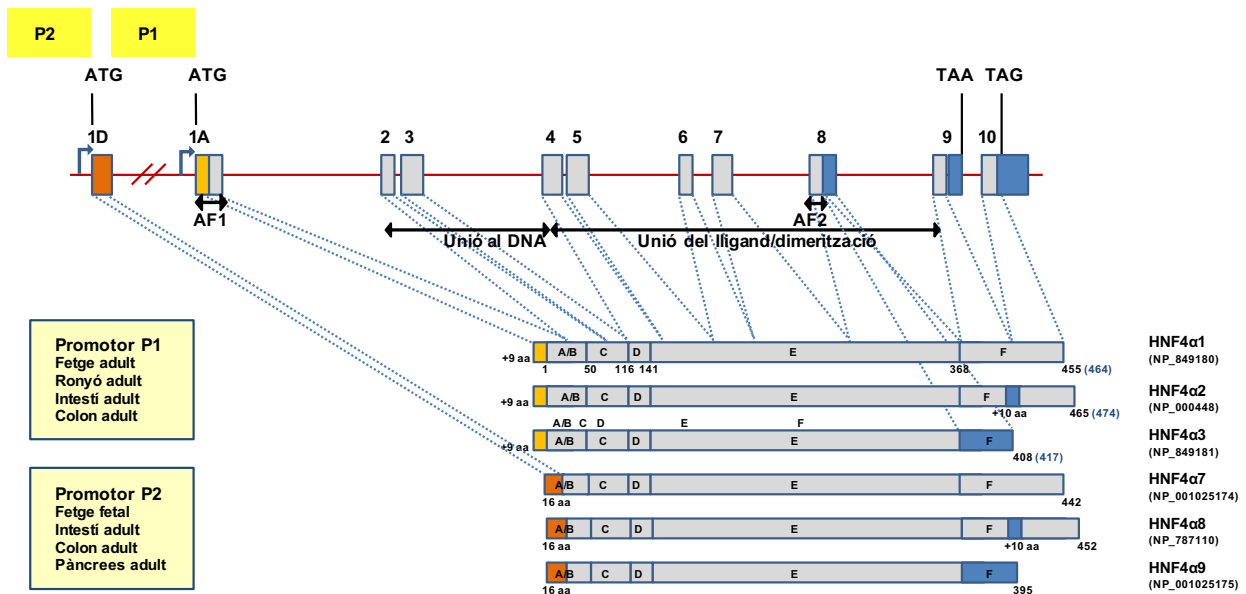


Figura 8. Estructura del gen *HNF4α* humà.

La numeració està basada en la seqüència aminoacídica original. Un lloc d'inici de traducció alternatiu conservat en el promotor P1 es mostra en blau. Les lletres es refereixen als dominis funcionals dels receptors nuclears. En els requadres s'indiquen els teixits principals on els promotors P1 i P2 són expressats; el ronyó fetal, intestí i estómac, així com l'endoderm visceral també expressen *HNF4α* encara que l'ús del promotor no ha estat establert. Es va proposar inicialment que els exons 1C i 1B (no mostrats) creaven una inserció en el domini A/B que donava lloc a les isoformes *HNF4α4/5/6*, encara que l'ús d'aquests exons en una proteïna sencera està en dubte.

L'expressió de les isoformes *HNF4α* varia amb el desenvolupament cel·lular, diferenciació i origen del teixit. Tots els trànscripats *HNF4α* en el ronyó i fetge adults deriven de P1; els trànscripats en el pàncrees adult, intestí prim i estómac deriven de P2 i altres parts de l'intestí utilitzen ambdós promotors. En fetge embrionari, els trànscripats derivats de P2 s'expressen de forma abundant; dos dies després del naixement els seus nivells d'expressió ja són baixos, i dues setmanes més tard són pràcticament indetectables. En el pàncrees en estat embrionari, es detectaren trànscripats derivats dels promotors P1 i P2. Per tant, en el pàncrees, el promotor P2 s'utilitza tant durant l'estat embrionari com en l'adult, mentre que el promotor P1 és d'ús exclusiu embrionari. *HNF4α1* s'expressa en fetge (hepatòcits), ronyó (túbuls proximals), intestí prim, còlon i pàncrees (cèl·lules β), essent els hepatòcits un dels tipus cel·lulars que més n'expressen (Sladek i col·l, 1990). *HNF4α2* és la isoforma predominant en el fetge adult i el ronyó; ambdós són dirigits pel promotor P1. *HNF4α7/8* no són presents en el fetge o ronyó adults però és la forma predominant en les cèl·lules β pancreàtiques.

També s'expressa en l'intestí prim i el còlon juntament amb HNF4 α 1/2. Hi ha estudis en què s'ha reportat la presència d'HNF4 α en l'estómac (Tanaka i col·l, 2006; Harries i col·l, 2008), en cèl·lules pancreàtiques diferents a les tipus β (Nammo i col·l, 2008), així com en l'epiteli mamari (Ishikawa i col·l, 2008) i el càncer d'ovari (Sugai i col·l, 2008), encara que el paper d'HNF4 α en aquests teixits no ha estat elucidat.

Recentment, s'han identificat 3 noves isoformes derivades del promotor P2, designades HNF4 α 10-12. Aquestes variants s'originen a partir de la inclusió de l'exó 1E a continuació de l'exó 1D i presenten així un extrem N-terminal diferent. Aquestes isoformes s'expressen en illes pancreàtiques i el fetge (Huang i col·l, 2009).

2.3.2 HNF4 α COM A FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ

HNF4 α regula l'expressió gènica a nivell transcripcional per interacció directa amb el promotor. Els gens diana potencials que presenten una seqüència *consensus* per a HNF4 s'expressen de forma predominant en hepatòcits (Sladek i Seidel, 2001). HNF4 α s'uneix al DNA només com a homodímer, a elements de resposta de repetició directa separats per un únic nucleòtid (DR1) essent la seqüència *consensus* AGGTCAGGGG(T/A)CA (Aranda i Pascual, 2001). A alguns dels llocs DR1 on s'uneix HNF4 α també es poden unir altres receptors nuclears (NRs), com ara COUP-TFs, RXR i PPARs. Conseqüentment, HNF4 α i els altres NRs regulen l'expressió de molts gens comuns. Per a aquells NRs que tendeixen a reprimir la transcripció (per exemple COUP-TFs), la competició pel mateix lloc d'unió origina una competició pel control del promotor (Ladias i col·l, 1992; Mietus-Snyder i col·l, 1992). HNF4 α fou considerat durant molt temps un receptor orfe ja que la identitat del seu lligand era desconeguda. Durant molt de temps es va mantenir la controvèrsia sobre la naturalesa del lligand d'unió a HNF4 α i si s'unia de forma reversible (Hertz i col·l, 1997; Bogan i col·l, 2000; Dhe-Paganon, 2002; Wisely i col·l, 2002). No obstant, un estudi recent indica que HNF4 α s'uneix a un únic àcid gras (àcid linoleic, C18:2) de forma reversible, i que l'apoHNF4 α existeix en condicions fisiològiques (Yuan i col·l, 2009).

Generalment, HNF4 α promou la transactivació dels gens diana. No obstant, HNF4 α també pot funcionar com a repressor de la transcripció. En són exemples la inhibició de l'HMG-CoA sintetasa mitocondrial (Rodríguez i col·l, 1998) i de l'acil-CoA oxidasa (Nishiyama i col·l, 1998), inhibició resultant de la competició del lloc d'unió per l'activador PPAR.

L'expressió i funció d'HNF4 α són regulades per interaccions amb diferents factors de transcripció, coreguladors, enzims modificants, etc.

Molts coactivadors (p300, CBP, SRC1, GRIP1), components mediadors, factors de transcripció generals (TFIIB, TBP, TAFs, PC4, ADA2) i activadors transcripcionals (Smad3/4) interactuen amb la regió AF-1 d'HNF4 α . El dit de zinc (Zn²⁺) més la regió frontissa (H) és suficient per a la unió al DNA malgrat el LBD proveeix els principals motius de dimerització en les hèlixs 9 i 10. L'AF-2 (hèlix 12) és imprescindible per a la transactivació i interacció amb varis coactivadors. Altres activadors transcripcionals (HNF1, p53, SHP, SREBPs, COUP-TFs, Sp1) i coreguladors (PGC1, p300, CBP, GRIP, SRC1, ACTR), així com el corepressor SMRT, també interactuen amb el domini LBD. El domini F reprimeix la transcripció però per sí mateixa no interacciona amb el corepressor SMRT (Yoshida i col·l, 1997; Wang i col·l, 1998; Sladek i Seidel, 2001; Malik i col·l, 2002; Ruse i col·l, 2002).

La proteïna HNF4 α és modificada covalentment de diferents maneres (figura 9). Aquestes modificacions tenen una varietat d'efectes en la funció de la proteïna HNF4 α , tals com alteració en la unió al DNA, dimerització proteica, transactivació i localització intracel·lular i/o combinacions d'aquestes. La modificació postraduccional més destacada és la fosforilació amb més d'una dotzena de Ser/Thr que poden resultar modificades (Jiang i col·l, 1997), encara que només uns quants d'aquests llocs han estat definitivament localitzats i assignats a quinases específiques: proteïna quinasa C (PKC) (Sun i col·l, 2007), proteïna quinasa activada per AMP (AMPK) (Hong i col·l, 2003), proteïna quinasa A (PKA) (Viollet i col·l, 1997) i la quinasa p38 (Guo i col·l, 2006). També s'ha indicat l'existència de la fosforilació en HNF4 α de tirosines (Ktistaki i col·l, 1995). En cèl·lules COS-7, la fosforilació en Ser/Thr d'HNF4 α incrementa l'afinitat i especificitat de la unió a DNA per alteració de la seva estructura terciària (Jiang i col·l, 1997). La fosforilació en Tyr d'HNF4 és necessària per a la unió al DNA, transactivació i localització subnuclear del factor en hepatòcits primaris de rata (Ktistaki i col·l, 1995).

Al contrari, la fosforilació depenent de PKA en el domini DBD inhibeix la unió al DNA en cèl·lules HepG2 i COS-1 (Viollet i col·l, 1997). Sun i col·l (2007) mostraren que PKA fosforila la Ser⁷⁸, localitzada al DBD, la qual cosa origina una menor transactivació i capacitat d'unió d'HNF4 al DNA, facilitant la seva degradació per via del proteasoma 26S i incrementant la localització citoplasmàtica del factor. En un altre treball, dut a terme per Hong i col·l (2003), es mostra que l'AMPK fosforila HNF4 α en la Ser³⁰⁴ i inhibeix la formació d'homodímers i la unió al DNA. La restricció proteica o el dejú disminueix la unió d'HNF4 α al DNA com a resultat d'una disminució de la fosforilació en Ser/Thr (Viollet i col·l,

1997). En presència d'estrès oxidatiu i IL-1 β la Ser¹⁵⁸ és fosforilada per la quinasa p38, incrementant la transactivació i la unió d'HNF4 α al DNA, augmentant així l'expressió d'iNOS en hepatòcits (Guo i col·l, 2006).

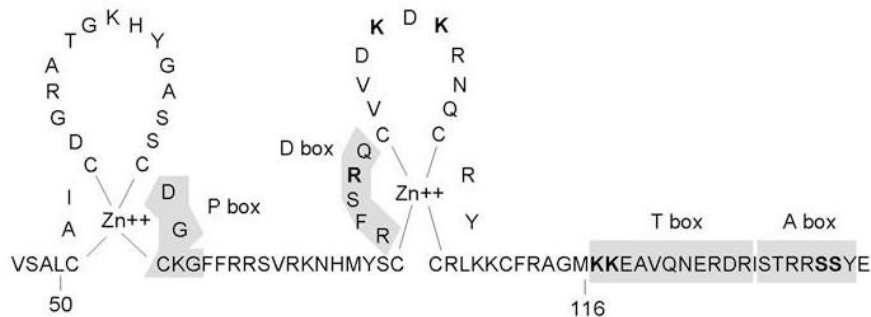


Figura 9. Mapa del DBD d'HNF4 mostrant els residus modificats per PRMT1, CBP i PKA.

Els residus marcats en negreta representen R (Arg): metilat per PRMT1, K (Lys): acetilat per CBP, S (Ser): fosforilat per PKA.

S'ha descrit que HNF4 α pot ser acetilat per CBP (Soutoglou i col·l, 2000) i metilat en arginines (Barrero i Malik, 2006). En aquest sentit, s'ha indicat que l'arginina metiltransferasa PRMT1 s'uneix directament a HNF4 i metila l'Arg⁹¹ del DBD, incrementant així l'afinitat d'HNF4 pel DNA. Posteriorment, PRMT1 és reclutada pel domini LBD d'HNF4 mitjançant un mecanisme en el qual SRC1 metila a la histona H4 en R3. Això, unit al reclutament de la histona acetiltransferasa p300, porta a alteracions nucleosomals i subseqüentment a la formació del complex de preiniciació de l'RNA polimerasa II i la transcripció de gens diana d'HNF4 (Barrero i Malik, 2006). CBP pot acetilar a HNF4, aquesta modificació es requereix per a la retenció nuclear d'HNF4, prevenint la seva exportació activa (via CRM1) al citoplasma, a més s'ha descrit també un increment en la unió d'HNF4 al DNA i en la interacció amb CBP (Soutoglou i col·l, 2000).

2.3.3 REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ D'HNF4 α

L'expressió d'HNF4 α es modula en resposta a diferents condicions hormonals i nutricionals. Experiments duts a terme per Marten i col·l (1996), mostraren que la restricció proteica en la dieta subministrada a rates (diètes amb un 4% de proteïna front al 20% de proteïna en diètes control) no afectava significativament els nivells d'RNAm ni de proteïna HNF4. No obstant, quan els extractes obtinguts a partir de l'experiment de deprivació proteica foren analitzats per EMSA, utilitzant com a sonda oligonucleòtids corresponents als gens humans d'apolipoproteïna CIII o α 1-antitripsina, es va observar una disminució d'un 40% en la unió d'HNF4 al DNA respecte els extractes proteics del grup control. L'anàlisi Scatchard va indicar que l'afinitat de la unió d'HNF4 al DNA no es modifica per la

deprivació de proteïna en la dieta. No obstant, el nombre de molècules d'HNF4 capaces d'unir-se al DNA va ser menor. Això indica que en rates sotmeses a restricció proteica, una part de la reserva de la proteïna HNF4 està inactivada o bé que s'impedeix la seva unió al DNA.

Diversos autors han observat que el dejú promou un increment en els nivells d'RNAm d'HNF4 α en fetge de ratolins (Yoon i col·l, 2001; Xie i col·l, 2009) i rates (Dietrich i col·l, 2007). No obstant, estudis similars realitzats en rata indicaren que els nivells d'RNAm i de proteïna d'HNF4 α en fetge no variaven després d'un dejú nocturn, respecte als de rates realimentades (Xu i col·l, 2006).

Seiichi i col·l (2000) examinaren la regulació hormonal per glucocorticoids, glucagó i insulina del gen d'HNF4 α en fetge de rata. La incubació d'hepatòcits de rata amb dexametasona (10^{-6} M) o glucagó ($3 \cdot 10^{-8}$ M) incrementaren els nivells d'RNAm d'HNF4 α , 5.3 i 3.5 vegades respectivament, a les 6 hores del tractament, efectes que foren antagonitzats per la insulina. En el fetge de rates en les que es va induir diabetis amb STZ (100 mg/Kg), els nivells d'RNAm i proteïna d'HNF4 α augmentaren dues vegades i els seus valors foren normalitzats pel tractament amb insulina. No obstant, Niehof i Borlak (2008) van observar que els nivells d'RNAm d'HNF4 α es trobaven significativament reduïts en fetge i ronyó de rates tractades amb STZ (60 mg/Kg). Xu i col·l (2006), per la seva banda, van veure que, malgrat els nivells d'RNAm d'HNF4 α en hepatòcits primaris de rata no canviaven en resposta a la incubació amb insulina, els nivells de proteïna incrementaven dues vegades a les 2 i 6 hores del tractament amb 10 nM d'insulina. Sugita i col·l (2008), mitjançant estudis de qRT-PCR, van observar que els nivells d'RNAm d'HNF4 α no variaven en rates tractades amb 80 mg/Kg d'STZ, respecte el grup control no tractat. Per altra banda, en tractar hepatòcits primaris de rata amb insulina, es va observar un decrement tant en els nivells d'RNAm com de proteïna HNF4 α en l'estudi dut a terme per Xie i col·l (2009).

2.3.4 FUNCIO

La família de factors de transcripció HNF4 està àmpliament conservada en els animals (Sladek i Seidel, 2001). Observacions en la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* (Zhong i col·l, 1993), i la granota, *Xenopus laevis* (Holewa i col·l, 1996, 1997), suggereixen que HNF4 juga un paper en el desenvolupament embrionari, ja que aquest factor de transcripció és un component de l'ou matern.

La disrupció del gen HNF4 en ratolins, resulta en un fenotip embrionari letal caracteritzat per un dèficit en la capacitat de l'endoderm visceral per diferenciar-se (Chen i col·l, 1994). S'han obtingut ratolins *knockouts* pel gen HNF4 α específics de fetge, còlon i cèl·lules β pancreàtiques. El *knockout*

d'HNF4 α específic de fetge indica que aquest factor es requereix durant la fase embrionària per al desenvolupament del fetge en el fetus (Parviz i col·l, 2003; Battle i col·l, 2006). En ratolins adults, el *knockout* específic per a HNF4 α de fetge indica que aquest factor és necessari pel manteniment del fenotip hepàtic, incloent l'homeòstasi lipídica (Hayhurst i col·l, 2001). Aquests ratolins presenten fetge gras i moren després de 6 setmanes. Així mateix, els *knockouts* específics d'intestí i còlon, tant en adults com en embrions, indiquen també que HNF4 α és necessari per al desenvolupament i funcionament adequat de l'intestí (Wendy i col·l, 2006; Babeu i col·l, 2009; Darsigny i col·l, 2009; Cattin i col·l, 2009). En aquest sentit, en humans amb la malaltia de Chron, així com en models experimentals de ratolins amb colitis, s'han reportat nivells baixos d'HNF4 α (Ahn i col·l, 2008; Darsigny i col·l, 2009). *Knockouts* d'HNF4 α en cèl·lules β en rates, mostren que HNF4 α és essencial per a la secreció d'insulina estimulada per glucosa en cèl·lules β pancreàtiques (Miura i col·l, 2006) i que HNF4 α exerceix el seu efecte activador sobre el gen de la insulina per unió directa al promotor (Bartoov-Shifman i col·l, 2002).

2.3.5 FUNCIO D'HNF4 α EN FETGE, RONYÓ I PÀNCREES.

Els factors de transcripció *liver-enriched* regulen el desenvolupament i manteniment de la funció i de l'arquitectura del **fetge**. Un d'aquests factors, HNF4 α , és un important element de la regulació de diversos gens hepàtics, incloent-hi aquells involucrats en el metabolisme dels àcids grassos, lipoproteïnes i lípids (apo A-I, apo A-II, apo C-II, apo C-III, i proteïna d'unio als àcids grassos, entre d'altres), metabolisme de la glucosa (aldolasa B, PEPCCK, PK, G6Pasa), enzims P-450 (CYP2A4, CYP7A1 i CYP2C9), metabolisme d'aminoàcids (tirosina aminotransferasa i ornitina transcarbamilasa), hematopoesi (transferrina), coagulació sanguínia (factors VII, VIII, IX i X) i diferenciació hepàtica (HNF1 α) (Sladek i Seidel, 2001).

HNF4 α està involucrat en la regulació d'enzims expressats pericentralment, com ara alguns gens citocrom P-450, incloent Cyp7 β , UDP-glucuroniltransferasa (Twisk i col·l, 1995; Conway i col·l, 1984), i apo E (Massimi i col·l, 1999); i en la regulació de gens expressats periportalment, com els enzims gluconeogènics PEPCCK (Christ i col·l, 1988) i G6Pasa (Massillon i col·l, 2003), i l'enzim del cicle de la urea ornitina carbamoiltransferasa (OTC; EC2.1.3.3) (Inoue i col·l, 2002). HNF4 α incrementa l'expressió de PEPCCK i altres gens periportals, com la G6Pasa, i inhibeix l'expressió de varis gens expressats pericentralment en les àrees periportals, com la GlnS, el receptor d'hormona tiroidea β 1 (TR β) i l'ornitina aminotransferasa (OAT; EC2.6.1.13). En el cas de la GlnS, s'ha trobat que és la

combinació d'HNF4 α amb HDAC1 la que promou la condensació de la cromatina i suprimeix així l'expressió de GlnS en la zona periportal (Stanulović i col·l, 2007).

La informació sobre la funció fisiològica d'HNF4 α en **ronyó** és escassa, encara que la seva expressió és elevada en algunes zones d'aquest òrgan. Basat en el perfil de l'expressió gènica observat en ronyó, s'ha reportat una abundant expressió en el túbul proximal i sinuós proximal, mentre que les altres seccions no mostren una expressió significativa (Chabardés-Garonne i col·l, 2003). Aquesta troballa s'ha confirmat a nivell de proteïna, on HNF4 α s'ha detectat en cèl·lules epitelials del túbul proximal, però es absent en el glomèrul, així com en les cèl·lules epitelials del túbul distal i col·lector (Jiang i col·l, 2003). Fins el 2005, en ronyó només havien estat identificats com a gens regulats per HNF4 α , el gen precursor de l' α -1-microglubulina/bijunina (AMPB) (Grewal i col·l, 2005) i l'aldolasa B (Gregori i col·l, 2002).

HNF4 α actua com a inhibidor de la proliferació cel·lular en diversos tipus cel·lulars, incloent-hi cèl·lules de carcinoma hepatocel·lular murí (Lazarevich i col·l, 2004), cèl·lules de carcinoma de pulmó endotelials i embrionals (Chiba i col·l, 2005), cèl·lules d'insulinoma (Erdmann i col·l, 2007) i cèl·lules embrionàries renals (Lucas i col·l, 2005). Aquesta propietat d'inhibir la proliferació cel·lular suggereix que HNF4 α deu tenir un efecte supressor de tumors. De fet, l'abundància i la capacitat d'unió de la proteïna HNF4 α al DNA es troba reduïda freqüentment en carcinoma de cèl·lules renals (RCC) humà respecte un teixit de ronyó normal (Sel i col·l, 1996). A més, el perfil d'expressió gènica va revelar que els nivells d'RNAm d'HNF4 α en cèl·lules canceroses són 4,7 vegades inferiors respecte els valors presents en teixit renal normal (Lenburg i col·l, 2003).

Varis estudis han analitzat la possibilitat de què una alteració en la funció d'HNF4 α pogués jugar un paper en el desenvolupament de tumors. Els primers estudis, només van identificar un limitat nombre de gens, incloent-hi VHL (Von Hippel-Lindau) i MET (protooncogen c-met), els quals juguen un paper clau en la iniciació i la progressió del carcinoma de cèl·lules renals (Linehan i Zbar, 2004). Lucas i col·l (2005) en un estudi posterior, en què pretenien identificar gens diana per a HNF4 α responsables de la inhibició de la proliferació cel·lular en cèl·lules renals, van sobreexpressar HNF4 α en cèl·lules HEK293 (cèl·lules que no expressen HNF4 α) per estudiar quins gens eren regulats per HNF4 α . Es va identificar una sèrie de 14 gens regulats per HNF4 α implicats en el control de la proliferació cel·lular en RCC mediada per HNF4 α (Grigo i col·l, 2008).

Recentment, Niehof i Borlak (2008), observaren que HNF4 α regula l'expressió del canal de calci TRPC 1, en fetge i ronyó. Ambdues proteïnes estan reprimides en ronyó de pacients diabètics

diagnosticats amb glomerulosclerosi nodular. HNF4 α i TRPC1 s'han proposat com a nous gens candidats responsables de la nefropatia diabètica, una malaltia progressiva de ronyó acompanyada de pèrdua de l'homeòstasi redox i angiopatia de capil·lars en el glomèrul i que produeix glomerulosclerosi nodular.

Pel que fa al **pàncrees**, estudis realitzats per Wang i col·l (2000), demostraren que la sobreexpressió d'HNF4 α en la línia cel·lular d'insulinoma de rata INS-1 origina un canvi en la secreció d'insulina estimulada per glucosa, mentre que un dominant negatiu d'HNF4 α (DN-HNF4 α) va atenuar selectivament l'alliberament d'insulina induïda per glucosa i leucina, però no per la despolarització de K⁺ (únicament va deteriorar l'alliberament d'insulina estimulat per nutrients). La inducció del DN-HNF4 α també va originar un funcionament defectuós del mitocondri per reducció de l'oxidació del piruvat [C¹⁴], una hiperpolarització de la membrana mitocondrial atenuada, i va disminuir la producció d'ATP cel·lular generada pels nutrients. L'avaluació dels nivells d'expressió de gens pancreàtics β regulats per HNF4 α , revelaren que alteren els nivells de missatger d'insulina, GLUT-2, L-PK, aldolasa B i la subunitat E1 de la 2-oxoglutarat deshidrogenasa I i de la proteïna desacobladora mitocondrial-2, així com els nivells d'HNF1 α .

2.3.6 ALTRES CONSIDERACIONS

És d'interès constatar que molts dels gens diana descrits per a HNF4 α porten a terme aparentment funcions oposades en l'organisme, com ara factors coagulants i anticoagulants de la sang, PEPCK, enzim clau en el control de la gluconeogènesi i L-PK, enzim clau en la glicòlisi, ApoB, proteïna component de les LDL, i ApoAI, proteïna component de les HDL. El com i quan HNF4 α controla aquests processos oposats en les cèl·lules continua sent una àrea important d'investigació. Com a possibles explicacions, s'ha proposat que la fosforilació, metilació i acetilació del factor de transcripció pot jugar un paper important tant per a la unió al DNA, com en la localització subcel·lular i en l'estabilitat proteica. Una altra possible explicació és que les diferents isoformes puguin tenir diferents efectes en els gens. En aquest sentit, en un estudi realitzat per Torres-Padilla i col·l (2001) van determinar que HNF4 α 7 activa el promotor de l' α -fetoproteïna i transtiretina més eficientment que HNF4 α 1, i que HNF4 α 1 transactiva més eficientment el promotor d'apoCIII que no pas HNF4 α 7. Finalment, no podem oblidar que HNF4 α interacciona amb diferents corepressors i coactivadors que poden modular l'efecte d'HNF4 α sobre diferents gens diana. Un exemple clar és l'estudi realitzat per Hirota i col·l (2008) en què van observar que FOXO1 reprimeix la transcripció de GK potenciada per HNF4, mentre que exerceix un efecte sinèrgic amb HNF4 en la transcripció del gen G6Pasa. En

absència d'insulina (dejú), FOXO1 es troba al nucli on reprimeix l'activació transcripcional de la GK per HNF4, actuant com a corepressor. Simultàniament, FOXO1 unit al DNA (mitjançant l'IRS) i HNF4 sinèrgicament activen el promotor del gen G6Pasa, presumiblement per interacció amb CBP i PGC1 α . Quan les cèl·lules són estimulades per insulina (alimentació), FOXO1 és fosforilat i exclòs del nucli, permetent la dissociació d'HNF4. En concordança, HNF4 pot activar el promotor GK mitjançant l'element d'unió a HNF4 (HBE), mentre que el gen G6Pasa resulta lleugerament activat per HNF4 en absència d'altres factors de transcripció. FOXO1 inhibiria doncs la transactivació originada per HNF4 en promotors que no contenen un IRS adjacent (per exemple el del promotor de la GK) i tindria un efecte sinèrgic amb HNF4 per activació de promotors que continguin llocs d'unió per a HNF4 i FOXO1 (per exemple el del promotor de la G6Pasa). És més, aquests autors indiquen que el promotor PEPCK conté ambdós llocs d'unió i que FOXO1 també exerceix una activació sinèrgica amb HNF4 en el promotor PEPCK.

Altres estudis indiquen que la interacció d'HNF4 α amb PGC1 α juga un paper molt important en la transactivació de promotors de gens que incrementen la seva expressió en situacions gluconeogèniques, com ara PEPCK, G6Pasa i L-CPT1, i que HNF4 α és imprescindible per a l'activació d'aquests gens en resposta a AMPc (Nitsh i col·l, 1993; Louet i col·l, 2002; Gautier-Stein i col·l, 2005). També s'ha descrit a CREB com a un factor de transcripció involucrat en aquesta resposta a AMPc (Louet i col·l, 2002). Yamamoto i col·l (2004) han indicat que SREBP1a/c inhibeixen l'activitat promotora del gen PEPCK induïda per HNF4 α mitjançant la interacció de SREBP amb la proteïna HNF4 α , donant lloc a una deficiència en el reclutament de PGC1. De fet, en ratolins transgènics que sobreexpressen SREBP1a i 1c, els nivells d'RNAm de PEPCK i G6Pasa es troben disminuïts. L'expressió de SREBP1c és fortament induïda en condicions d'alimentació. En canvi, en gens que incrementen la seva expressió en condicions d'alimentació, com ara GK, L-PK, l'aldehid deshidrogenasa 2 (ALDH2; EC1.2.1.3), i CYP7A1, s'ha observat que l'AMPc disminueix l'activació transcripcional induïda per HNF4 α (Gourdon i col·l, 1999; Song i Chiang, 2006). L'AMPc disminueix la capacitat d'unió d'HNF4 α al promotor de l'ALDH2 i els factors de transcripció COUP-TFs o PPAR γ antagonitzen els efectes d'HNF4 α . En el cas de la GK, en hepatòcits primaris de rata la insulina incrementa l'expressió del gen via PI3K/PKB; HIF-1, HNF4 α i p300 funcionen cooperativament per incrementar-ne l'activitat promotora (Roth i col·l, 2004). El promotor de l'L-PK resulta activat per ChREBP, HNF4 α i CBP i aquests factors són igualment importants per a l'activació completa del gen L-PK per glucosa. La repressió de l'expressió de GK mitjançada per AMPc implica el desacoblament del complex proteic format per aquests factors, efecte que pot ser contrarestat a l'incrementar CBP (Burke i col·l, 2009).

2.3.7 MALALTIES ASSOCIADES

Dels estudis comentats en relació amb HNF4 α , és evident que aquest factor juga un paper important en diverses funcions de l'organisme i per tant, mutacions en HNF4 α o bé en llocs d'unió de gens diana d'aquest factor de transcripció poden contribuir al desenvolupament d'algunes patologies.

S'han identificat tres gens humans que contenen mutacions espontànies en el lloc d'unió a HNF4 amb efecte patològic. Mutacions del lloc d'unió per a HNF4 en el promotor dels gens que codifiquen per factors involucrats en la coagulació sanguínia (factors VII i IX), causen hemofília (Reijnen i col·l, 1992; Sladek i Seidel, 2001). El tercer gen és el factor de transcripció HNF1 α , on una mutació en el lloc d'unió per a HNF4 en el seu promotor, genera MODY3 (*Maturity-Onset Diabetes of the Young 3*) (Gragoli i col·l, 1997). HNF4 α regula l'expressió de molts dels gens que codifiquen per a apolipoproteïnes en el fetge i deu, per tant, tenir un paper en l'aterosclerosi. Altres malalties que s'han relacionat amb polimorfismes d'HNF4 α són la diabetis tipus 2 (Miura i col·l, 2006), el síndrome metabòlic (Weissglas-Volkov i col·l, 2006), l'alteració en la capacitat de metabolitzar fàrmacs (recordem que HNF4 α regula l'expressió de molts gens citocrom P450 i enzims de fase II, implicats en el metabolisme de fàrmacs) (Worthman i col·l, 2007; González, 2008) i el càncer (Tanaka i col·l, 2006; Oshima i col·l, 2007; Sugai i col·l, 2008).

Mutacions en el promotor i la regió codificant del gen humà HNF4 α origina la *Maturity-Onset Diabetes of the Young 1* (MODY1), una forma de diabetis de tipus 2 que desenvolupen pacients d'edats compreses entre els 20 a 40 anys (Yamagata i col·l, 1996; Ellard i Colclough, 2006; Anuradha i col·l, 2010). Aquesta diabetis es manifesta clínicament per una secreció d'insulina defectiva per part de les cèl·lules β -pancreàtiques, donant lloc a un fenotip d'hiperglucèmia hipoinsulinèmica. L'edat a la qual la diabetis és diagnosticada i la penetrància lligada a l'edat, depenen de la posició de la mutació respecte a l'estructura de la isoforma. El lloc de la mutació determinarà el nombre d'isoformes que resulten afectades. Així, mutacions en el promotor P2 o a l'exó 1D només afectarien a les isoformes derivades de P2, deixant sense afectació a les isoformes derivades del promotor P1. No s'han trobat mutacions homozigòtiques per a HNF4 α en humans, congruent amb la letalitat embrionària en ratolins (Chen i col·l, 1994).

2.3.8 HNF4 α EN PEIXOS

En peixos, actualment hi ha molt poca informació sobre gens que siguin regulats per HNF4 α . En un estudi realitzat al nostre grup, vam observar que HNF4 α induïa la transcripció de la G6Pasa en fetge d'orada i que aquesta activació transcripcional és potenciada sinèrgicament per la presència del coactivador PGC1 α , de manera similar a com ocorre en mamífers (Salgado i col·l, 2004).

En estudis duts a terme en salmó atlàntic, es va reportar que HNF4, juntament amb COUP-TFI i COUP-TFII activen el promotor del factor de transcripció HNF1 (Deryckere i col·l, 1996; McNair i col·l, 2000).

3. MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 ANIMALS UTILITZATS EN L'EXPERIMENTACIÓ

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat mostres biològiques procedents de juvenils d'orades (*Sparus aurata*). L'orada és un peix teleosti que pertany a la família *Sparidae*, de l'ordre dels Perciformes. El cos de l'orada té forma oval, es caracteritza per la presència d'una franja daurada situada entre els ulls i una taca fosca sobre l'opercle. Pot arribar a pesar més de 5 Kg, i a mesurar 70 cm de llargada.

L'orada és pròpia de les aigües càlides del Mediterrani. S'estén també pel Mar Negre, el Mar Roig i les costes orientals de l'Atlàntic, des de les illes britàniques fins al Senegal.

És una espècie litoral, euriterma (tolera temperatures de 5-35 °C) i eurihalina (capaç de créixer en diferents condicions de salinitat) constituïda per individus generalment solitaris o que formen grups reduïts, malgrat que quan són joves poden reunir-se en grups més nombrosos. Es troben a una fondària que oscil·la entre els 30 i 150 m. La seva dieta natural és preferentment carnívora, i consisteix bàsicament en la ingesta de proteïnes procedents de mol·luscs, crustacis i peixos petits.

Les orades constitueixen una espècie hermafrodita proteràndrica, no es diferencia sexualment fins al primer any de vida; posteriorment, es comporten com a mascles durant 2-3 anys i es diferencien finalment de manera definitiva a femelles.

L'aqüicultura ha experimentat un gran increment, passant de menys d'un milió de tones a mitjans del segle XX, a 55.1 milions de tones al 2008, el que suposa un 46% del peix i marisc capturat o produït pel consum humà en àmbit mundial (FAO, 2010). L'orada presenta un creixent interès comercial degut a la millora del seu cultiu. És molt apreciada en les regions europees del Mediterrani, fet pel qual la pesca i el cultiu d'aquesta espècie té una gran importància econòmica en aquesta zona.

3.1.1 MANIPULACIÓ DELS ANIMALS I PRESA DE MOSTRES

En el procés de manipulació, s'han seguit unes pautes concretes per evitar l'estrès i situacions d'anòxia dels animals que podrien incidir en el resultat dels experiments a realitzar.

Les orades utilitzades en l'experimentació descrita en aquesta memòria procedien del centre de Tina Menor SA, a Santander i de Piscimar (Andromeda group), a Burriana, Castelló. En el laboratori, les orades es mantingueren en aigua de mar airejada i filtrada en circuit tancat, a 20 °C, en aquaris de 260 litres de capacitat equipats amb llums ultraviolats, i fotoperíode de 12 hores de llum/fosc. Les orades amb un pes inicial d'aproximadament 2-5 g, es van alimentar amb la dieta MICROBAQ 15 (Dibaq-Diproteg, S. A, Segovia.; taula 1) al 5 % del pes corporal dues vegades al dia. Les orades de 10-20 g foren alimentades una vegada al dia amb quantitats de dieta corresponents al 2% del pes mitjà dels peixos de cada aquari un cop al dia. Els peixos es pesaven cada setmana per tal d'ajustar periòdicament la quantitat i tipus de dieta adequada a l'experiment a realitzar.

Totes les manipulacions realitzades s'han dut a terme segons les normes del Comitè Ètic d'Experimentació amb Animals de la Universitat de Barcelona.

PROTOCOL DE PRESA DE MOSTRES:

A) Preliminars

1. Preparar un aquari amb aigua de mar i de capacitat adequada a la mida i número de peixos a sacrificar, proveït d'airejador. Dissoldre-hi l'agent anestesiant MS-222 (metanosulfonat de tricaina) en una proporció de 70 mg/L (p/v).
2. Introduir les orades immediatament en l'aquari amb anestèsic.
3. Esperar fins que els peixos estiguin sedats (5-10 minuts).
4. Peser cada orada. Procedir al sacrifici i presa de mostres.

B) Sacrifici i presa de mostres

1. Sacrificar l'orada amb un tall cervical.
2. Obtenir-ne la sang amb una pipeta *Pasteur* de vidre prèviament tractada amb solució de citrat sòdic al 3%.
3. Obrir el peix ventralment i extreure'n el fetge. Per eliminar les restes de sang o bilis, es renta el teixit submergint-lo en solució de NaCl al 0,9%. Es congela immediatament per la tècnica de *freeze clamping*, amb pinces prèviament refredades en nitrogen líquid. El fetge es manté a -80 °C fins que és utilitzat.
4. Per a l'extracció d'altres òrgans es du a terme el mateix procediment que l'efectuat en el cas del fetge.
5. La sang obtinguda es deixa coagular a temperatura ambient un màxim de 30 minuts, després se centrifuga a 6000 g a 4 °C, durant 10 minuts. Es retira el sobrenedant (sèrum) i es manté congelat a -20 °C fins a ser utilitzat.

Taula 1. Composició en percentatge de la dieta MICROBAQ 15

Ingredients	
Carn de peix	58.1
Oli de peix	13.5
Blat de moro	12.5
Proteïna d'arròs	6
Concentració soluble de peix	5
Proteïna de soia	2.2
Midó de blat de moro	1
Composició nutricional	
Proteïnes	46
Lípids	22
Carbohidrats	9.3
Minerals	10.6
Humitat	12.1

* Calculada a partir de la composició bruta.

La mescla vitamínica proveïda per Kg de dieta fou: vitamina A 13000 UI, vitamina D3 2210 UI, vitamina E (alfa tocoferol) 260 mg. L'energia bruta de la dieta és de 21.1 kJ/g.

3.1.2 EFECTE DE L'ESTAT NUTRICIONAL. DISTRIBUCIÓ TISSULAR

Les orades foren distribuïdes en aquaris. Els peixos es van alimentar previ a l'inici de l'experiment durant al menys 18 dies a les 10 del matí amb una única ració diària de dieta al 2.5 %. A continuació, se sotmeteren a un període de dejuni de 19 dies i finalment, es van realimentar durant 8 dies. Es van recollir el sèrum i mostres hepàtiques després dels 18 dies inicials d'alimentació, als 19 dies de dejuni i després de 6 hores, 1 dia i 8 dies de la realimentació. Es va recollir sang i diversos teixits de peixos alimentats i deprés de 19 dies de dejuni, per

posteriorment realitzar l'anàlisi de la distribució tissular (fetge, intestí, ronyó, cervell, melsa, múscul esquelètic, brànquies, teixit adipós i cor).

3.1.3 EFECTE DE L'ALIMENTACIÓ

Les orades foren distribuïdes en 4 aquaris. Les orades van ser alimentades diàriament a les 9 del matí al 2% del pes corporal durant 26 dies. Part de les orades se sacrificaren al dia següent abans de ser alimentades (temps 0, preprandial), la resta varen ser alimentades i sacrificades a les 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 i 24 hores postprandials en grups d'uns 6 individus. Es va recollir la sang i el fetge.

3.1.4 ADMINISTRACIÓ D'INSULINA I ESTREPTOZOTOCINA

Les orades foren distribuïdes en 3 aquaris. Els peixos foren alimentats un cop al dia (10:00 h) a l'1% del pes corporal. Els peixos d'un dels aquaris van ser injectats intraperitonealment amb una solució d'STZ (Sigma) (600 mg/kg peix) i van ser sacrificats a les 30 hores després del tractament. A les 24 hores després d'haver administrat STZ a un dels aquaris, l'aquari del grup control va rebre tractament amb el vehicle (solució salina 0.9%) i van ser sacrificats a les 6h. Els peixos d'un altre aquari van ser injectats amb 10U/kg d'insulina bovina (Sigma) i es van sacrificar 6h després. Es va recollir la sang i diversos teixits.

SOLUCIONS:

Insulina: (bovina, Sigma, 27 U/mg)

Es prepara una solució de 0,1 mg d'insulina/mL (2,7 U/mL) en HCl 5 mM pH 4,5 (preparat en solució salina al 0,9%). S'injecten 3,7 µL de la solució/gram de peix.

STZ (Sigma)

Es prepara una solució de 200 mg d'STZ/mL en citrat sòdic 10 mM pH 4,5. S'injecten 3 µL de la solució/gram de peix. Filtrada per esterilització.

3.2 OLIGONUCLEÒTIDS

Encebador:	Seqüència (5' a 3'): *Les dianes de restricció es troben subratllades	Hibrida a: Diana restric:
mALT <i>S. aurata</i>		
Aïllament promotor mALT:		
MC01	GACAGCAGCTGCATCCTTG TAGCCGAC	+101/ +126
MC02	CACGGCGAGTTGGGTGACTTTTAAAGCCTC	+63/+92
MC03	CTAGTAGTCTGTCGATGGTTGGGGTCAG	-724/-697
MC04	GGGGTCAGACCTGAATACACTACAGGAC	-744/-717
MC05S4	GCCTGACTGCAGCTCCACTGAAG	-535/-513
Preparació constructes reporters:		
MC05S3	GACGCGTAAATTATAAAACAGTTTA	-1540/1523 <i>MluI</i>
MC05	GGAAGCTTCACGGCGAGTTGGGTGAC	+75/+92 <i>HindIII</i>
MC06	GGACGCGTAAAAGTCTTTCAAATATCTG	-820/-801 <i>MluI</i>
MC07	GGACGCGTCCCACTTTTATTCGGAG	-103/-96 <i>MluI</i>
MC08	GGACGCGTGGTCTGAGTCATTTTATG	-49/-29 <i>MluI</i>

MC09	GGCACGTGCGTGTGTGGATGCGAGCAGGGTCTGAAGAGACGCTCTGAGAATTTGTGGTCTG AGTCAGTATTTTTAG	-150/-104; -49/-29 <i>Pmacl</i>
MC10	GGACGCGTCCCACTTTTTATTTCGGAGCCCCGTTAGCTCTTCCCCGCTCTGAGCGGTCCACAC GTCTGAGTCAGTATTTTTAG	-103/-29 <i>MluI</i>
qRT-PCR:		
MC13	CCAGGGTCCGCTCACTGAT	+195/+214
MC14	GTCGCGCTCACACTCGATAA	+271/+291
EMSA:		
mALT-66/-37	GCTCTGAGCGGTCCAAAGGTCTGAGTCAGC	-66/-37
mALT-66/-37 mut	GCTCTGAGCGGTCCACACGTCTGAGTCAGC	-66/-37
RT-PCR semiquantitatiu:		
IMAL28	GAGTCCACTCCTGTGAGT	+1/+21
IMAL29	CTTCTCTTTGGGAGCCCCG	+296/+277
Clonatge del cDNA d'mALT en pYES2:		
YM1	GGAAAGCTTAAAAATGTCTGCTACAAGGATGCAGCTGCTG	<i>HindIII</i>
IMAL24	GAGGATCCATTTAAGAATACTGCTGAGTGAAC	<i>BamHI</i>
GlnS <i>S. aurata</i>		
Clonatge d'un fragment de cDNA de Gln sintetasa d'orada en pGEM-T <i>Easy</i> :		
MCGSF	GAGGGGTCCAACAGTGACATG	
MCGSR	CCAACACCACAGTAATATGGACC	
qRT-PCR:		
MC201	GATTCCTGCTGCCATGTTCCGC	
MC202	GGTGTACTCTGCTCCATGCCG	
AST2 <i>S. aurata</i>		
Clonatge d'un fragment de cDNA de AST2 d'orada en pGEM-T <i>Easy</i> :		
MCAST2F	GCAAGCTCATGGTGGACTGAGG	
MCAST2R	GTTTGAGCCCAGTGAAGCAGAAC	
qRT-PCR:		
MC203	GAGGAGGTCCACGGTATGGC	
MC204	ATGCTGCCAGTTGTGAGTGGAG	
GDH <i>S. aurata</i>		
Clonatge d'un fragment de cDNA de GDH d'orada en pGEM-T <i>Easy</i> :		
MCGLUDF	CAATGCCCATGCCTGTGTGACGG	
MCGLUDR	GGTGGTAGTTGGAGTCCCTCT	
qRT-PCR:		
MC205	GGTATCCACGGTCGTATCTCAGCC	
MC206	GAGACCCACATTACCAAAGCCCTG	
HNF4α <i>S. aurata</i>		
qRT-PCR:		
MC15	TTCTGAGCTGGAGGCAGTAGGC	+1289/+1310
MC16	GCCGATTCATAATGGTCAAATC	+1238/+1259
Clonatge del cDNA de HNF4α d'orada en pcDNA3:		
MC21	GAAGCTTGCCGCATGGACATGGCAGACTACAGCG	+39/+60 <i>HindIII</i>
MC22	GGGATCCTTAGATGGCCTCTTGCTTTGTAATAG	+1378/+1403 <i>BamHI</i>
SMART RACE:		
MC23	CTGGACCTCCTGGTCTGATTCTGTCTC	+439/+412
MC24	CTGCACGGCTTCTTTCTTCATGCC	+404/+381
MC25	CAGCCGGTGAGGAGTCTGTGCCAGTG	+141/+115
MC26	GGGTCCAGAGCCTCGCTGTAGTCTGCC	+73/+47
MC27	GTGTCCAACAACATGCCAACGCCG	+1218/+1241
MC28	CCCGATCCCGTCTCCGCCTACTGCC	+1274/+1298
Clonatge cDNA complet HNF4α:		
MC29	GGTAGTTGAGAATTTGTTTGTCCAAAGCG	+1/+29
MC30	TTATAAAAATAGACCTTGAGATTTATTAATTCATC	+2320/+2286
β-actina <i>S. aurata</i>		
RT-PCR semiquantitatiu:		
BA0199	GACAACGGATCCGGTATGTGC	+31/+51

BA0299	GACCTGTCCGTCGGGCAGCTC	+741/+721
Proteïna ribosomal 18S <i>S. aurata</i>		
qRT-PCR:		
RT18S	TTACGCCCATGTTGTCCTGAG	
RT18SAS	AGGATTCTGCATGATGGTCACC	
Oligonucleòtids proveïts per kits comercials		
Encebador:	Seqüència (5' a 3'):	Kit/ casa comercial:
<i>Outer adaptor primer</i> (AP1)	GTAATACGACTCACTATAGGGC	<i>Universal GenomeWalker</i> , Clontech)
<i>Nested adaptor primer</i> (AP2)	ACTATAGGGCACGCGTGGT	<i>Universal GenomeWalker</i> , Clontech)
5'-RACE CDS	(T)25N-1N	<i>SMART RACE 5' cDNA Amplification Kit</i> , Clontech
SMART II A <i>Oligonucleotide</i>	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	<i>SMART RACE 5' cDNA Amplification Kit</i> , Clontech
Universal Primer Mix A (UPM) 10X	Llarg (0.4 µM): CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCAGAGT Curt (2µM): CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	<i>SMART RACE 5' cDNA Amplification Kit</i> , Clontech
<i>Nested Universal Primer</i> (NUP; 10 µM)		<i>SMART RACE 5' cDNA Amplification Kit</i> , Clontech
Oligonucleòtids de vectors		
Encebador:	Seqüència (5' a 3'):	Hibrida a:
GLP2	CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA	pGL3- <i>Basic</i>
RVP3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	pGL3- <i>Basic</i>
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pGEM-T <i>Easy</i> i pcDNA ₃
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	pGEM-T <i>Easy</i> i pcDNA ₃
pYESF	CCTCTATACTTTAACGTCAAGGAG	pYES2
pYESR	GGGGAGGGCGTGAATGTAAG	pYES2
Altres		
Encebador:	Seqüència (5' a 3'):	Font:
EMSA, seqüència <i>consensus</i> : HNF4α-cons	GGAGCTGGTCAAAGGTCACCTGCAGCT	Promotor ApoCIII de rata

Taula 2. Oligonucleòtids utilitzats a l'estudi. S'indica la regió del cDNA o DNA genòmic on hibriden els oligonucleòtids indicats

3.3 PLASMIDIS

Plasmidis d'expressió en eucariotes

pcDNA₃: vector d'expressió eucariota *in vitro* i *in vivo*. Utilitzat per a la transcripció-traducció *in vitro* de proteïnes sota la influència del promotor T7 (Invitrogen).

pYES2: vector que permet l'expressió de proteïnes recombinants en *Saccharomyces cerevisiae* induïble per galactosa. Conté el gen de selecció URA3 que confereix prototrofia per a uracil (Invitrogen).

pcDNA3-HNF4α_{rata}: plasmidi que expressa el factor de transcripció HNF4α de rata. Cedit pel Dr. M. D. Walker (Weizmann Institute of Science, Israel)

pcDNA3-HNF4α_{orada}: plasmidi que expressa HNF4α d'orada. El cDNA codificant per a HNF4α d'orada va ser obtingut per PCR utilitzant com a encebadors MC21/MC22 i com a DNA motlle el cDNA de fetge d'orada. El fragment obtingut, digerit amb *HindIII* i *BamHI*, va ser posteriorment clonat en pcDNA3 digerit prèviament amb els mateixos enzims.

Vectors reporters

pGL3-Basic: vector mancat de promotor eucariòtic i seqüències *enhancer*. Permet l'estudi de regions promotores de gens mitjançant el control de l'expressió del gen reporter luciferasa (Promega).

pCMV β : plasmidi utilitzat com a control d'eficiència en les transfeccions realitzades en cèl·lules en cultiu, aquest plasmidi expressa β -galactosidasa en cèl·lules eucariotes.

pGm1540: El constructe pGmALT1540, amb la seqüència promotora localitzada entre les posicions -1540 a +92 relatives a l'inici de transcripció del promotor del gen *mALT* d'*S. aurata*, va ser generat per restricció enzimàtica. El constructe pGm820 es va tallar amb els enzims *Pst*I i *Mlu*I i es va lligar el fragment resultant de la digestió de pGEM-mALT846 amb els mateixos enzims.

pGm820: El constructe pGmALT820 (-820 a + 92) es va generar per PCR utilitzant com a encebadors MC06/MC05 i pGEM-mALT820 com a DNA motlle. El fragment resultant va ser digerit amb *Mlu*I/ *Hind*III i lligat en pGL3-Basic digerit prèviament amb els mateixos enzims.

pGm512: El constructe pGmALT512 (-512 a + 92) es va obtenir per restricció enzimàtica de pGmALT1540 amb els enzims *Mlu*I/*Pst*I, seguit de reaccions de *chew back*, *fill-in* i autolligació del constructe.

pGmALT325: El constructe pGmALT325 (-325 a + 92) es va obtenir per restricció enzimàtica de pGmALT820 amb els enzims *Mlu*I/*Bst*EII, seguit de reaccions de *fill-in* i autolligació del vector.

pGmALT153: El constructe pGmALT153 (-153 a + 92) es va obtenir per restricció enzimàtica de pGmALT820 amb els enzims *Mlu*I/*Pma*I, seguit de reaccions de *fill-in* i autolligació del vector.

pGmALT103: El constructe pGmALT103 (-103 a + 92) es va generar per PCR utilitzant com a encebadors MC07/MC05. El fragment resultant va ser digerit amb *Mlu*I/ *Hind*III i lligat en pGL3-Basic, tallat prèviament amb els mateixos enzims.

pGmALT49: El constructe pGmALT49 (-49 a + 92) es va generar per PCR utilitzant com a encebadors MC08/MC05. El fragment resultant va ser digerit amb *Mlu*I/ *Hind*III i lligat en pGL3-Basic, tallat prèviament amb els mateixos enzims.

pGmALT+62: El constructe pGmALT+62 (+62 a + 92) es va obtenir per restricció enzimàtica de pGmALT820 amb els enzims *Mlu*I/*Sac*II, seguit de reaccions de *chew back*, *fill-in* i autolligació del vector.

pGmALT1540mut: El constructe pGmALT1540mut (-1540 a + 92; contenint un element de resposta a HNF4 α mutat) es va generar per PCR utilitzant com a encebadors MC10/MC05. El fragment resultant va ser digerit amb *Esp*3I/ *Hind*III i lligat en pGmALT1540, tallat prèviament amb els mateixos enzims.

pGmALT1540 Δ 103-49: El constructe pGmALT1540 Δ 103-49 (-1540 a + 92; amb deleció dels nucleòtids -103 a -49) es va generar per PCR utilitzant com a encebadors MC09/MC05. El fragment resultant va ser digerit amb *Mlu*I/ *Hind*III i lligat en pGL3-Basic, tallat prèviament amb els mateixos enzims.

Altres

pGEM-T Easy: vector de tipus T que facilita la lligació de fragments de DNA obtinguts mitjançant amplificació per PCR (Promega).

pGEM-mALT820: El constructe pGEM-mALT820 va ser obtingut en la primera ronda de recorregut cromosòmic després de la lligació del fragment de PCR de 820 pb aïllat a partir de la llibreria genòmica d'*S. aurata* obtinguda amb *Stul*. El fragment va ser purificat i lligat al vector pGEM-T Easy.

pGEM-mALT824: El constructe pGEM-mALT824 va ser obtingut en la segona ronda de recorregut cromosòmic després de la lligació del fragment de PCR de 824 pb aïllat a partir de la llibreria genòmica d'*S. aurata* obtinguda amb *Dral*. El fragment va ser purificat i lligat al vector pGEM-T *Easy*.

pGEM-mALT1028: El constructe pGEM-mALT1028 va ser obtingut mitjançant recorregut genòmic per lligació d'un fragment de DNA de 846 pb aïllat a partir de la llibreria genòmica d'*S. aurata* obtinguda amb *PvuII*. El fragment va ser purificat i lligat al vector pGEM-T *Easy*.

pYmALT: El constructe pYmALT va ser generat per PCR usant com a oligonucleòtids YM1/IMAL24 i com a DNA motlle cDNA de fetge d'orada. El fragment, que contenia el cDNA corresponent a mALT, va ser purificat, digerit amb *BamHI* i *HindIII* i clonat en pYES2 prèviament digerit amb els mateixos enzims.

TÈCNIQUES GENERALS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.4 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La tècnica de PCR (Saiki i col·l, 1988) s'utilitza per amplificar fragments de DNA a partir d'un DNA motlle. La zona a amplificar queda delimitada per dos oligonucleòtids (sentit i antisentit) que són complementaris a una seqüència coneguda. Aquests oligonucleòtids funcionen com a encebadors per a la síntesi de DNA per la DNA polimerasa. L'enzim que porta a terme la síntesi de la cadena de DNA és una DNA polimerasa termoestable. En aquesta tesi s'han utilitzat les polimerases: *Taq* polimerasa (Biotools) i *Expand High Fidelity* (Roche), utilitzada quan es requeria una major fidelitat en l'amplificació (clonatge).

La seqüència dels encebadors emprats depèn de les regions que envolten el fragment que es vol amplificar. De manera general, els encebadors han de ser el més específics possible, tenir entre 18 i 25 nucleòtids, presentar entre un 50%-70% de residus G/C i no formar dímers o estructures secundàries. Existeixen diversos programes informàtics que ajuden al disseny d'encebadors i les temperatures òptimes d'hibridació com per exemple el *Oligo Explorer 1.2* (Gene Link, 2004).

En el procés d'amplificació del DNA, dut a terme en el termociclador, el DNA motlle és desnaturalitzat per escalfament. Seguidament la barreja es refreda a la temperatura òptima per a què els oligonucleòtids hibridin amb les seves seqüències complementàries. Aquests actuaran com a iniciadors de la síntesi de noves cadenes per part de la DNA polimerasa. Aquesta etapa es realitza a 72 °C. Els productes formats, després d'un cicle complet, funcionaran com a motlle per a les successives reaccions. Al final, s'obtindran per cada molècula bicatenària de DNA motlle 2^n molècules, essent n el número de cicles efectuats.

CONDICIONS DE PCR:

- | | | | |
|----|---------------------------|------------------------------|-----------|
| 1. | Desnaturalització inicial | 94 °C | 5 minuts |
| 2. | Desnaturalització | 94°C | 30 segons |
| 3. | Hibridació * ¹ | 50-65 °C | 30 segons |
| 4. | Extensió * ² | 72°C | |
| 5. | n cicles (pas 2 a 4) | s'especifiquen a cada assaig | |
| 6. | Extensió final | 72°C | 5 minuts |

*¹ La temperatura d'hibridació depèn de l'oligonucleòtid utilitzat (llargària, contingut de G/C, homologia a la cadena motlle). L'astringència de la reacció de PCR es pot incrementar en augmentar la temperatura d'hibridació dels oligonucleòtids.

*² El temps d'elongació varia en funció de la longitud del fragment a amplificar; requerint-se aproximadament 1 minut/Kb en el cas de la *Taq pol.*

En un tub es prepara la mescla de PCR:

DNA motlle	20-40 ng
Tampó de polimerasa (10X)	5 µL (1X)
Mg ₂ Cl (50 mM)	2 µL (2 mM)
dNTP (10 mM cadascú)	1 µL (200 µM cadascú)
Oligonucleòtid sentit (10 µM)	1 µL (0.2 µM)
Oligonucleòtid antisentit (10 µM)	1 µL (0.2 µM)
DNA polimerasa (5 U/ µL)	0.3 µL (1,5 U)
H ₂ O mQ	qsp 50µL

Quan s'ha hagut d'amplificar un fragment de DNA a partir de DNA genòmic o una regió rica en G/C, s'ha incorporat a la reacció de PCR un 5% de DMSO. El DMSO facilita la separació de la doble cadena de DNA a l'interrompre l'aparellament de bases.

3.5 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE FRAGMENTES DE DNA

Per aïllar i purificar fragments de DNA a partir de solucions com ara els obtinguts a partir de productes de PCR o de modificacions enzimàtiques (restriccions enzimàtiques, fosforilació) i per recuperar el DNA a partir de gels d'agarosa, s'ha utilitzat el kit *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche). El procediment es basa en la unió selectiva de DNA, en presència de tiocianat de guanidina, a unes fibres de sílice empaquetades en una columna. El DNA retintut a la columna és purificat per una sèrie de rentats que eliminen les sals, oligonucleòtids, cadenes de DNA de mida inferior a 100 pb, nucleòtids no incorporats i enzims. Posteriorment el DNA purificat s'elueix en presència d'una concentració baixa de sals.

QUANTIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

Per conèixer la concentració d'àcids nucleics d'una solució, s'ha usat l'espectròmetre NanoDrop ND-1000, que permet efectuar determinacions espectrofotomètriques en microgotetes. Els àcids nucleics (DNA i RNA) absorbeixen a una longitud d'ona de 260nm, mentre que les proteïnes absorbeixen a 280 nm.

Per determinar la puresa dels àcids nucleics, es calcula la relació A_{260}/A_{280} . Un factor entre 1,7-2 indica que la mostra està lliure de proteïnes. Per calcular la concentració de DNA o RNA s'apliquen les següents fórmules:

$$\text{Concentració de DNA en ng/}\mu\text{L: } A_{260} \times 50$$

$$\text{Concentració de RNA en ng/}\mu\text{L: } A_{260} \times 40$$

El protocol seguit és

1. Posar 1.5 µL d'aigua destil·lada a l'aparell per calibrar-lo
2. Fer la mesura del blanc amb 1.5 µL
3. Afegir 1.5 µL de la mostra i dur a terme la mesura

3.6 ELECTROFORESI DE DNA

L'electroforesi en gels d'agarosa permet efectuar la separació de fragments de DNA en funció de la seva mida. El DNA és una molècula amb càrrega negativa, i es mou en la matriu d'agarosa en aplicar una corrent elèctrica. La concentració d'agarosa del gel determina la resolució dels fragments de DNA a separar. Rutinàriament hem utilitzat gels d'agarosa a l'1% (p/v) per separar fragments de DNA de 0.4 a 6 Kb. Per a fragments més petits hem utilitzat gels fins al 2 % d'agarosa. La mobilitat dels fragments de DNA és inversament proporcional al logaritme de la seva mida.

La visualització dels fragments de DNA en el gel l'hem dut a terme mitjançant la incorporació de bromur d'etidi (Sigma) en el gel d'agarosa (1 µg/mL), i efectuant l'observació en un transil·luminador amb llum UV.

S'ha fet servir com a marcador l'*1 Kb ladder* (Biotools), que inclou fragments de DNA de 10000 a 250 pb.

El tampó de càrrega de les mostres, que s'afegeix al DNA abans de l'electroforesi, conté glicerol, que dóna densitat a les mostres i facilita la càrrega als pous del gel, i *orange G* que permet la visualització del front en el procés d'electroforesi.

L'electroforesi es realitza a 100 V, a temperatura ambient.

Preparació del gel d'agarosa:

1. Pesar la quantitat d'agarosa desitjada.
2. Dissoldre l'agarosa en TAE 1X escalfant al microones.
3. Afegir el bromur d'etidi (1 µg/mL) una vegada estigui a temperatura la solució d'agarosa.
4. Abocar la barreja al portagels i col·locar les pintes per tal de formar els pouets.
5. Deixar solidificar el gel i retirar les pintes.

SOLUCIONS:

Tampó d'electroforesi de DNA: TAE 1X

Tris HCl 4 mM

Na₂EDTA·2H₂O 2 mM

Àcid acètic glacial 20 mM

S'ajusta el pH a 8 i s'autoclava.

Bromur d'etidi: Es prepara a concentració de 10 mg/mL i es guarda a 4°C en un envàs hermètic i protegit de la llum. S'ha de manipular amb precaució ja que és sospitós de ser carcinogen.

Solució de càrrega de mostres de DNA (6X)

Glicerol 30%

Orange G 0,25%

Es guarda a 4 °C.

Aquest tampó s'afegeix en una proporció de 1:5 (v/v) a les mostres de DNA.

3.7 DIGESTIÓ ENZIMÀTICA DE DNA

S'ha dut a terme mitjançant enzims de restricció, seguint les instruccions de les cases comercials i utilitzant els tampons proveïts per a cada enzim. Per efectuar les digestions, cada enzim requereix unes condicions de força iònica i temperatura específiques. Es recomana la utilització d'1 U d'enzim per 1 µg de

DNA, incubant durant 1 hora a la temperatura adient. Generalment, hem dut a terme les digestions en presència d'excés d'enzim de restricció (1-3 U per μg de DNA), sense superar mai el 10 % en relació al volum total de la reacció.

3.8 CONVERSIÓ D'EXTREMS DE DNA PROTUBERANTS EN ROMS

La generació d'extrems roms a partir d'un fragment de DNA amb extrems protuberants 5' o 3' és a vegades un prerequisit abans de procedir a la lligació. La reacció de *fill-in* es duu a terme per generar extrems roms a partir d'un fragment de DNA resultant de la digestió amb enzims de restricció que generen extrems protuberants en 5', mentre que el *chew back* seguit de *fill-in* es fa servir quan els fragments de DNA presenten extrems protuberants 3'. La DNA polimerasa *Klenow* es va emprar per catalitzar ambdues reaccions (*chew back* i *fill-in*). La subunitat *Klenow* de la DNA polimerasa presenta activitat exonucleasa 3' a 5', que és emprada per dur a terme la reacció de *chew back*, i activitat polimerasa 5' a 3', que catalitza les reaccions de *fill-in*.

FILL-IN:

1. Preparar en un tub els components de la reacció:

DNA	1 μg
Tampó <i>Klenow</i> (10X)	4 μL (1X)
dNTPs (10 mM)	0,5 μL
DNA polimerasa <i>Klenow</i> (Roche) (2 U/ μL)	5 μL (10 U)
H ₂ O mQ	qsp 40 μL

2. Incubar a 37 °C durant 15 minuts.
3. Inactivar l'enzim a 75 °C durant 10 minuts.
4. Purificar el DNA (veure apartat 3.5).

CHEW BACK I FILL-IN

1. Preparar en un tub els components de la reacció:

DNA	1 μg
Tampó <i>Klenow</i> (10X)	4 μL (1X)
DNA polimerasa <i>Klenow</i> (Roche) (2 U/ μL)	5 μL (10 U)
H ₂ O mQ	qsp 40 μL

2. Incubar 1 hora a 37°C.
3. *Fill-in*: Afegir 0.5 μL de dNTPs 10 mM a la mescla.
4. Incubar 15 minuts a 37°C.
5. Inactivar l'enzim a 75°C durant 10 minuts.
6. Purificar el DNA (veure apartat 3.5).

3.9 LLIGACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA

Consisteix en la unió de fragments de DNA mitjançant una reacció enzimàtica. L'enzim que s'utilitza en la reacció es la DNA lligasa del bacteriòfag T4, que catalitza la formació d'enllaços fosfodiéster entre el fosfat 5' terminal i l'hidroxil terminal de l'extrem 3' del DNA, en presència d'ATP i Mg²⁺.

PROTOCOL:

1. Es mescla en un tub:

T4 DNA lligasa (Promega) 3 U/ μ L	1 μ L (3 U)
Rapid Ligation Buffer 2X* ¹	5 μ L (1X)
Fragments de DNA a ser lligats (insert i vector)* ²	4 μ L

2. Incubar 1 hora a temperatura ambient.
3. Posar a 4°C durant tota la nit.
*¹ Una vegada el tampó està descongelat, s'ha d'agitar vigorosament al vòrtex per assegurar-se que els components del tampó estan completament dissolts, abans d'afegir els fragments de DNA i la lligasa.
*² Rutinàriament s'ha utilitzat una relació molar 1:3 de vector respecte l'insert.

3.10 TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

La transformació és una tècnica que ens permet introduir DNA exogen circular en cèl·lules procariotes. Prèviament s'han de fer competents les cèl·lules procariotes.

3.10.1 OBTENCIÓ DE CÈL·LULES *E. coli* COMPETENTS

En condicions normals, l'eficiència de transformació d'*E. coli* és molt baixa, ja que aquests bacteris accepten l'entrada de molt poc DNA exogen. Per aquest motiu, abans de dur a terme la transformació, cal sotmetre les cèl·lules a un tractament per incrementar la permeabilitat de la membrana, convertint-les així en cèl·lules competents, susceptibles de ser transformades amb més eficàcia. Hem utilitzat el procediment descrit per Sambrook i col·l (1989), que permet alterar la permeabilitat de les membranes cel·lulars mitjançant la utilització d'ions de calci.

La soca d'*E. coli* utilitzada en aquesta memòria fou:

E. coli DH5 α : *sup E44*, Δ *lacU169* (90 *lac ZDN15*), *hsd R17*, *rec A1*, *gyr A96*, *thi-1*, *rel A1*.

PROTOCOL:

1. Inocular 3 mL de medi LB sense antibiòtics amb cèl·lules *E. coli* i mantenir-ho en agitació constant a 37 °C durant 12-15h.
2. Utilitzar 0,5 mL del cultiu obtingut per inocular 50 mL de medi LB autoclavat.
3. Deixar les cèl·lules a 37 °C, en agitació, unes 2-3 hores, fins que la OD_{590 nm} sigui 0,7-0,8, la qual cosa indica que el cultiu es troba en fase de creixement exponencial.
4. Sedimentar les cèl·lules per centrifugació a 2500 g durant 10 minuts.
5. Eliminar el sobrenedant i resuspendre els bacteris en 50 mL de MgCl₂ 100 mM fred.
6. Sedimentar les cèl·lules per centrifugació a 2500 g durant 10 minuts. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el precipitat, en 10 mL del mateix MgCl₂ 100 mM fred.
7. Afegir 100 mL de CaCl₂ 100 mM i mantenir les cèl·lules en gel, durant 60-90 minuts.
8. Sedimentar les cèl·lules per centrifugació a 2500 g durant 10 minuts.
9. Retirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 12,5 mL de la solució de resuspensió.
10. Fer alíquotes de 200 μ L de cèl·lules i congelar-les immediatament a -80 °C.

SOLUCIONS:

<u>Medi LB:</u>		<u>Solució de resuspensió</u>	
Triptona	10 g/l	CaCl ₂	85 mM
Extracte de llevats	5 g/l	Glicerol	15%
NaCl	10 g/l	S'autoclava.	

S'ajusta el pH a 7 i s'autoclava.

3.10.2 TRANSFORMACIÓ PER XOC TÈRMIC

La transformació produeix una alteració transitòria de la permeabilitat de la membrana de cèl·lules competents, per tal de facilitar l'entrada de DNA. Les transformacions s'han efectuat pel mètode del xoc tèrmic, que facilita l'entrada del DNA dins la cèl·lula al disminuir el potencial de membrana, que es recupera en els següents passos (Panja et al., 2006)

PROTOCOL:

1. Descongelar en gel (0-4 °C) una alíquota de cèl·lules competents.
2. Barrejar les cèl·lules i el DNA plasmídic a transformar i deixar 15 minuts en gel. El DNA plasmídic no ha de representar més del 10% de la barreja.
3. Incubar 3 minuts a 42 °C (xoc tèrmic).
4. Deixar reposar 5 minuts en gel.
5. Afegir 800 µL de medi LB autoclavat i incubar 45 minuts a 37 °C. Durant aquest interval, les cèl·lules refan les membranes i sintetitzen les proteïnes de resistència a antibiòtics codificades pel plasmidi.
6. Sedimentar les cèl·lules per centrifugació a 10000 g durant 30 segons. Retirar el sobrenedant, deixant-ne 100 µL per resuspendre les bactèries.
7. Sembrar en plaques d'LB-agar amb l'antibiòtic de selecció adequat i incubar en una estufa a 37°C durant 12-15 hores

SOLUCIONS:

Medi LB

Es prepara seguint les pautes de l'apartat 3.10.1.

Ampicil·lina

Es prepara a concentració de 100 mg/mL (1000 X) i es conserva alíquotada i congelada a -20 °C.

Plaques d'LB-agar

Triptona	10 g/L
Extracte de llevats	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar bacteriològic	1,5 g/L

Dissoldre la triptona, l'extracte de llevat i el NaCl en aigua destil·lada. Ajustar el pH a 7. Afegir l'agar bacteriològic i autoclavar. Deixar refredar el medi fins a 50 °C i afegir l'antibiòtic. Dipositar uns 10 mL de l'LB-agar per placa, al costat de la flama. Una vegada solidificat el medi, mantenir les plaques una nit cap per avall en una estufa a 37 °C, per tal d'assecar-les i comprovar que no estan contaminades. Es guarden a 4°C fins a ser utilitzades.

3.11 OBTENCIÓ DE DNA PLASMÍDIC

Per obtenir DNA plasmídic lliure de DNA genòmic, proteïnes i restes cel·lulars, s'han emprat els kits comercials *GenElute Plasmid Miniprep Kit* i *GenElute Plasmid Midiprep Kit* (Sigma). Es deixa créixer un cultiu recombinant d'*E. coli* durant tota la nit en medi LB amb l'antibiòtic adient. Es recullen les cèl·lules per centrifugació i se sotmeten a lisi alcalina per alliberar el contingut cel·lular. Es precipiten per centrifugació les

restes cel·lulars, proteïnes, lípids, SDS i DNA cromosòmic, seguit de l'adsorció del DNA plasmídic en una columna de sílica en presència d'altres concentracions de sals. Els contaminants s'eliminen en el rentat realitzat en presència d'alta concentració de sals i finalment el DNA és eluït en baixa concentració de sals.

3.12 SEQÜENCIACIÓ DEL DNA

La seqüenciació del DNA es va dur a terme per PCR usant el kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* versió 3.1 (Applied Biosystems). En aquest sistema, s'afegeixen els quatre ddNTPs a la mescla de PCR; cada ddNTP està marcat amb un fluoròfor que emet a diferent longitud d'ona. Una vegada acabada la PCR, el DNA fou precipitat i analitzat per fluorimetria en el Servei de Seqüenciació (SCT-UB).

Mescla de reacció:		CONDICIONS DE PCR:
<i>Mix terminator</i> (proveït pel kit)	1.5µL	1. 96 °C 1 minut 30 segons
Oligonucleòtids (10µM)	0.5µL (5 pmol)	2. 96 °C 30 segons
DNA a seqüenciar	0.5 µg	3. 50 °C 30 segons
H ₂ O mQ	qsp 10 µL	4. 60 °C 4 minuts
		5. 30 cicles (pas 2 a 4)

3.13 ANÀLISI INFORMÀTICA I INTRODUCCIÓ DE SEQÜÈNCIES EN BASES DE DADES

Pel disseny d'oligonucleòtids s'ha utilitzat el programa informàtic Oligo Explorer. L'anàlisi informàtic de les seqüències de DNA i proteïnes s'ha dut a terme utilitzant programes informàtics com ara 4Peaks (visualització i anàlisi de seqüències), LALIGN (alineament de seqüències de DNA), ClustalW (alineament múltiple de seqüències de DNA i proteïna), la pàgina *web* de GenScript per a la generació de mapes de restricció de seqüències de DNA, MatInspector (anàlisi dels possibles llocs de resposta a factors de transcripció de promotors) i el TreeTop (anàlisi filogenètic de seqüències). Les seqüències de DNA obtingudes per primera vegada en el laboratori, van ser introduïdes a la base de dades *GenBank*.

3.14 CRIBATGE PER PCR

El cribatge per PCR ens permet analitzar, mitjançant PCR, el DNA de les colònies obtingudes a la transformació (McPherson i col·l, 1991). En aquesta PCR, s'utilitza com a motlle les colònies obtingudes en la transformació fent servir oligonucleòtids del vector que flanquegen el lloc d'inserció del fragment clonat. Així, podem discernir les colònies que han incorporat el plasmidi recombinant i determinar la mida del fragment clonat per electroforesi en gel d'agarosa (apartat 3.6). Aquelles colònies en què mitjançant la reacció de PCR es detecta la incorporació de l'insert (de la mida esperada) s'analitzaran, posteriorment, per restricció enzimàtica. Per tal de realitzar aquest anàlisi caldrà aïllar prèviament el DNA plasmídic de les colònies positives (apartat 3.11).

3.15 TÈCNICA DEL PASSEIG GENÒMIC

Per dur a terme el passeig genòmic hem utilitzat el kit *Universal GenomeWalker* (Clontech). Aquest sistema permet trobar seqüències de DNA genòmic desconegudes adjacents a una seqüència coneguda.

Emprant el DNA genòmic d'interès, el primer pas és construir quatre llibreries de DNA, digerint quatre alíquotes de DNA genòmic amb un enzim de restricció que deixa extrems roms i que sigui diferent per a cadascuna (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*). Als fragments resultants d'aquestes quatre llibreries se'ls lliga un adaptador *GenomeWalker*, que conté les seqüències que permeten la hibridació dels *adaptor primers* subministrats pel kit (AP1 i AP2). Un cop construïdes les llibreries i lligats els adaptadors es realitzen per a cada llibreria dues amplificacions mitjançant la tècnica de PCR. En la primera amplificació (PCR primària) utilitzem l'*outer adaptor primer* AP1, i un encebador específic del gen d'interès dissenyat per l'investigador (oligonucleòtid específic del gen A). En la PCR secundària utilitzem el *nested adaptor primer* (AP2) i un encebador més intern a l'utilitzat en la PCR primària i específic del gen d'interès (oligonucleòtid específic del gen B).

3.15.1 CONSTRUCCIÓ DE LES LLIBRERIES GENOMEWALKER

1. Rotular 5 tubs: DL1, DL2, DL3, DL4 i un control positiu
2. Mesclar per a cada reacció, per separat:

DNA genòmic (0.1 µg/µL)	25 µL (2,5 µg)
Enzim de restricció (<i>DraI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>PvuII</i> o <i>StuI</i>) (10U/µL)	8 µL (80 U)
Tampó de l'enzim de restricció (10X)	10 µL (1X)
Aigua desionitzada	qsp 100 µL

3. Incubar a 37°C durant 2 hores.
4. Sotmetre la mescla a vòrtex suau durant 5-10 segons. Incubar a 37°C 16-18 hores.
5. Comprovar que la digestió és completa mitjançant electroforesi (apartat 3.6).

3.15.2 PURIFICACIÓ DEL DNA

1. A cada tub afegir 1 volum de fenol.
2. Vortexar a baixa velocitat 5-10 segons
3. Centrifugar breument per separar les fases aquosa i orgànica.
4. Transferir la fase aquosa (superior) a un altre tub. Descartar la fase orgànica.
5. A cada tub afegir 2 volums d'etanol 95% fred, 1/10 volums de NaOAc 3M pH 4,5 i 20 µg de glicogen.
6. Vortexar a baixa velocitat 5-10 segons.
7. Centrifugar a 15.000 rpm 10 minuts.
8. Rentar el sediment amb 100 µL d'etanol fred.
9. Centrifugar a 15.000 rpm 5 minuts.
10. Retirar el sobrenedant i deixar assecar el sediment a l'aire.
11. Dissoldre el precipitat en 20 µL de TE pH 7,5.
12. Vortexar a baixa velocitat 5-10 segons.
13. Determinar la quantitat de DNA obtinguda.

3.15.3 LIGACIÓ DE DNA GENÒMIC ALS ADAPTADORS GENOMEWALKER

1. Incubar els components de la reacció durant tota la nit a 16 °C.

DNA purificat i digerit	4 µL (200 ng)
Adaptador <i>Genome Walker</i> (25 µM)	1.9 µL (25 µM)
Tampó de lligasa (10X)	1.6 µL (1X)
T4 DNA lligasa (6 U/µL) (Promega)	0.5 µL (3 U)
H ₂ O mQ	Qsp 16µL

2. Aturar la reacció incubant a 70 °C durant 5 minuts.
3. Afegir a cada tub 72 µL de TE 1X
4. Mesclar durant 10-15 segons.

3.15.4 PCR

El protocol de recorregut genòmic *GenomeWalker* consisteix en una amplificació per PCR primària i secundària utilitzant cadascuna de les quatre llibreries experimentals *GenomeWalker*. Per a aquest fi, l'oligonucleòtid AP1 (proveït pel kit) i l'oligonucleòtid Gen Específic A (dissenyat per l'investigador) són emprats per a la PCR primària, mentre que els oligonucleòtids AP2 (proveït pel kit) i el Gen Específic B (dissenyat per l'investigador) s'usen per a la PCR secundària.

PCR PRIMÀRIA:

Es prepara la següent mescla per a cadascuna de les llibreries experimentals:

<i>Advantage 2 PCR Buffer</i> (10X)	5 µL (1X)	CONDICIONS DE PCR: <u>Amplificació primària:</u> 7 cicles: 94 °C 25 segons 72 °C 3 minuts 32 cicles: 94 °C 25 segons 67 °C 3 minuts 1 cicle: 67 °C 7 minuts
dNTPs (10 mM cadascú)	1 µL (5 µM)	
AP1 (10 µM)	1 µL (0,2 µM)	
Oligonucleòtid específic de gen A (10µM)	1 µL (0,2 µM)	
Llibreria <i>GenomeWalker</i>	1 µL (200 ng)	
<i>Advantage Genomic Polymerase Mix</i> (50X)	1 µL (1X)	
Aigua desionitzada	qsp 50 µL	

Mesclar be al vòrtex i centrifugar breument.

Un cop finalitzada la PCR, s'analitzen 8 µL del producte de PCR en un gel d'agarosa a l'1,5% al costat d'un marcador de DNA.

PCR SECUNDÀRIA:

Preparar en un tub la següent mescla:

<i>Advantage 2 PCR Buffer</i> (10X)	5 µL (1X)	CONDICIONS DE PCR: <u>Amplificació secundària:</u> 5 cicles: 94 °C 25 segons 72 °C 3 minuts 20 cicles: 94 °C 25 segons 67 °C 3 minuts 1 cicle: 67 °C 7 minuts
dNTPs (10 mM cadascú)	1 µL (5 µM)	
AP2 (10 µM)	1 µL (0,2 µM)	
Oligonucleòtid específic de gen B (10µM)	1 µL (0,2 µM)	
Producte de PCR primari diluït 1/50 en aigua	1 µL (200 ng)	
<i>Advantage Genomic Polymerase Mix</i> (50X)	1 µL (1X)	
Aigua desionitzada	qsp 50 µL	

S'analitzen 5 µL del producte de PCR secundari en un gel d'agarosa a l'1,5% al costat d'un marcador de DNA.

3.16 TÈCNICA D'RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

En aquesta tècnica, la transcriptasa inversa (RT), una polimerasa de DNA produïda per retrovirus, sintetitza una cadena senzilla de DNA complementari (cDNA) a partir de l'RNA utilitzat com a motlle. Una vegada s'obté el cDNA s'efectua una amplificació per PCR per amplificar una regió determinada mitjançant la utilització d'oligonucleòtids sentit i antisentit específics. L'RT és una polimerasa RNA-depenent, que requereix, a part de l'RNA motlle, dNTPs i encebador, que pot ser hexàmers aleatoris. Per tal de prevenir la degradació de l'RNA, la mescla de reacció inclou aigua DEPC, inhibidor d'RNAses (RNasin[®], Promega) i DTT (Roche). La reacció té lloc a 37 °C, durant 60 minuts.

Es prepara la mescla de reacció:

First Strand buffer (5X)	4 µL (1X)
dNTPs (10 mM)	2 µL (0.5 mM)
Hexàmers aleatoris (Invitrogen) (62.5 ng/µL)	2 µL (125 ng)
DTT (Roche) (100 mM)	2 µL (10 mM)
Inhibidor d'RNAses (Invitrogen) (80 U/µL)	0.5 µL (40 U)
RNA total	1 a 5 µg
MMLV-RT* ¹ (Invitrogen) (200 U/µL)	1 µL (200 U)
H ₂ O _{DEPC} * ²	qsp 20 µL

*¹ MMLV-RT: *Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*.

*² El DEPC (dietilpirocarbonat) és un potent inhibidor de RNAses. És un compost volàtil i tòxic que ha de ser manipulat en una campana de flux laminar. L'aigua tractada amb DEPC s'autoclava dues vegades. El DEPC que no es dissol en aigua és degradat a CO₂ per la calor de l'autoclau.

3.17 AMPLIFICACIÓ D'EXTREMS DE cDNA PER RACE: SMART RACE cDNA AMPLIFICATION

La tècnica de l'amplificació ràpida d'extrems de cDNA, coneguda com a RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) i descrita per primera vegada per Frohman i col·l (1988), permet la clonació i anàlisi d'extrems 5' i 3' d'un determinat cDNA. Pels experiments de RACE PCR 5' i 3' descrits en aquesta memòria, s'ha utilitzat el kit SMART RACE cDNA Amplification Kit de Clontech.

Aquest mètode proveeix un mecanisme per generar cDNAs complets després de la reacció de transcripció inversa (Zhu i col·l, 2001). La tecnologia SMART (*Switching Mechanism At 5' ends of RNA Transcript*) permet l'aïllament de seqüències 5' completes a partir del transcrit diana. Això es fa possible per l'acció conjunta de l'oligonucleòtid Smart II A i la retrotranscriptasa MMLV RT. La MMLV RT, una vegada arriba al final d'un RNA motlle, exhibeix la seva activitat transferasa terminal en afegir de 3 a 5 residus predominantment dC a l'extrem 3' de la cadena de cDNA sintetitzada inicialment. L'oligonucleòtid SMART II A conté residus dG que hibriden amb la regió rica en dC de la cua del cDNA sintetitzat, i serveix com a motlle per a la transcriptasa inversa. La MMLV RT canvia el motlle de la molècula d'RNAm a l'oligo SMART II A, generant així una còpia completa de cDNA de l'RNA original amb la seqüència SMART addicional a l'extrem. El cDNA resultant es pot fer servir per subsegüents reaccions de PCR per hibridació dels oligonucleòtids *Universal Primer A Mix* (UPM), per a la PCR primària, i el *Nested Universal Primer A* (NUP), per a la PCR secundària, proveïts pel kit. Donat que l'activitat de l'RT d'afegir la cua de polidC és més eficient si l'enzim ha arribat a l'extrem de l'RNA motlle, la seqüència SMART és generalment afegida únicament a les cadenes de cDNAs completes.

Apart de l'oligonucleòtid SMART II A, la síntesi de la primera cadena de cDNA pel RACE 5' es duu a terme mitjançant l'ús de l'encebador 5'-CDS A, que és un oligonucleòtid *lock-docking* modificat (dT) que té dues posicions degenerades a l'extrem 3'.

Pel RACE 3', es duu a terme la síntesi d'una primera cadena de cDNA usant el 3'-RACE CDS Primer A, que inclou un oligo (dT) i una seqüència d'ancoratge on la PCR pot ser duta a terme per la hibridació dels oligonucleòtids UPM i NUP.

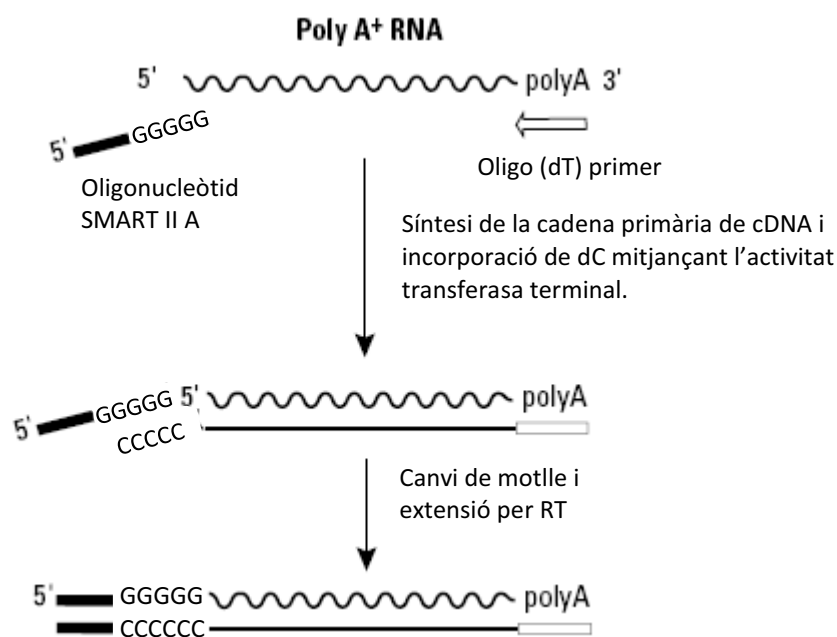


Figura 10: Esquema de la síntesi de cDNA SMART.

La síntesi de la primera cadena s'efectua utilitzant l'oligonucleòtid modificat dT. Seguidament la transcriptasa inversa arriba a l'extrem 5' del motlle d'mRNA, i l'activitat transferasa terminal afegeix residus dC. L'oligonucleòtid SMART II A hibrida amb l'oligonucleòtid dC afegit i serveix com a motlle per a la transcriptasa inversa *PowerScript*.

Els únics requeriments per a l'amplificació amb SMART RACE cDNA és conèixer un fragment de la seqüència d'interès per tal de dissenyar oligonucleòtids específics.

3.17.1 DISSENY D'OLIGONUCLEÒTIDS

Els encebadors específics per amplificar extrems de cDNA mitjançant la tècnica de RACE han de tenir una longitud compresa entre 23 i 28 nucleòtids, ha de contenir un 50-70% de GC, i la T_m ha de ser d'almenys 65 °C. Una T_m de més de 70 °C podria generar resultats més satisfactoris i permetria realitzar *touchdown* PCR (cicles inicials d'amplificació a una temperatura d'hibridació elevada que es redueix progressivament en els cicles següents).

Cal evitar la utilització d'oligonucleòtids que generin ponts d'hidrogen intramoleculars, i d'oligonucleòtids que tinguin seqüències complementàries als UPM.

3.17.2 SÍNTESI DE LA PRIMERA CADENA DE cDNA PER AL RACE 5' I 3'

PROTOCOL:

1. Mesclar en un tub eppendorf els components de reacció:

RACE 5'		RACE 3'	
RNA motlle	1 µg (1-3 µL)	RNA motlle	1 µg (1-3 µL)
5'-CDS primer A	1 µL	3'-CDS primer A	5 µL
SMART II A oligo	1 µL	H ₂ O mQ	qsp 5µL
H ₂ O mQ	qsp 5µL		

2. Incubar els tubs a 70 °C durant 2 minuts.
3. Refredar els tubs en gel durant 2 minuts.
4. Afegir al tub de reacció:

Tampó <i>first-strand</i> (5X)	2 µL (1X)
DTT (20 mM)	1 µL (2 mM)
dNTP mix (10 mM)	1 µL (1 mM)
Transcriptasa inversa <i>PowerScript</i> (Invitrogen)	1 µL
H ₂ O mQ	qsp 10µL

5. Incubar els tubs de reacció a 42 °C durant 90 minuts.
6. Diluir la reacció amb tampó TE (100 µL per quantitats de partida d'RNA >200 ng).
7. Escalfar els tubs a 72 °C durant 7 minuts.
8. Purificar el cDNA usant el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).
9. Les mostres poden ser emmagatzemades a -20 °C durant 3 mesos.

3.17.3 AMPLIFICACIÓ PRIMÀRIA PER AL RACE 5' I 3'

PROTOCOL:

1. Es prepara suficient mescla de PCR per a totes les reaccions de PCR; la mateixa mescla de reacció serveix per a les reaccions de RACE 5' i 3'. Per a cada reacció de PCR de 50 µL, s'han de mesclar els següents components:

Mescla de PCR (<i>Master Mix</i>)	
<i>Advantage 2 PCR Buffer</i> (10X)	5 µL (1X)
dNTP mix (10 mM)	1 µL (0.2 mM)
<i>Advantage 2 Polymerase Mix</i>	1 µL
H ₂ O mQ	34,5µL

2. Mesclar bé al vòrtex i centrifugar breument
3. Afegir a la mescla de PCR:

RACE 5'		RACE 3'	
5'-RACE Ready cDNA	2,5 µL	3'-RACE Ready cDNA	2,5 µL
UPM (10X)	5 µL (1X)	UPM (10X)	5 µL (1X)
Encebador específic (10 µM)	1 µL (0.2 µM)	Encebador específic (10 µM)	1 µL (0.2 µM)

L'amplificació primària es va realitzar mitjançant *touchdown*-PCR.

CONDICIONS DE PCR:

A.	5 cicles:	94 °C	1 minut 30 segons	C.	20 cicles:	94 °C	30 segons
		72 °C	1 minut			67 °C	30 segons
B.	5 cicles:	94 °C	30 segons			72 °C	1 minut
		70 °C	30 segons				
		72 °C	1 minut				

3.17.4 AMPLIFICACIÓ SECUNDÀRIA

Normalment, sol ser necessària una amplificació secundària per incrementar l'especificitat del producte de PCR. Es duu a terme utilitzant l'oligonucleòtid NUP i un encebador intern específic pel gen en estudi.

1. Es dilueix el producte de PCR primari en 245 µL de tampó TE.
2. Es prepara la mescla de reacció:

Dilució de la PCR primària	5 µL	CONDICIONS DE PCR:
NUP (10 µM)	1 µL (0.2 µM)	
Encebador gen específic intern (10 µM)	1 µL (0.2 µM)	
Master mix	41,5 µL	
H ₂ O mQ	1,5 µL	
		1. 94 °C 30 segons
		2. 68 °C 30 segons
		3. 72 °C 3 minuts
		4. 35 cicles (pas 1 a 3)

Els productes de PCR s'analitzen en un gel d'agarosa a l'1%. Per tal de determinar l'origen de transcripció, els fragments obtinguts es clonen en el vector pGEM-T *Easy* i es seqüencien posteriorment.

3.18 NORTHERN BLOT

La tècnica de *Northern blot* permet detectar i quantificar específicament els nivells d'RNAm. Es basa en la hibridació d'una sonda (un fragment de DNA que hibrida a l'RNAm que volem detectar i marcat amb digoxigenina) amb RNA transferit i fixat a una membrana de niló o nitrocel·lulosa. El protocol implica: preparació de les mostres de teixits o cèl·lules per aïllar l'RNA, obtenció de la sonda marcada, electroforesi d'RNA en gel d'agarosa, transferència de l'RNA a una membrana de niló o nitrocel·lulosa i posterior fixació, hibridació amb la sonda específica i immunodetecció.

3.18.1 AÏLLAMENT D'RNA

Per realitzar l'extracció d'RNA total a partir de teixit polvoritzat hem utilitzat el *kit* comercial *Total quick RNA cell and tissues* (Talent).

Una vegada finalitzat el protocol d'extracció d'RNA s'efectua la quantificació i s'examina la possible existència de contaminants llegint l'absorbància a 260 nm i 280 nm. Es conserven els RNA a -80 °C, i es descongelen lentament en gel cada vegada que s'hagin d'utilitzar.

3.18.2 ELECTROFORESI D'RNA

Com en el cas del DNA, l'electroforesi d'RNA s'ha realitzat seguint el protocol de Sambrook i col·l (1989), en gels d'agarosa a l'1% en condicions desnaturalitzants. De manera general, el procés d'electroforesi s'efectua a 40 V i a temperatura ambient, durant 3 o 4 hores. Un cop finalitzada l'electroforesi comprovem al transil·luminador amb llum UV la migració i l'estat de les mostres.

Preparació de les mostres

Les mostres d'RNA són diluïdes, si convé, amb aigua DEPC o TE/SDS 0,1 % fins a uns 20 µL de volum final. Se'ls afegeix el tampó de càrrega de mostres i s'incuben durant 10 minuts a 65 °C per tal de desfer possibles estructures secundàries en les molècules d'RNA. El bromur d'etidi del tampó de càrrega, permet visualitzar els àcids nucleics a l'UV. Deixem les mostres en gel fins al moment d'aplicar-les en el gel d'agarosa.

SOLUCIONS:

<u>Tampó de càrrega de mostres d'RNA</u>		<u>TE/SDS 0,1 %</u>	
MOPS 10X	21,6 % (v/v)	Tris HCl	10 mM
Formaldehid	17,5 % (v/v)	EDTA	1 mM
Formamida desionitzant	48,6 % (v/v)	SDS	0,1 %
Blau de bromofenol saturat en glicerol al 50%	12,1 % (v/v)	S'ajusta a pH 8 i s'autoclava.	
Bromur d'etidi (10 mg/mL)	0,2 % (v/v)		
Es conserva 1 mes a 4° C.			

Preparació del gel

Per l'electroforesi de mostres d'RNA es preparen els gels en condicions desnaturalitzants (en presència de formaldehid).

SOLUCIONS:

<u>Gel per electroforesi d'RNA:</u>		<u>Tampó per electroforesi d'RNA:</u>	
MOPS	1 X	MOPS 0,4 M pH 7	250 mL
Formaldehid* ¹	4,75 % (v/v)	Acetat sòdic 2 M	12,5 mL
Agarosa	1 % (p/v)	EDTA 0,5 M pH 8	10 mL
		MOPS	1 X
		Formaldehid	6,5 % (v/v)
		Autoclavar la solució	

*¹ El formaldehid s'afegeix quan l'agarosa ha estat dissolta en MOPS 1 X i atemperada a 50 °C

Una vegada ha finalitzat l'electroforesi, es fa una foto del gel per posteriorment normalitzar la senyal del *Northern blot* amb la quantitat d'RNA dipositada en cada carril.

3.18.3 TRANSFERÈNCIA I FIXACIÓ DE L'RNA A MEMBRANES DE NILÓ

La transferència de l'RNA a les membranes de niló NYTRAN (Schleicher & Schuell) s'efectua per capil·laritat, utilitzant SSC 5X, a temperatura ambient, durant 12-15 hores.

MUNTATGE:

1. Col·loquem una superfície plana de vidre o metacrilat a sobre d'una cubeta que contingui tampó SSC 5 X de manera que quedi sostinguda pels extrems.
2. A sobre de la superfície plana col·loquem 2 fulls de paper secant *Whatman* amb els extrems en contacte amb el tampó. Fem rodar una vareta de vidre per tal d'eliminar les bombolles d'aire que poguessin quedar entre la superfície i el paper, repetir aquest procés després de cadascun dels passos que s'esmenten a continuació.
3. Tallem els pouets del gel d'agarosa i dipositem el gel a sobre de les tires de paper. Rodegem el gel amb parafilm per a què el tampó de transferència passi només a través del gel.
4. Col·loquem sobre el gel una membrana de niló (prèviament humidificada amb el tampó) de la mida del gel.
5. A sobre de la membrana dipositem 3 fulls de paper secant *Whatman* de la mateixa mida que la membrana.
6. Per últim, col·loquem tovallons de paper fins a una alçada aproximada de 15 cm, i amb compte dipositem a sobre un pes d'1 kg aproximadament. Tapem el muntatge amb làmines de *Saran Wrap* per tal de crear una atmosfera humida.
7. Una vegada transferit l'RNA es fixa a les membranes per irradiació amb UV durant 3 minuts i/o per escalfament 2 hores a 80° C. Les membranes es conserven envoltades en *Saran Wrap* (làmines de plàstic flexible transparent) a 4 °C, fins al moment de ser utilitzades.

SOLUCIONS:

SSC 20X:

Citrat sòdic 0,3 M

NaCl 3 M

S'ajusta el pH a 7, s'autoclava

Marcatge de les sondes

L'obtenció de sondes no radioactives s'ha dut a terme mitjançant el marcatge de fragments de DNA amb digoxigenina (DIG)-dUTP (Roche). Aquest mètode es basa en la substitució d'una part dels TTP que s'utilitzen en una PCR normal per molècules de DIG-dUTP que s'incorporen al DNA que s'està amplificant. El marcatge amb DIG-dUTP permet el reconeixement de la sonda per l'anticòs antiDIG-AP (conjugat amb l'enzim fosfatasa alcalina; Roche) que en posar-lo en contacte amb el substrat CDP-Star (Roche) dona lloc a un producte quimioluminiscent.

3.18.4 SÍNTESI DE LA SONDA

Es prepara la següent mescla de reacció:

DNA motlle	20-40 ng
Tampó de la Taq polimerasa (10X)	1X
Mg ₂ Cl	1-3 mM
dATP	200 µM
dGTP	200 µM
dCTP	200 µM
TTP	130 µM
DIG-dUTP	70 µM
Oligonucleòtid sentit	0,25 µM
Oligonucleòtid antisentit	0,25 µM
Taq DNA polimerasa	0,25 U

Es comprova mitjançant electroforesi en gel d'agarosa que la sonda ha estat amplificada.

Es purifica la sonda mitjançant el *High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche).

Una vegada la sonda està marcada, purificada i quantificada es pot emmagatzemar a -20 °C. Abans de ser afegida en el líquid d'hibridació, cal bullir-la durant 10 minuts i mantenir-la en gel durant 10 minuts més.

3.18.5 DOT BLOT

Aquesta tècnica permet comprovar que la sonda s'ha marcat correctament. Es fan una sèrie de dilucions de la sonda purificada, que es dipositen en un filtre de niló per tal de realitzar una immunodetecció.

PROTOCOL:

1. Es preparen dilucions de la sonda (1/4, 1/40, 1/400, 1/4000) en TE.
2. En una porció de filtre de niló Nytran (Schleicher & Schuell), marcar seccions quadrades, on es dipositaran mostres de les dilucions de la sonda, i mullar-lo en SSC 2 X.
3. Col·locar el filtre mullat sobre paper de filtre i dipositar 1 µL de cada dilució en el centre dels quadrats.
4. Fixar el DNA durant 3 minuts a l'ultraviolat o 2 hores a 80 °C.
5. Un cop s'ha fixat el DNA a la membrana es procedeix a realitzar la immunodetecció (3.18.7).

3.18.6 PREHIBRIDACIÓ, HIBRIDACIÓ I RENTATS DELS FILTRES AMB L'RNA FIXAT

Prehibridació

La prehibridació té com a funció bloquejar la membrana per impedir la unió inespecífica de la sonda.

Durant aquesta etapa posem en contacte les membranes que contenen l'RNA transferit amb el líquid d'hibridació en absència de la sonda marcada durant un mínim de 2 hores, a 50 °C en un forn rotatori d'hibridació (Problot, de Labnet).

PROTOCOL:

1. Rentar la membrana amb 15 mL de SSC 2x durant 5-10 minuts mentre la temperatura del forn d'hibridació arriba a 50 °C.
2. Incubar la membrana amb 15 mL de *High SDS buffer* a 50 °C durant 2 hores.

SOLUCIONS:

High SDS Buffer:

Formamida	15 mL
SSC 20x	7,5 mL
<i>Blocking reagent</i> (Roche)	0,6 g
Fosfat sòdic 1M	1,5 mL
N-laurylsarcosina 10 %	300 µL
SDS	2,1 g
H ₂ O mQ	qsp 30 mL

Hibridació i rentats

Aquest procés també es desenvolupa al forn d'hibridació, a la temperatura i períodes de temps adequats per a cada pas.

PROTOCOL:

1. Preparam la dilució de la sonda en funció dels resultats obtinguts en el *Dot Blot* (apartat 3.18.5).
 - 4-10 µL de sonda (prèviament bullida i refredada).
 - 15 mL de *High SDS Buffer*
2. Fer bullir la sonda amb 1 mL de *High SDS Buffer* durant 10 minuts. Seguidament, deixar refredar en gel 5 minuts. Aquest pas facilita la separació de la doble cadena de DNA de la sonda. Barregem la sonda que hem bullit amb la resta del tampó.
3. Incubar la membrana amb el líquid d'hibridació que conté la sonda durant 16 hores a 50 °C. El líquid d'hibridació s'emmagatzema a -20 °C (pot ser reutilitzat).
4. S'efectuen dos rentats consecutius amb 100 mL d'SSC 2 X i SDS 0,1 % durant 15 minuts a temperatura ambient.
5. Posteriorment, es duen a terme dos rentats d'alta astringència, que impliquen baixa concentració de sals i elevada temperatura. Aquests rentats s'efectuen amb 100 mL d'SSC 0,2 X i SDS 0,1 % durant 15 minuts a 68 °C.
6. Una vegada finalitzats els rentats es cobreix la membrana amb *Saran Wrap* i es guarda a 4 °C fins dur a terme la immunodetecció.

3.18.7 IMMUNODETECCIÓ, EXPOSICIÓ I REVELAT

La immunodetecció té com a finalitat detectar en el filtre la sonda marcada amb DIG-dUTP que ha quedat unida específicament a l'RNA. Per a tal fi, s'utilitza l'anticòs antiDIG-AP conjugat amb fosfatasa alcalina (Roche), i un substrat d'aquesta fosfatasa, CDP-StarTM (Roche).

Els experiments de *Northern blot* han estat normalitzats mitjançant la quantificació dels RNA ribosomals presents en el gel d'electroforesi, abans de realitzar la transferència.

PROTOCOL:

1. Incubar la membrana durant 4 minuts amb 50 mL de tampó de rentat.
2. Incubar la membrana 30 minuts amb 50 mL de tampó de bloqueig.
3. Seguidament s'incuba la membrana amb 9 mL de solució d'anticòs.
4. Efectuar 2 rentats durant 15 minuts amb 50 mL de tampó de rentat.
5. Equilibrar amb 50 mL de tampó de detecció durant 5 minuts.
6. S'introdueix la membrana en una bossa de plàstic on s'afegeix 1 mL de la solució amb substrat ben repartida per la superfície de la membrana.
7. La membrana s'exposa a una pel·lícula Hyperfilm (Amersham) i s'introdueix en una casset amb pantalla intensificadora de senyal. El temps d'exposició varia en funció de la intensitat del senyal.
8. Les pel·lícules es revelen amb la reveladora automàtica (*Medical X-ray Processor*, de Kodak).

Els passos 1-5 s'efectuen en agitació.

La quantificació dels senyals obtinguts s'ha efectuat a través de la utilització del programa *NIH Image 1.62* (*National Institutes of Health, USA*).

SOLUCIONS:

Tampó de rentat (0,5 L):

Àcid malèic	5,80 g
NaCl	4,38 g
Tween20	1,5 mL
H ₂ O mQ	qsp 500 mL
Ajustar pH 7,5	

Tampó d'àcid malèic (0,5 L):

Àcid Malèic	5,80 g
NaCl	4,38 g
H ₂ O mQ	qsp 500 mL
Ajustar pH 7,5	

Tampó de bloqueig 10x (50 mL):

<i>Blocking reagent</i> (Roche)	5 g
Tampó d'àcid malèic	qsp 50 mL

Solució d'anticòs (9 mL):

Anti-Digoxigenin-AP (Roche)	0,4 µL
<i>Blocking buffer</i> (Roche)	1 X

Tampó de detecció (0,5 L):

Tris-HCl	6,06 g
NaCl	2,92 g
H ₂ O mQ	qsp 500 mL
Ajustar pH 9,5	

Solució substrat *CDP-Star* (1 mL):

<i>CDP-Star</i> (Roche)	10 µL
Tampó de detecció	990 µL

3.19 RT-PCR A TEMPS REAL (qRT-PCR)

L'RT-PCR a temps real és una PCR quantitativa que permet mesurar la quantitat d'RNAm en una mostra.

El procés complet inclou l'aïllament de l'RNA, la seva retrotranscripció a cDNA i l'amplificació del cDNA mitjançant la PCR final. El sistema de qRT-PCR està basat en la detecció i quantificació d'un marcador fluorescent (Lee, 2004; Livac i Schmittgen 2001). Aquest senyal incrementa de manera proporcional a la quantitat de producte de PCR present a la reacció. Per a la monitorització de l'amplificació del DNA es va fer servir un agent d'unió al DNA: el SYBR Green. El SYBR Green és un fluoròfor que s'uneix a totes les cadenes dobles de DNA. Quan la molècula de SYBR Green s'intercala a la doble cadena de DNA, la seva fluorescència s'incrementa enormement (Morrison, 1998). Durant els diferents estadis de la PCR, la intensitat de la fluorescència variarà, depenent de la quantitat de DNA de doble cadena que està present.

PROTOCOL:

Mesclar en un tub eppendorf estèril:

cDNA diluït 1:10 en aigua	3.2 µL	CONDICIONS DE PCR:	
Oligonucleòtid sentit (10 µM)	1.6 µL (400 nM)	50 °C	2 minuts
Oligonucleòtid antisentit (10 µM)	1.6 µL (400 nM)	95 °C	10 segons
SYBR Green PCR Master Mix (2X)	20 µL (1X)	95 °C	15 segons
Aigua lliure de DNases	qsp 40 µL	62 °C	1 minut
		40 cicles (pas 3 a 4)	

Un cop fetes totes les mescles, es posen els tubs òptics en la gradeta de l'aparell i es dipositen 18 µL de cada mescla en dos tubs diferents, obtenint així els duplicats per a cada mostra. L'aparell utilitzat és un ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Com a gen reporter s'ha utilitzat el gen RNA ribosomal 18S d'orada.

El mètode utilitzat per determinar la quantitat relativa del nostre gen d'interès és el Mètode comparatiu del llinard (*Comparative threshold (Ct) method (ΔΔCt)*).

Un cop finalitzada la PCR, tindrem una corba on es representa la fluorescència obtinguda respecte el cicle de PCR. D'aquí obtindrem el valor Ct (cicle llinard o *cycle threshold*) que és el cicle en què es detecta un increment significatiu de ΔRn (magnitud de la senyal de fluorescent generada durant la PCR a cada punt) per primera vegada. Així, a major quantitat de cDNA de partida, el producte de PCR acumulat es detecta abans, i menor és el valor Ct. La fluorescència obtinguda, és normalitzada automàticament dividint la intensitat d'emissió del marcatge reporter per la intensitat d'emissió de la referència passiva. Com a referència passiva utilitzem el ROX (6-carboxi-X-rodamina), present a la mescla de SYBR Green, que proporciona una referència interna per a l'emissió de fluorescència de fons, usat per normalitzar la senyal del SYBR Green. Aquesta normalització és per les fluctuacions de fluorescència no relacionada amb la PCR que poden tenir lloc en els diferents pouets (diferències en volum o concentració, bombolles) o en el temps.

Un cop determinat el valor Ct, s'ha de calcular el ΔCt:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{gen reporter})$$

Aquest valor es calcula per a cada mostra que es desitja quantificar.

Posteriorment, una d'aquestes mostres s'escull com a valor de referència per efectuar la comparació amb cada mostra, obtindrem així el valor ΔΔCt.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{mostra X}) - \Delta Ct (\text{mostra de referència})$$

L'últim pas és transformar aquests valors en valors absoluts:

$$\text{Valor d'expressió} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Sempre que s'hagi de realitzar un qRT-PCR amb oligonucleòtids que no s'han emprat anteriorment, s'ha de dur a terme la corba de dissociació dels encebadors i la corba de concentracions.

a) Corba de dissociació dels oligonucleòtids

Aquest pas és important realitzar-lo al treballar amb SYBR Green, ja que a l'intercalar-se en la cadena doble de DNA de forma inespecífica, podríem estar detectant altres productes de PCR no específics o bé la

dimerització dels oligonucleòtids. El procediment es basa en detectar la fluorescència emesa per cada pouet a diferents temperatures. Idealment, les mostres haurien de donar lloc a un únic pic definit a la temperatura de fusió de l'amplicó, mentre que els pous on no s'ha afegit cDNA (els blancs fets amb aigua) no haurien de generar una senyal fluorescent significativa. Per tenir una certesa definitiva, però, de que el qRT-PCR ha donat lloc a l'amplificació d'una única banda i del tamany esperat, es fa una electroforesi d'algun producte de PCR i el seu control negatiu.

b) Corba de concentracions

Ens permetrà saber el rang de concentració inicial de mostra amb què obtindrem uns resultats de Ct acurats. Es determina fent varies dilucions del cDNA de prova i sotmetent-les a qRT-PCR. Es representen els valors logarítmics de la dilució respecte els valors Ct obtinguts. Hauria de sortir una línia recta tant pel gen normalitzador com pel gen en estudi.

3.20 WESTERN BLOT

La tècnica de *Western blot* s'utilitza per detectar proteïnes utilitzant un anticòs específic. Aquestes proteïnes han estat sotmeses prèviament a una resolució electroforètica en gels de poliacrilamida amb SDS, i a la transferència a una membrana de niló o nitrocel·lulosa.

3.20.1 ELECTROFORESI DE PROTEÏNES

L'electroforesi de proteïnes en gel d'SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) és una tècnica utilitzada per a la separació de proteïnes en funció del seu pes molecular. Consisteix en la desnaturalització de les proteïnes de la mostra amb SDS, que confereix càrrega negativa al complex. Les proteïnes desnaturalitzades se separen en una matriu de poliacrilamida en ser sotmeses a un camp elèctric. L'electroforesi es va realitzar seguint les indicacions de Laemmli (1970).

Preparació de les mostres

Una vegada obtinguda i quantificada la proteïna dels extractes (apartat 3.22), se'ls afegeix tampó de càrrega de proteïnes i es deixen bullir durant 5-10 minuts. L'ebullició en presència d'SDS i β -mercaptoetanol permet que les proteïnes es desnaturalitzin.

SOLUCIONS:

<u>Tampó de càrrega de proteïnes 4 X</u>	
Tris HCl pH 6,8	0,25 M
SDS	8 %
Glicerol	40 %
β -mercaptoetanol	20 %
Blau de bromofenol	0,04 %

El glicerol dóna densitat a les mostres, mentre que el colorant blau permet visualitzar el front durant l'electroforesi. El tampó es prepara 4X i es conserva al·liquotat a -20°C .

Preparació de gels de poliacrilamida

Per efectuar l'SDS-PAGE s'utilitzen gels que consten de dues parts: gel apilador i gel separador. Aquests es diferencien per la concentració de poliacrilamida i el pH.

La part superior formada pel gel apilador conté una proporció d'acrilamida del 4 %, de manera que la mida del porus del tramat és major. La funció d'aquest gel és alinear l'entrada de les proteïnes abans de ser separades. L'alineament de les proteïnes es dona a la interfase entre el gel separador i apilador degut a la diferència de pH entre ells.

La part inferior del gel està constituïda pel gel separador, amb un percentatge de poliacrilamida major (7-20 %) que genera un tamany de porus més petit que permet la separació de les proteïnes en funció del tamany molecular. Concentracions elevades de polímer milloren la resolució de mostres de pes molecular baix, mentre que gels separadors de concentració baixa afavoreixen la transferència posterior a membranes. Aquests gels s'han preparat utilitzant vidres i cubetes OWL.

SOLUCIONS:

<u>Gel separador (10% acrilamida, pH 8,8)</u>		<u>Gel apilador (4 % acrilamida, pH 6,8)</u>	
Acrilamida/bisacrilamida	3,3 mL	Acrilamida/bisacrilamida	1,3 mL
Tampó B	2,5 mL	Tampó A	2,5 mL
SDS al 10%	100 µL	SDS al 10%	100 µL
H ₂ O	4 mL	H ₂ O	6 mL
Persulfat amònic al 10%*	75 µL	Persulfat amònic al 10%*	75 µL
TEMED*	7,5 µL	TEMED*	6 µL

*El persulfat amònic actua com a polimeritzador de l'acrilamida/bisacrilamida, mentre que el TEMED catalitza la polimerització; no s'han d'afegir, per tant, fins al moment final de la preparació de cadascuna de les solucions que componen les diferents parts del gel.

Tampó A:

Tris HCl 0,5 M pH 6,8

Tampó B:

Tris HCl 1,5 M pH 8,8

Acrilamida/bisacrilamida:

30% acrilamida/Bis solution, 37,5:1 (2,6 %C) (BioRad)

Procés electroforètic

Per identificar els pesos moleculars de les proteïnes de les mostres en estudi, es carreguen en un carril marcadors pretenyits de pes molecular conegut, *Kaleidoscope Prestained Standards* (BioRad). Les mostres, amb igual quantitat de proteïna, es carreguen al gel per desenvolupar l'electroforesi a temperatura ambient. En cas d'utilitzar gels de 0,75 mm de gruix, el procés electroforètic es realitza a 15 mA durant la migració de les proteïnes pel gel apilador i a 20 mA quan entren en el separador. Si el gel és de 1,5 mm de gruix, o bé quan es fan córrer 2 gels simultàniament, la intensitat s'augmenta a 30 i 40 mA, respectivament. Es tracta d'un procés de durada variable, en funció de la concentració del gel separador i de la mida de les proteïnes a estudiar. De manera general, el procés acaba quan el front del colorant blau arriba a la part inferior del gel. Una vegada finalitzada l'electroforesi, es procedeix a la transferència de les proteïnes a la membrana de niló.

SOLUCIONS:

Tampó d'electroforesi

Tris HCl pH 8,3	0,025 M
Glicina	0,192 M
SDS	0,1 %

3.20.2 TRANSFERÈNCIA DE PROTEÏNES A MEMBRANA

Les proteïnes són transferides a una membrana de niló (NYTRAN 0,45 µm; Schleicher & Schuell) per electroelució a 60 V durant 2-3 hores a 4°C, en tampó de transferència.

PROTOCOL:

1. Es descarta el gel apilador. El gel separador es diposita sobre un rectangle de paper *Gel blotting paper* (Schleicher & Schuell), prèviament humidificat amb tampó de transferència de proteïnes, situat sobre una espongeta sobre la tapa negra de la casset de transferència (BioRad).
2. Sobre el gel es posa la membrana de niló prèviament humidificada on es volen transferir les proteïnes, sobre aquest es diposita un segon rectangle de paper i l'altra espongeta. És important fer rodolar un tub per sobre de la membrana per tal d'eliminar bombolles d'aire (repetir aquest procés en cada pas).
3. Tancar la casset i introduir-la en la cubeta de transferència (BioRad). Aplicar un voltatge de 60 V. Aquest procés té lloc a 4 °C durant 2 hores. Mantenir el tampó de transferència en agitació mitjançant una vareta magnètica.
4. Un cop efectuada la transferència, les proteïnes del gel poden ser tenyides amb el colorant Coomassie blue per veure si s'ha carregat la mateixa quantitat de proteïna en els diferents pous.

Tampó de transferència de proteïnes

Tris HCl	0,025 M
Glicina	0,192 mM
Metanol	20 %

Es prepara en el moment de la transferència.

Visualització de les mostres de proteïna en gels de poliacrilamida

El procediment de tinció es basa en la fixació del colorant blau de *Coomassie* a les proteïnes.

PROTOCOL:

1. S'incuba el gel en solució de tinció de *Coomassie* com a mínim 30 minuts a temperatura ambient.
2. Es renta varies vegades amb la solució de rentat fins eliminar la coloració inespecífica.
3. Els gels són assecats amb una bomba de buit a 70°C durant 3 hores.

SOLUCIONS:

Solució de tinció

Metanol	40 %
Àcid acètic glacial	7 %
Blau de <i>Coomassie</i>	0,025 %

Solució de rentat

Metanol	40 %
Àcid acètic glacial	7 %

3.20.3 BLOQUEIG DE LA MEMBRANA.

El procés de bloqueig es duu a terme per tal de reduir el soroll de fons durant la immunodetecció. El filtre on es troben les proteïnes transferides, es posa en agitació amb 100 mL de solució de bloqueig durant un mínim d'1 hora a temperatura ambient. Aquest tractament permet mantenir les membranes a 4°C durant 1 setmana abans de la seva utilització per a immunodetecció, si es va renovant periòdicament la solució de bloqueig.

SOLUCIONS:

		<u>PBS 10 X (pH 7,3)</u>	
<u>Solució blotto</u>		NaCl	137 mM
Llet descremada en pols		KCl	2,7 mM
(Central Lechera Asturiana)	10 %	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	4,3 mM
PBS	1 X	KH ₂ PO ₄	1,4 mM

3.20.4 IMMUNODETECCIÓ

Per efectuar la immunodetecció, hem seguit les pautes descrites per l'*Immunstar HPR Chemiluminiscence kit* (Bio-Rad). La tècnica es basa en la incubació successiva de la membrana amb dos anticossos. L'anticòs primari és una immunoglobulina G (IgG) que reconeix la proteïna d'interès. L'anticòs secundari és un anticòs anti-IgG, que reconeix l'anticòs primari i porta covalentment unit l'enzim peroxidasa. Aquest enzim catalitza l'oxidació del luminol en medi alcalí, originant la formació de quimioluminescència que serà captada en una pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm, Amersham).

PROTOCOL:

1. Incubar la membrana amb una dilució adequada de l'anticòs primari en una bossa de plàstic segellada, que mantindrem durant tota la nit a 4 °C en un agitador orbital. Alternativament, es pot dur a terme la incubació durant 60 minuts a temperatura ambient.
2. Retirar l'anticòs primari (conservar la solució a -20 °C per reutilitzar-la en experiments posteriors) i efectuar 3 rentats de la membrana, durant 10-15 minuts, amb 100 mL de solució de rentat.
3. Incubar la membrana amb l'anticòs secundari durant 60 minuts en agitació suau i a temperatura ambient.
4. Retirar l'anticòs secundari i efectuar 3 rentats com es descriu en el punt 2.
5. Preparar la solució de detecció: es mesclen a parts iguals la solució potenciadora de luminol i el tampó de peroxidasa i incubar la membrana amb aquesta solució durant 5 minuts
6. S'elimina l'excés de solució, es diposita en una bosseta de plàstic i es posa a contactar amb la pel·lícula fotogràfica durant 2-30 minuts i es revela la pel·lícula.

SOLUCIONS:

<u>Solució per diluir els anticossos</u>		<u>Solució de rentat</u>	
Llet descremada en pols	5 %	PBS	1 X
PBS	1 X	Tween 20 (Sigma)*	0,1 %
Tween 20 (Sigma)*	0,1 %		

* El Tween 20 és un detergent que dificulta les interaccions inespecífiques dels anticossos a la membrana, obtenint així imatges més netes i amb menor nombre de bandes inespecífiques. No obstant, no s'ha utilitzat quan s'han fet servir anticossos heteròlegs.

ANTICOSSOS UTILITZATS

Anti-HNF4α (Santa Cruz Biotechnology, referència sc-8987 X). Anticòs policlonal de conill dirigit contra els aminoàcids 295 a 465 de l'extrem C-terminal de HNF4α d'humà.

Anti-ALT d'orada (GenScript Corporation). Anticòs policlonal de conill obtingut contra el pèptid VPGSGFGQREGTFH de localització propera a l'extrem C-terminal i comú per a les cALT i mALT.

Anticòs secundari (Santa Cruz Biotechnology, referència sc-2004) anticòs IgG anticonill obtingut a partir de cabra.

3.21 OBTENCIÓ D'EXTRACTES CITOSÒLIC I MITOCONDRIAL

Els extractes citosòlic i mitocondrial s'obtenen per centrifugació diferencial.

PROTOCOL:

1. Pesar 100 mg de teixit i afegir el tampó per a l'obtenció de mitocondris en una relació 1:5 p/v.
2. Mantenir les mostres en gel i homogeneïtzar amb l'homogeneïtzador *Dounce* de vidre.
3. Centrifugar a 4 °C durant 15 minuts a 500 g.
4. Recollir el sobrenedant. En el sediment queden les restes cel·lulars.
5. El sobrenedant se centrifuga a 10.000 g durant 15 minuts.
6. Es recull el sobrenedant, que correspon al citosol
7. El sediment es renta dues vegades amb 1 mL de tampó d'aïllament de mitocòndries.
8. Després dels dos rentats, es resuspèn en tampó de lisi, per tal d'alliberar el contingut dels mitocondris.
9. Es quantifica la proteïna total seguint el mètode descrit en l'apartat 3.22.

SOLUCIONS:

Tampó per a l'aïllament de mitocondris:

Tris-HCl	50 mM pH 7,5
EDTA	0,5 mM
NaF	50 mM
Manitol	200 mM
Sacarosa	70 mM
PMSF	0,5 mM
DTT	1 mM

Tampó de lisi:

Tris-HCl	50 mM pH 7,5
EDTA	0,5 mM
NaF	50 mM
PMSF	0,5 mM
DTT	1 mM

3.22 QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES: MÈTODE DE BRADFORD

La determinació de la proteïna total es realitza seguint el mètode de Bradford (1976). Aquest mètode es basa en la formació de complexos entre les proteïnes i el colorant *Coomassie brilliant blue G-250*. Els complexos formats absorbeixen a una longitud d'ona de 600 nm, de manera que l'absorbància a aquesta longitud d'ona serà proporcional a la concentració de proteïna de la mostra. Aquesta determinació ha estat adaptada per ser efectuada a l'autoanaltzador COBAS MIRA S.

L'assaig s'ha dut a terme a 30 °C barrejant 5 µL d'extracte en un volum final de 250 µL i utilitzant el reactiu *BioRad Protein assay* (BioRad). Els valors d' A_{600} s'interpolen a una corba patró obtinguda amb solucions d'albumina sèrica bovina de concentracions entre 0,125 i 1 mg/mL.

3.23 ASSAIG DE RETARDACIÓ EN GEL (UNIÓ DNA-PROTEÏNA)

Tècnica que permet estudiar la interacció DNA-proteïna *in vitro*. Consisteix en la incubació de proteïnes (procedents d'extractes nuclears) amb un fragment de DNA marcat en l'extrem 3' amb dideoxinucleòtids units a DIG (DIG-ddUTP). La unió de proteïna-DNA genera un complex de mobilitat retardada en relació al fragment de DNA lliure al sotmetre les mostres a electroforesi en gel de poliacrilamida no desnaturalitzant.

3.23.1 OBTENCIÓ D'EXTRACTES NUCLEARS

Per a aquesta finalitat es va seguir el protocol descrit per Andrews i Faller (1991).

PROTOCOL:

A partir de teixit

1. Pesar uns 100 mg de teixit i afegir 1 mL de PBS. Homogeneïtzar amb el polytron en posició 3.
2. Centrifugar durant 10 segons a màxima velocitat. Es retira el sobrenedant.
3. Rentar el sediment dues vegades amb 1 mL de PBS. Aquest pas es realitza per eliminar les restes de greix del teixit.
4. Resuspendre en 400 µL de tampó A fred.
5. Incubar en gel durant 10 minuts.
6. Agitar al vòrtex durant 10 segons, i centrifugar 10 segons més.
7. Resuspendre el sediment (nuclis) en 20-100 µL de tampó C fred i incubar 20 minuts en gel.
8. Centrifugar durant 2 minuts a 13000 rpm, per tal de separar els residus cel·lulars de les proteïnes nuclears (sobrenedant).
9. Quantificar la proteïna del sobrenedant. Aliquotar i emmagatzemar a -80 °C.

SOLUCIONS:

Tampó A (Hypotonic buffer)

Hepes-KOH pH 7,9	10 mM
Mg Cl ₂	1,5 mM
KCl	10 mM
NaNO ₃	2 mM
NaF	2 mM

Tampó C (High Salt Buffer)

Hepes-KOH pH 7,9	20 mM
Glicerol	25 %
NaCl	420 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,2 mM

Abans de ser utilitzats cal afegir DTT 0,5 mM i PMSF 0,2 mM als tampons A i C.

3.23.2 PREPARACIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS MARCATS

S'utilitzen fragments de DNA de doble cadena d'una llargada d'uns 20 nucleòtids i 3' protuberants, que són marcats a l'extrem 3' amb una molècula de DIG-ddUTP mitjançant l'acció d'una transferasa terminal.

Obtenció d'oligonucleòtids de doble cadena

PROTOCOL:

1. Es mesclen 6 µg d'oligonucleòtid sentit i antisentit en un tub en presència de buffer M (Roche) fins a un volum final de 14 µL i es bullen durant 5 minuts
2. Es deixen refredar lentament fins arribar a temperatura ambient.
3. Es calcula la concentració de DNA en pmol/µL, segons la següent fórmula:

$$\frac{2 \times 10^6 \times \mu\text{g}/\mu\text{L} (\text{dsDNA})}{\text{Npb}^* \times 660 \text{ Da}}$$

*Npb: número de parells de bases de l'oligonucleòtid de doble cadena

Marcatge de fragments de DNA amb DIG-ddUTP

Els oligonucleòtids de doble cadena emprats a l'assaig de retardació foren dissenyats amb un nucleòtid extra a l'extrem 3' per afavorir l'activitat transferasa terminal. L'enzim transferasa terminal catalitza l'addició de nucleòtids a l'extrem 3' del DNA. Treballa en DNA de cadena senzilla, incloent els extrems protuberants en

3' de la doble cadena del DNA. El cobalt és un cofactor necessari per l'activitat de l'enzim. Aquest enzim es va utilitzar per marcar els oligonucleòtids de doble cadena per l'addició de digoxigenina a l'extrem 3'.

PROTOCOL:

1. Incubar la reacció a 37 °C durant 30 minuts.

dsDNA 3' protuberant	200 pmol
Tampó TdT (Roche) (5X)	4 µL (1X)
CoCl ₂ (25 mM)	4 µL (5mM)
DIG ddUTP (1 mM) (Roche)	1 µL (0.05 mM)
TdT (Roche)	1 µL
H ₂ O mQ	qsp 20 µL

2. Aturar la reacció afegint 2 µL d'EDTA 0,2 M.
3. Fer alíquotes i guardar a -20 °C.
4. Fer el *Dot Blot* per comprovar el marcatge (apartat 3.18.5).

3.23.3 REACCIÓ D'INTERACCIÓ PROTEÏNA-DNA MARCAT I ELECTROFORESI

Com a control s'utilitza la sonda sense extracte proteic, per tal de tenir una referència de mobilitat de la sonda lliure.

PROTOCOL:

1. Es mesclen els components de la reacció

Extractes nuclears	5-10 µL
Oligonucleòtid marcat (9.1 pmol/µL)	1 µL (9.1 pmol)
Poli [d(I-C)] (1 µg/µL)	1 µL (1 µg)
Tampó d'unió 5X	5 µL (1X)
H ₂ O mQ	qsp 20 µL

2. La mescla de reacció s'incuba durant 1h a 4 °C.

SOLUCIONS:

<u>Tampó d'unió:</u>		<u>Poli dI-dC (Roche):</u> es prepara la solució estoc dissolent el contingut del vial en 1 mL d'aigua mQ estèril, concentració final: 1 mg/mL. Es guarda alíquotat a -20°C. El poli dI-dC és un competidor no específic de DNA que s'empra per minimitzar la unió de proteïnes no específiques a la sonda de DNA.
Hepes, pH 7,6	100 mM	
EDTA	5 mM	
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM	
DTT	5 mM	
Tween 20	1 % (w/v)	
KCl	150 mM	

Els **assajos de competició** ens indiquen l'especificitat de la interacció entre l'oligonucleòtid marcat i la proteïna. Es realitzen per detectar la interacció entre el DNA (fragment del promotor marcat) i el factor de transcripció (proteïna) en estudi. En aquests estudis els extractes nuclears van ser preincubats durant 30 minuts amb un excés de la sonda control no marcada a 4°C, a continuació es va afegir l'oligonucleòtid marcat durant 30 minuts més.

En els **experimentes de súper retardació** la proteïna (factor de transcripció) és reconeguda per un anticòs, de manera que es forma un nou complex (anticòs-proteïna-oligonucleòtid) que apareix més retardat en el gel d'electroforesi, o bé la unió de proteïna-oligonucleòtid queda bloquejada. Es realitzen per verificar la unió del factor de transcripció específic al fragment del promotor. S'afegeixen a la mescla de reacció 1-10 µg de

l'anticòs abans d'addicionar l'oligonucleòtid marcat, i s'incuba a temperatura ambient durant 30 minuts. Posteriorment s'afegeix l'oligonucleòtid marcat i es continua amb la incubació de la reacció a 4 °C durant 45 minuts més.

La reacció d'unió s'atura afegint 5 µL de tampó de càrrega a la mescla de la reacció. Finalment, l'**electroforesi** es duu a terme en un gel de poliacrilamida al 5%, utilitzant TBE 0,5X com a tampó d'electroforesi, a 20 mA, a 4°C, durant 1 hora aproximadament.

SOLUCIONS:

Tampó de càrrega:

Blau de bromofenol	0,04 %
TBE	0,25 X
Glicerol	40 %

Acrilamida/bisacrilamida:

30% *acrilamida/Bis solution*, 37,5:1 (2.6%C) (BioRad)

Gel poliacrilamida (6 %):

TBE 10X	1,8 mL
Acrilamida/bisacrilamida	3,6 mL
Persulfat amònic 10%	75 µL
TEMED	15 µL
H ₂ O mQ	qsp 18 mL

TBE 10X:

Tris	890 mM
Àcid boric	890 mM
EDTA	0,5 M
H ₂ O	qsp 1 L
Ajustar a pH 8. Autoclavar	

3.23.4 TRANSFERÈNCIA I FIXACIÓ A LA MEMBRANA

Finalitzat el procés d'electroforesi el DNA és transferit per contacte (com a mínim 1 hora a temperatura ambient) a una membrana de niló Nytran (Schleicher & Schuell).

PROTOCOL:

1. Es retira un dels vidres que contenen el gel. Se situa l'altre vidre amb el gel a sobre, al damunt d'una superfície plana.
2. Es retalla una membrana de niló (Schleicher & Schuell) i es diposita sobre el gel.
3. A continuació es cobreix amb 3 fulls de paper secant *Whatman* (Schleicher & Schuell), i l'altre vidre a sobre.
4. A sobre del muntatge s'afegeix un pes d'1 kg aproximadament.
5. Es realitza el contacte durant 1 hora a temperatura ambient.
6. El DNA transferit es fixa a les membranes escalfant a 80 °C a un forn durant 2 hores o per entrecreuament, irradiant les membranes 3 minuts a l'UV.

3.23.5 IMMUNODETECCIÓ

Es realitza tal com es descriu en l'apartat 3.18.7.

CULTIU DE LLEVATS. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES

3.24 TRANSFORMACIÓ DE LLEVATS

Aquesta tècnica permet introduir DNA exogen circular en els llevats. El plasmidi que introduïm conté un gen de selecció que fa que es puguin seleccionar les soques que expressen el plasmidi i que aquest es repliqui.

El mètode utilitzat per a transformar els llevats és el de l'acetat de liti (Schiestl i Gietz, 1989).

Soca de *S.cerevisiae* utilitzada per expressar la isoforma mitocondrial ALT d'orada: YLR089c (Euroscarf, Frankfurt, Germany; genotype BY4743; MAT a/ α , his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ /leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YLR089c::kanMX4/YLR089c::kanMX4. Conté una delecció putativa de l'ALT mitocondrial.

Soca de *S.cerevisiae* utilitzada per expressar les isoformes citosòliques ALT d'orada: YDR111c (Euroscarf, Frankfurt, Germany; genotype BY4743; MAT a/ α , his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ /leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YDR111c::kanMX4/YDR111c::kanMX4. Conté una delecció putativa de l'ALT citosòlica.

PROTOCOL:

1. S'inoculen 10 mL de medi YPD amb una única colònia de la soca seleccionada. Es deixa créixer tota la nit en agitació a 30°C fins a saturació.
2. Una adequada quantitat del cultiu saturat s'inocula en 50 mL de medi YPD, tal que la OD₆₀₀ sigui de 0,3. Es deixa créixer durant 3 hores més.
3. Les cèl·lules se sedimenten per centrifugació a 100 g durant 5 minuts i es renten amb 30 mL d'aigua mQ estèril. Es centrifuga 5 minuts a 100 g i el sediment es resuspèn en 200 μ L d'acetat de liti (solució que els fa competents).
4. Per a cada transformació es mescla 100 μ g de carrier DNA amb 100 ng del DNA a transformar. S'afegeix 100 μ L de la suspensió de llevats i 600 μ L de solució PEG 4000 al 50% i es deixa en agitació a 30°C durant 30 minuts.
5. S'afegeix 70 μ L de DMSO i es fa el xoc tèrmic a 42°C durant 15 minuts. El DMSO i el xoc tèrmic fa que la paret de poliglicà i la membrana siguin permeables a l'entrada de DNA exogen.
6. Se centrifuguen les cèl·lules a 13000 rpm durant 5 segons. El sediment es resuspèn en 100 μ L de tampó TE 1X i es sembren les cèl·lules en plaques amb medi d'agar amb manca d'uracil (plaques CMUra) amb glucosa com a font de carboni.
7. S'incuba a 30°C fins que apareguin els transformants (2 a 3 dies).

SOLUCIONS:

Acetat de liti 10X:

1M acetat de liti, pH 7,5
Esterilitzat per filtració

TE 10X:

Esterilitzat per filtració

PEG 4000 50% pes/volum en aigua

Esterilitzat per filtració

Medi YPD pH 6.6:

10 g/L extracte de llevat
20 g/L peptona
20 g/L dextrosa
Esterilitzat a l'autoclau

CREIXEMENT DELS TRANSFORMANTS

Només els llevats que hagin incorporat el plasmidi podran créixer en les plaques sense uracil.

PROTOCOL:

1. S'inocula el transformant en un volum adequat de medi CM(ura⁻) amb un 2% de glucosa com a font de carboni i es deixa en agitació a 30°C fins que la OD₆₀₀ sigui aproximadament igual a 1.
2. La manera de prosseguir amb el creixement serà diferent en funció de si la proteïna a expressar és citosòlica (cALT1 o cALT2) o mitocondrial (mALT). Si la proteïna és mitocondrial, una quantitat adequada del cultiu inicial és inoculat al medi CM(ura⁻) amb un 2% d'àcid làctic per tal que la densitat òptica sigui igual a 0,1 i es creix a 30°C fins a una OD₆₀₀ igual a 1 (aproximadament 20h). Els llevats es creixen en presència de lactat per induir el nombre de mitòcondries a la cèl·lula. Si la proteïna a aïllar és citosòlica, es passa directament al pas 3, abans però, de passar al medi amb galactosa es centrifuga per eliminar la glucosa del medi.
3. Per tal d'induir l'expressió de la proteïna, s'afegeix un 2% de galactosa al medi de cultiu i es deixa créixer durant 20h més a 30°C.

SOLUCIONS:

Medi CM(ura⁻):

5 g/L (NH₄)₂SO₄

1.7 g/L *yeast nitrogen base* (YNB)

0.77 g/L *yeast dropout powder without uracil*.

La font de carboni pot ser glucosa,

lactat o galactosa al 2% p/v.

pH: 5. Autoclavat.

Medi sòlid CM(ura⁻):

Medi líquid CM(ura⁻) amb un 2% (p/v) d'agar.

pH: 6. Autoclavat

3.25 PREPARACIÓ DELS EXTRACTES PROTEICS DE LLEVAT

El procediment es basa en la ruptura de les cèl·lules mitjançant la utilització de boles de vidre i la posterior obtenció dels extractes mitjançant precipitació diferencial.

3.25.1 OBTENCIÓ DELS EXTRACTES CITOSÒLICS

PROTOCOL:

Tot el procediment es duu a terme a 4°C

1. Es recullen les cèl·lules per centrifugació a 3000 g durant 5 minuts.
2. Es renta 2 vegades amb aigua destil·lada freda.
3. Es resuspèn en tampó A.
4. S'afegeix la meitat de volum de boles de vidre (tamany 425-600 µm) fredes.
5. Per trencar les cèl·lules, els llevats amb les boles de vidre se sotmeten a 4 cicles de vòrtex durant 1 minut (màxima potència) seguit d'1 minut de repòs en gel.
6. Per eliminar les restes cel·lulars i les boles de vidre, se centrifuga a 500 g 5 minuts.
7. El sobrenedant se centrifuga a 11.000 g 10 minuts.
8. El sobrenedant resultant és l'extracte citosòlic. El precipitat es resuspèn en tampó A.
9. Els extractes obtinguts es guarden a -80°C amb un 20% de glicerol o es procedeix seguidament al dessalat.

SOLUCIONS:

Tampó A:

150 mM KCl

5 mM Tris-HCl pH 7.2

1 mM EDTA

Inhibidor de proteases de llevat (SIGMA)*

*L'inhibidor de proteases s'afegeix al moment en què es va a utilitzar el tampó.

3.25.2 OBTENCIÓ D'EXTRACTES MITOCONDRIALS

PROTOCOL:

Tot el procediment es duu a terme a 4°C

1. Es recullen les cèl·lules per centrifugació a 3000 g durant 5 minuts.
2. Es renta 2 vegades amb aigua destil·lada freda.
3. Es resuspèn en el tampó d'aïllament de mitocondris (MIB) de manera que els llevats no representin més d'un 25% del volum final.
4. S'afegeix la meitat de volum de boles de vidre (tamany 425-600 µm) fredes.
5. Per trencar les cèl·lules, els llevats amb les boles de vidre se sotmeten a 10 cicles de vòrtex durant 30 segons (màxima potència) seguit de 30 segons de repòs en gel.
6. Per eliminar les restes cel·lulars i les boles de vidre, se centrifuga a 800 g 15 minuts.
7. El sobrenedant se centrifuga a 10.000 g 15 minuts.
8. El sobrenedant resultant és el citosol. Els mitocondris (precipitat) es renten dues vegades amb 1 mL de MIB.
9. Es resuspèn el precipitat en un volum adequat de tampó de lisi.
10. L'extracte mitocondrial i citosòlic obtingut es guarda a -80°C amb un 20% de glicerol o es procedeix seguidament a la dessalació.

SOLUCIONS:

Tampó d'aïllament de mitocondris (MIB)

210 mM manitol
70 mM sacarosa
5 mM HEPES-KOH pH 7.35
1 mM EDTA
Inhibidor de proteases de llevat (SIGMA) *

Tampó de lisi:

5 mM HEPES-KOH pH 7.35
1mM EDTA
Inhibidor de proteases de llevat (SIGMA) *

*L'inhibidor de proteases s'afegeix al moment en què es va a utilitzar el tampó.

DESSALAT DE LA PROTEÏNA

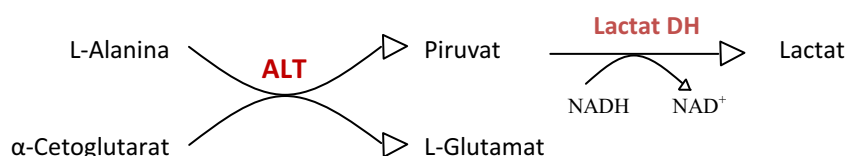
Abans d'assajar l'activitat enzimàtica, es dessala l'extracte proteic mitjançant una columneta de Sephadex G25 per tal que els ions de l'extracte no influeixin en la mesura de l'activitat enzimàtica. Una vegada obtinguda la proteïna dessalada, s'afegeix inhibidor de proteases i un 20% de glicerol, s'aliquota i es guarda a -80°C.

CINÈTICA ENZIMÀTICA

3.26 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ALT (REACCIÓ DIRECTA)

La mesura de l'activitat ALT mitjançant la transaminació des d'L-alanina a α -cetoglutarat per a formar L-glutamat i piruvat (reacció directa), fou mesurada mitjançant l'acoblament d'una segona reacció enzimàtica en què s'utilitza un dels productes de la reacció (piruvat) com a substrat de la reacció acoblada. En la segona reacció, la lactat deshidrogenasa utilitza NADH com a cosubstrat, de forma equimolar respecte el substrat de la reacció (piruvat), i que s'oxida a NAD^+ . La reacció va ser mesurada a 30°C en l'autoanalitzador espectrofotomètric Cobas Mira S (Hoffman-La Roche) en monitoritzar l'oxidació de NADH a 340 nm.

Reacció directa:



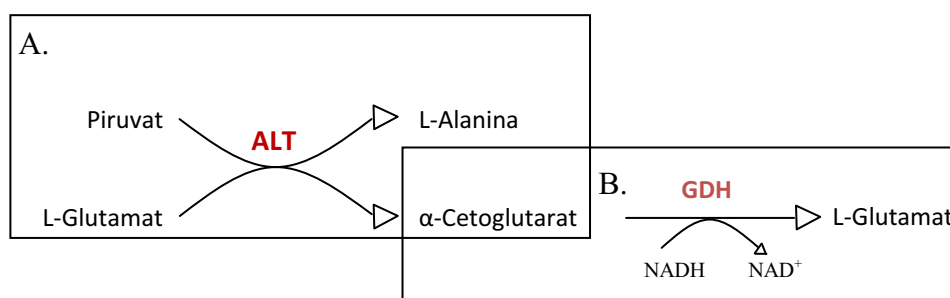
Mescla per a la determinació de la reacció directa ALT:

L-alanina (SIGMA) a diferents concentracions
 α -cetoglutarat (SIGMA) a diferents concentracions
 0,1 M Tris-HCl, pH 7,12
 0,18 mM NADH (Roche)
 1,4 U/mL lactat deshidrogenasa (Roche)
 15 μL d'extracte proteic de llevat dessalat
 Aigua qsp 200 μL

En els estudis cinètics, es van assajar diferents concentracions d'alanina i α -cetoglutarat.

3.27 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ALT (REACCIÓ INVERSA)

La mesura de l'activitat ALT mitjançant la reacció de transaminació del glutamat a piruvat per formar alanina i α -cetoglutarat (reacció inversa), fou mesurada indirectament per l'acoblament d'una segona reacció enzimàtica en què s'utilitza un dels productes de la reacció (α -cetoglutarat) com a substrat de la reacció acoblada. En la segona reacció, la glutamat deshidrogenasa utilitza NADH com a cosubstrat, de forma equimolar respecte el substrat de la reacció (α -cetoglutarat), que s'oxida a NAD^+ . La reacció va ser mesurada a 30°C en l'autoanalitzador espectrofotomètric Cobas Mira S (Hoffman-La Roche) en monitoritzar l'oxidació de NADH a 340 nm.



La determinació de la reacció inversa es va dur a terme en dues fases.

- A. La primera reacció catalitzada per l'ALT, converteix el piruvat i L-glutamat a L-alanina i α -cetoglutarat.

PROTOCOL:

1. Mescla per a la reacció inversa d'ALT:

L-glutamat (SIGMA) a diferents concentracions
 Piruvat (SIGMA) a diferents concentracions
 0,1 M Tris-HCl, pH 7,65
 17 μ L d'extracte proteic de llevat dessalat
 Aigua qsp 170 μ L

2. Les mescles de reacció es dipositen en tubs d'1.5 ml i es dipositen a un bany a 30°C. Després de 0, 3 i 6 minuts, 50 μ L de la mescla de reacció s'afegeixen a un tub que conté 5 μ L de TCA fred. El TCA precipita les proteïnes i s'utilitza per aturar la reacció.
3. Centrifugar durant 2 minuts a màxima velocitat.
4. 40 μ L de sobrenedat es passen a un altre tub i s'afegeixen 8 μ L de NaOH 3M per neutralitzar el TCA.

B. La segona reacció és la de la GDH, que converteix l' α -cetoglutarat present a la mescla en L-glutamat alhora que oxida el NADH a NAD⁺.

5. Es mesura a l'autoanaltzador Cobas Mira S la quantitat d' α -cetoglutarat present a la mostra mitjançant la reacció catalitzada per la GDH en la següent mescla de reacció:

5 μ L sobrenedant de la reacció ALT
 0,18 mM NADH (Roche)
 10.04 U/mL GDH (SIGMA)
 0,1M Tris pH 7,82
 aigua qsp 100 μ L

Per a ambdues reaccions, una unitat d'enzim va ser definida com a la quantitat d'enzim que produeix 1 μ mol de producte per minut (o consum d'1 μ mol de NADH per minut). El contingut de proteïna en els extractes de llevat va ser determinada en el Cobas Mira S a 600 nm pel mètode de Bradford (1976) a 30°C, usant l'albumina sèrica bovina com a estàndard.

Les constants cinètiques foren determinades d'acord amb Segel (1993). Els valors de K_m i V_{max} per a l'mALT foren calculats a partir de la representació de V_{max} i K_m aparents obtingudes a diferents concentracions dels cosubstrats:

1. Es representen en un gràfic els inversos de les concentracions del substrat 1 amb els inversos de l'activitat ALT obtinguda a diverses concentracions fixes del substrat 2.
2. S'escullen aquells punts en què la relació és lineal i es calcula l'equació de la recta amb cadascuna d'elles. Es descarten aquells punts en què s'observa inhibició per substrat.
3. Per a les concentracions de substrat 2 seleccionades es calcula la K_m aparent i V_{max} aparent per a cadascuna de les rectes de la següent manera:
 $y = a + bx$
 $V_{max} \text{ aparent} = 1/a$
 $K_m \text{ aparent} = b * V_{max} \text{ aparent}$
4. Es representen en un gràfic els inversos de les V_{max} aparents respecte els inversos de les concentracions del substrat 2. A partir de l'equació de la recta podrem calcular la K_m per al substrat 2 i la V_{max} de la reacció:
 $K_m \text{ substrat 2} = b/a$
 $V_{max} = 1/a$
5. Es representen en un gràfic els inversos de les K_m aparents respecte els inversos de les concentracions del substrat 2. A partir de l'equació de la recta podrem calcular la K_m per al substrat 1 i la K_m per al substrat 2:
 $K_m \text{ substrat 1} = 1/a$
 $K_m \text{ substrat 2} = b * K_m \text{ substrat 1}$
6. Es repeteix la mateixa operació representant en aquesta ocasió en un gràfic els inversos de les concentracions del substrat 2 amb els inversos de l'activitat ALT obtinguda a diverses concentracions fixes del substrat 1. Aquest procediment s'ha de dur a terme tant pels substrats de la reacció directa com de la inversa.

3.28 ANÀLISI ESTADÍSTIC DELS RESULTATS

L'anàlisi estadístic dels resultats s'ha efectuat amb el programa *GraphPad Prism 5*. Per determinar si les diferències entre dues condicions experimentals són significatives s'ha utilitzat el test T d'Student; el test Anova es va emprar quan les condicions a comparar eren tres o més.

CULTIUS DE LÍNIES CEL·LULARS EUCARIOTES I TRANSFECCIONS

El manteniment de cultius cel·lulars es realitza en condicions estèrils. Es treballa en campana de flux laminar. La sala de treball i la campana s'irradien amb llum ultraviolada quan no són utilitzades. La superfície de la campana de flux laminar es descontamina amb etanol al 70 % i amb altres productes adequats (Virkon, Bayer) a l'inici i final del seu ús. Tot el material emprat és prèviament esterilitzat a l'autoclau. Els medis i solucions es compren estèrils o bé s'esterilitzen mitjançant filtres de 0,22 µm o amb l'autoclau.

Línia cel·lulars utilitzada

Cèl·lules HEK293: (ATCC CLR-1573) línia cel·lular derivada de ronyó embrionari humà.

Les cèl·lules creixen i es mantenen amb medi DMEM (Gibco) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS), 2 mM de glutamina, 110 mg/L de piruvat sòdic, 100 UI/mL de penicil·lina i 100 µg/mL d'estreptomicina en un incubador a 37 °C amb atmosfera humida al 5 % de CO₂.

Medis i reactius emprats

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. (Gibco).

FBS: *Foetal Bovine Serum* (Gibco). Cal escalfar-lo a 50 °C durant 20 minuts abans de ser utilitzat, per tal d'inactivar les proteïnes del complement.

Penicil·lina/estreptomicina: Solució de 10000 U/mL penicil·lina i 5000 µg/mL estreptomicina (Gibco).

Tripsina: Tripsina-EDTA (1X), (Gibco).

PBS 10 X (pH 7,3)

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄·12H₂O 4,3 mM

KH₂PO₄ 1,4 mM

Ajustat el pH a 7.3 i autoclavat.

3.29 ARRENCADA, MANTENIMENT I CONGELACIÓ DEL CULTIU CEL·LULAR

3.29.1 ARRENCADA DEL CULTIU CEL·LULAR

Les cèl·lules es mantenen congelades a -80 °C per a períodes curts (mesos) i per a períodes llargs (anys) es mantenen congelades en criotubs en nitrogen líquid.

PROTOCOL:

1. Descongelar les cèl·lules ràpidament a 37 °C.
2. Traspasar el contingut del vial a un tub falcon amb 7 mL del medi.
3. Centrifugar a 1000 rpm durant 5 minuts.
4. Eliminar el sobrenedant. Resuspendre les cèl·lules en un volum adequat de medi complet.
5. Transferir el contingut del falcon a plaques de cultiu.

3.29.2 MANTENIMENT DELS CULTIUS CEL·LULARS: TRIPSINITZACIÓ

La confluència de cèl·lules en cultiu podria causar canvis en les característiques bioquímiques i funcionals de les cèl·lules. La tripsinització ens permet separar les cèl·lules de la superfície de la placa on es troben adherides, per diluir-les periòdicament.

PROTOCOL:

1. Aspirar el medi.
2. Rentar les cèl·lules amb 5 mL de PBS 1 X. Aspirar.*
3. Incubar les cèl·lules amb 1 mL de tripsina durant 5 minuts aproximadament.
Es resuspenen les cèl·lules en 9 mL de medi complet.
4. Afegir la suspensió de cèl·lules en un flascó o placa nou que conté la quantitat apropiada de medi per fer la dilució desitjada.

*L'etapa de rentat amb PBS 1X és imprescindible per eliminar les restes de medi amb sèrum, que inhibirien l'acció de la tripsina.

La freqüència de tripsinització depèn de la velocitat de creixement de la línia cel·lular i de la dilució inicial de la placa.

3.29.3 CONGELACIÓ DE CÈL·LULES

PROTOCOL:

1. Tripsinitzar les cèl·lules.
2. Recollir-les en un falcon amb 10 mL de medi complet.
3. Centrifugar a 2200 g a 4 °C. Resuspendre les cèl·lules sedimentades amb 1 mL de medi complet que conté un 20 % de sèrum fetal boví i un 10 % de DMSO (crioprotector), i s'aliquoten en criotubs.
4. Es procedeix a la congelació progressiva de les mostres: es congelen les cèl·lules a -20 °C, passades 2-4 hores es passen a -40 °C, i l'endemà es guarden a -80 °C o en N₂ líquid.

3.30 TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA DE CÈL·LULES

La transfecció és una tècnica que permet introduir DNA exogen en cèl·lules eucariotes. En el cas de transfeccions transitòries el DNA exogen no s'integra en el genoma, de manera que no es replica conjuntament amb el DNA genòmic de la cèl·lula ni es transmet a les cèl·lules filles.

Existeixen diversos protocols per efectuar una transfecció transitòria, generalment basats en l'alteració transitòria de la permeabilitat de la membrana cel·lular. Entre aquests mètodes podem destacar: la transfecció amb fosfat càlcic, la transfecció per DEAE-dextrà/cloroquina, l'electroporació i la transfecció facilitada per complexos lipídics. L'elecció d'un mètode o un altre dependrà del tipus cel·lular a transfectar.

3.30.1 TRANSFECCIÓ MITJANÇANT EL MÈTODE DEL FOSFAT CÀLCIC

Aquest mètode es basa en la coprecipitació del DNA exogen i el fosfat càlcic, per facilitar la penetració del DNA dins la cèl·lula (Graham i Van der Eb, 1973). La maquinària de transcripció endògena permetrà l'expressió dels gens introduïts.

Una vegada disposem de les cèl·lules en quantitat adequada (45-50 % de confluència en plaques de 6 pous) procedirem a la transfecció.

PROTOCOL:

1. Preparar la mescla de DNA a transfectar.

 Mescla per cada 2 pous de 3 cm de diàmetre

Constructe d'interès	4 µg
pCMVβ (control de la transfecció)	0,5 µg
Plasmidi que codifica pel factor de transcripció d'interès	0,4 µg
H ₂ O mQ	qsp 180 µL

2. Afegir a la mescla 20 µL de CaCl₂ 2,5 M i mesclar amb el vòrtex.
3. Afegir gota a gota 200 µL de BBS 2 X a l'interior d'un tub eppendorf que conté la mescla de DNA i CaCl₂, al mateix temps que es mescla.
4. Comprovar al microscopi de contrast de fases, amb una gota de cadascuna de les mescles, la formació de precipitats (temps màxim de 20 minuts).
5. Transfectar afegint 200 µL a cada pouet.
6. Incubar durant 16-24 hores les cèl·lules transfectades per permetre l'expressió dels plasmidis transfectats.
7. Recollir les cèl·lules.

SOLUCIONS:

BBS 2X

BES pH 7 *	100 mM
NaCl	5 M
Na ₂ HPO ₄	0,5 M
H ₂ O mQ	qsp 50 mL

Esterilitzar filtrant, corregir el pH si és necessari i després tornar a filtrar.

* El pH adequat per afavorir la formació de precipitat és aproximadament 7. És important realitzar proves de formació de precipitat amb el BBS 2 X ajustat a diferents pH, en un rang entre 6,8 i 7,2. El pH del BBS és un paràmetre crític per produir un bon precipitat.

3.31 ANÀLISI DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL

3.31.1 RECOL·LECCIÓ DE CÈL·LULES:

Per obtenir els extractes cel·lulars a partir de cèl·lules transfectades s'utilitza el reactiu de lisi *Cell Culture Lysis Reagent –CCLR* (Promega).

PROTOCOL:

1. Aspirar el medi.
2. Rentar cada pouet de la placa amb 1 mL de PBS 1 X.
3. Aspirar el PBS i afegir 300 µL del reactiu CCLR per pou.
4. Deixar actuar el CCLR fins que s'observi que el lisat es desprèn agitant suaument la placa.
5. Transferir el lisat a tubs eppendorf i centrifugar 15 segons a temperatura ambient.
6. Transferir el sobrenedant a un nou tub eppendorf.

3.31.2 ASSAIG DE L'ACTIVITAT β -GALACTOSIDASA

Les transfeccions s'han dut a terme incloent en les barreges de transfecció un plasmidi que codifica per al gen de la β -galactosidasa sota el control del promotor del citomegalovirus (pCMV β). Els resultats obtinguts en els assajos de β -galactosidasa han estat utilitzats per normalitzar les eficiències de transfecció.

PROTOCOL:

1. Mesclar 50 μ L de lisat cel·lular obtingut amb 100 μ L de la següent mescla:

MgCl ₂	0,3 mM
ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosid)	0,9 mM
β -Mercaptoetanol	13,5 mM
Tampó fosfat pH 7,5	0,1 M

2. Incubar a 37 °C fins que la barreja adquireix una coloració groga (degut a que la β -galactosidasa trenca el substrat ONPG en dos compostos, un dels quals és de color groc).
4. Aturar la reacció afegint-hi 250 μ L de Na₂CO₃ 0,5 M.
5. Llegir la OD₄₂₀ a l'espectrofotòmetre.

SOLUCIONS:

ONPG (AppliChem):

Es prepara una solució de 4 mg/mL d'ONPG en tampó 0,1 M Na₂PO₄ pH 7,5. Es dissol amb l'ajuda d'un agitador magnètic en un recipient protegit de la llum. Una vegada dissolt s'aliquota en tubs eppendorfs i s'emmagatzema a -20 °C.

Tampó fosfat

NaH ₂ PO ₄	0,2 M
Na ₂ HPO ₄	0,2 M
H ₂ O mQ qsp	100 mL
Ajustar el pH a 7,5 i conservar-lo a 4 °C.	

3.31.3 ASSAIG DE L'ACTIVITAT LUCIFERASA

L'activitat luciferasa fou mesurada en 5 μ L del lisat després de l'adició de 20 μ L de *Luciferase Assay Reagent*. Aquest reactiu conté luciferina, que és utilitzada com a substrat per la luciferasa expressada a les cèl·lules, donant com a resultat luminescència, que pot ser detectada en un luminòmetre. El luminòmetre utilitzat va ser el *Luminometer Turner Design TD-20/20*.

3.31.4 ANÀLISI DELS RESULTATS

Per determinar les vegades d'inducció de l'activitat luciferasa respecte un control, el primer pas és dividir l'activitat luciferasa entre el valor d'absorbància obtingut de l'assaig de la β -galactosidasa, per tal de normalitzar l'activitat per l'eficiència de la transfecció en cada condició. Per a cada duplicat, es fa una mitja dels valors. A continuació el valor del control es divideix entre totes les altres condicions, obtenint així les vegades d'inducció de l'activitat luciferasa relatiu al control.

4. RESULTATS

4. RESULTATS

4.1 CLONACIÓ DE FRAGMENTES DE cDNA CORRESPONENTS ALS ENZIMS GlnS, AST2 I GDH D'ORADA

Per obtenir oligonucleòtids específics per a GlnS, AST2 i GDH d'orada per assajos de qRT-PCR, prèviament es va clonar un fragment dels cDNA corresponents, ja que no es disposava d'aquestes seqüències a les bases de dades. El procediment va consistir en cercar les seqüències de proteïna i cDNA corresponents als gens que codificaven aquests enzims en altres organismes, per fer un alineament múltiple entre elles mitjançant *ClustalW*. De les regions amb major homologia es van dissenyar oligonucleòtids específics i es va procedir a realitzar una PCR utilitzant com a DNA motlle el cDNA de fetge d'orada (obtinguts a partir d'una mescla d'RNAm de peixos alimentats i dejunats). Es van seqüenciar diversos clons positius i es va determinar la seqüència parcial del cDNA que codifica per a cadascun dels enzims, prèviament a ser utilitzada pel disseny d'oligonucleòtids per qRT-PCR.

Per dissenyar els encebadors de la GlnS, es van apilar les seqüències NP_853537.1 i NP_878286.2, corresponents a dues isoformes descrites per a *D. rerio*. Es va fer una PCR amb els oligonucleòtids MCGSF/MCGSR utilitzant com a DNA motlle cDNA de fetge d'orada i es va obtenir un fragment de 287 pb. A partir d'aquesta seqüència es van dissenyar els encebadors MC201 i MC202 per dur a terme els experiments de qRT-PCR en què s'amplificava un fragment de 178 pb.

Per dissenyar els oligonucleòtids per amplificar l'AST2 d'orada, es van apilar les seqüències AST mitocondrials descrites per a *D. rerio* (NP_998544.1 i NP_956283.1) i es van escollir dues regions que eren idèntiques per a ambdues isoformes per dissenyar els encebadors sentit i antisentit; alhora aquestes seqüències eren diferents a la isoforma citosòlica descrita per a *D. rerio* (NP_998222.1). Es va fer una PCR emprant com a encebadors MCAST2F i MCAST2R i com a DNA motlle cDNA de fetge d'orada, obtenint així un producte de PCR de 157 pb. A partir d'aquesta seqüència es van dissenyar un parell d'oligonucleòtids per a qRT-PCR (MC203 i MC204), que amplifiquen un fragment de 96 pb.

Per a la GDH, es van apilar les seqüències NP_997741 i NP_955839, corresponents a GDH1a i GDH1b de peix zebra i NP_005262 i NP_036216, corresponents a les isoformes GDH1 i GDH2

humanes. Es van dissenyar dos oligonucleòtids (MCGLUDF i MCGLUDR) amb què es va fer una PCR amb el cDNA de fetge d'orada. Com a resultat, es va obtenir un fragment de 649 pb que es va utilitzar per dissenyar els encebadors per a qRT-PCR (MC205 i MC206) que permeten amplificar una regió de 154 pb.

Les seqüències obtingudes per a la GDH i la GlnS van ser dipositades a la base de dades DDBJ/EMBL/Gene Bank amb els números d'accés provisionals: BankIt1467940 i BankIt1467943, respectivament.

4.2 DISTRIBUCIÓ TISSULAR D'mALT, GlnS, AST2 I GDH EN ORADA

A partir d'RNA total aïllat d'orades alimentades, i mitjançant la tècnica de qRT-PCR, s'ha determinat l'expressió d'mALT, GlnS, AST2 i GDH, enzims implicats en el metabolisme d'aminoàcids, en diferents teixits: fetge, cervell, múscul esquelètic, cor, intestí, ronyó, brànquies, melsa i teixit adipós (veure apartat 3.1.2).

Aquest estudi revela que l'mALT s'expressa en tots els teixits d'orada analitzats. Els teixits on l'expressió d'mALT és més elevada són el ronyó, fetge i intestí, on l'expressió és 10, 5 i 4 vegades superior a aquells on s'observa menor expressió, com la melsa i el múscul esquelètic (figura 11).

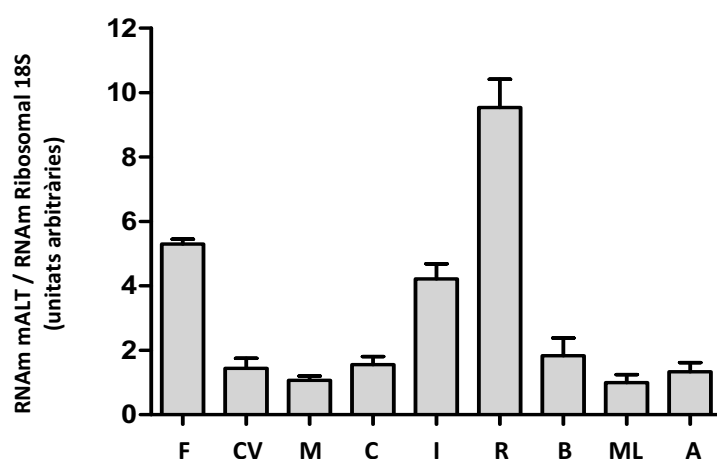


Figura 11: Anàlisi per qRT-PCR de l'expressió d'mALT en diferents teixits d'*S. aurata*.

L'RNA total extret de fetge (F), cervell (CV), múscul esquelètic (M), cor (C), intestí (I), ronyó (R), brànquies (B), melsa (ML) i teixit adipós (A) d'orades alimentades es va sotmetre a una transcripció inversa i posterior anàlisi per qRT-PCR. Els nivells d'RNAm d'mALT (oligonucleòtids MC13/MC14) relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S (oligonucleòtids RT18S/RT18AS), són expressats com a la mitja \pm SD corresponent a 2 pools de teixits procedents de 4 a 5 peixos cadascun, valors obtinguts a partir de 2 experiments independents.

Resultats similars van ser obtinguts mitjançant assajos d'RT-PCR semiquantitatiu (figura 12).

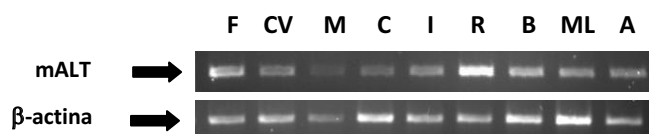


Figura 12. Anàlisi per RT-PCR semiquantitatiu de l'expressió d'mALT en diferents teixits d'*S. aurata*.

L'RNA total extret de fetge (F), cervell (CV), múscul esquelètic (M), cor (C), intestí (I), ronyó (R), brànquies (B), melsa (ML) i teixit adipós (A) d'orades alimentades es va sotmetre a una transcripció inversa i a una posterior anàlisi per PCR utilitzant oligonucleòtids específics per a l'mALT (IMAL28 i IMAL29). Com a control intern de la qualitat i quantitat de l'RNA es va analitzar l'expressió de la β-actina, que es va amplificar mitjançant la utilització dels oligonucleòtids BA0199 i BA0299. Els productes de PCR varen ser analitzats per electroforesi en gel d'agarosa al 2%, i visualitzats mitjançant la tinció del gel amb bromur d'etidi. Es representa el resultat d'un experiment realitzat a partir de fetge d'orades alimentades.

Adicionalment, es va determinar la distribució tissular dels enzims GlnS, AST2 i GDH, importants en el metabolisme d'aminoàcids i presents també al mitocondri. La GlnS, d'acord amb la funció de detoxificació d'amoni en cervell, s'expressa principalment en aquest òrgan, on els seus nivells són 625 vegades superiors als trobats en múscul. En fetge i intestí l'expressió és 6 i 10 vegades inferior a l'observada en cervell, respectivament, i 97 i 66 vegades superiors als nivells en múscul.

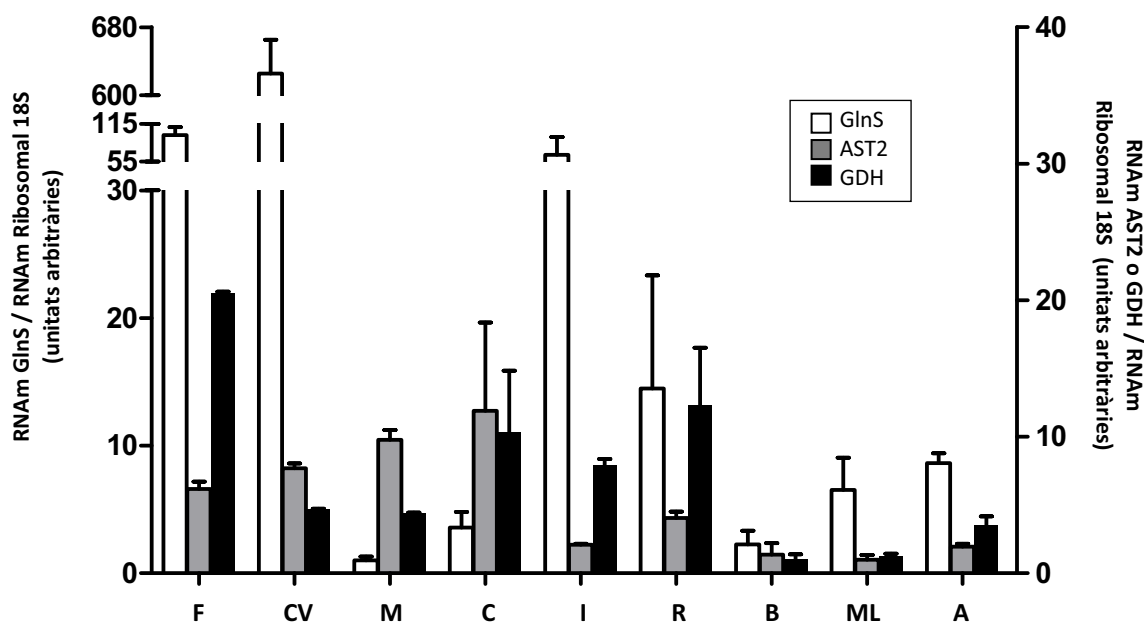


Figura 13: Anàlisi per qRT-PCR de l'expressió de GlnS, AST2 i GDH en diferents teixits d'*S. aurata*.

L'RNA total extret de fetge (F), cervell (CV), múscul esquelètic (M), cor (C), intestí (I), ronyó (R), brànquies (B), melsa (ML) i teixit adipós (A) d'orades alimentades es va sotmetre a una transcripció inversa i a un posterior anàlisi per qRT-PCR. Els nivells d'RNAm de GlnS, AST2 i GDH relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a la mitja ± SD de 2 pools de teixits procedents de 4 a 5 peixos cadascun, valors obtinguts a partir de 2 experiments independents.

Altres òrgans com ara el ronyó, melsa i teixit adipós també expressen la GlnS de manera significativa. L'AST2 presenta una distribució més homogènia en els diferents teixits, essent el cor, múscul esquelètic, cervell i fetge els teixits on la seva expressió és més important, 11 a 6 vegades superiors que la melsa. La GDH s'expressa majoritàriament a fetge, on la seva presència és 20 vegades superior a la de melsa; ronyó, cor i intestí també exhibeixen una elevada expressió de GDH, al voltant de 10 vegades superior que a la melsa (figura 13).

4.3 REGULACIÓ HORMONAL I NUTRICIONAL DE L'EXPRESSIÓ D'mALT, GlnS, AST2 I GDH

Per tal d'analitzar la implicació d'mALT, GlnS, AST2 i GDH en el metabolisme intermediari en fetge i d'mALT en ronyó, es va analitzar l'expressió d'aquests enzims en peixos sotmesos a diferents condicions hormonals i nutricionals (veure apartats 3.1.2, 3.1.3 i 3.1.4).

4.3.1 EFECTE DE L'ESTAT NUTRICIONAL

Assajos de qRT-PCR mostren que l'expressió i activitat d'mALT es modula en resposta al dejú i a la realimentació. En fetge d'orades sotmeses a dejú durant 19 dies, els nivells d'RNAm d'mALT van experimentar una disminució d'un 50% respecte el grup de peixos alimentats. Sis hores després de la realimentació dels peixos, els nivells d'RNAm eren similars als observats en situació de dejú. Els nivells d'RNAm d'mALT van recuperar els valors observats en peixos alimentats a partir de les 24 hores de realimentació (figura 14A). L'activitat ALT, tant en citosol com al mitocondri, disminueix en resposta al dejú, en un 40% i 65% respectivament, en relació a l'activitat observada en peixos alimentats; aquesta activitat, a les 6h i després d'1 dia de realimentació encara mostren valors similars als observats en situació de dejú. Els nivells d'activitat es recuperen després de 8 dies de realimentació (figura 14C).

Per altra banda, el dejú també promou una disminució d'un 60% en els nivells d'RNAm d'mALT en ronyó (figura 14B).

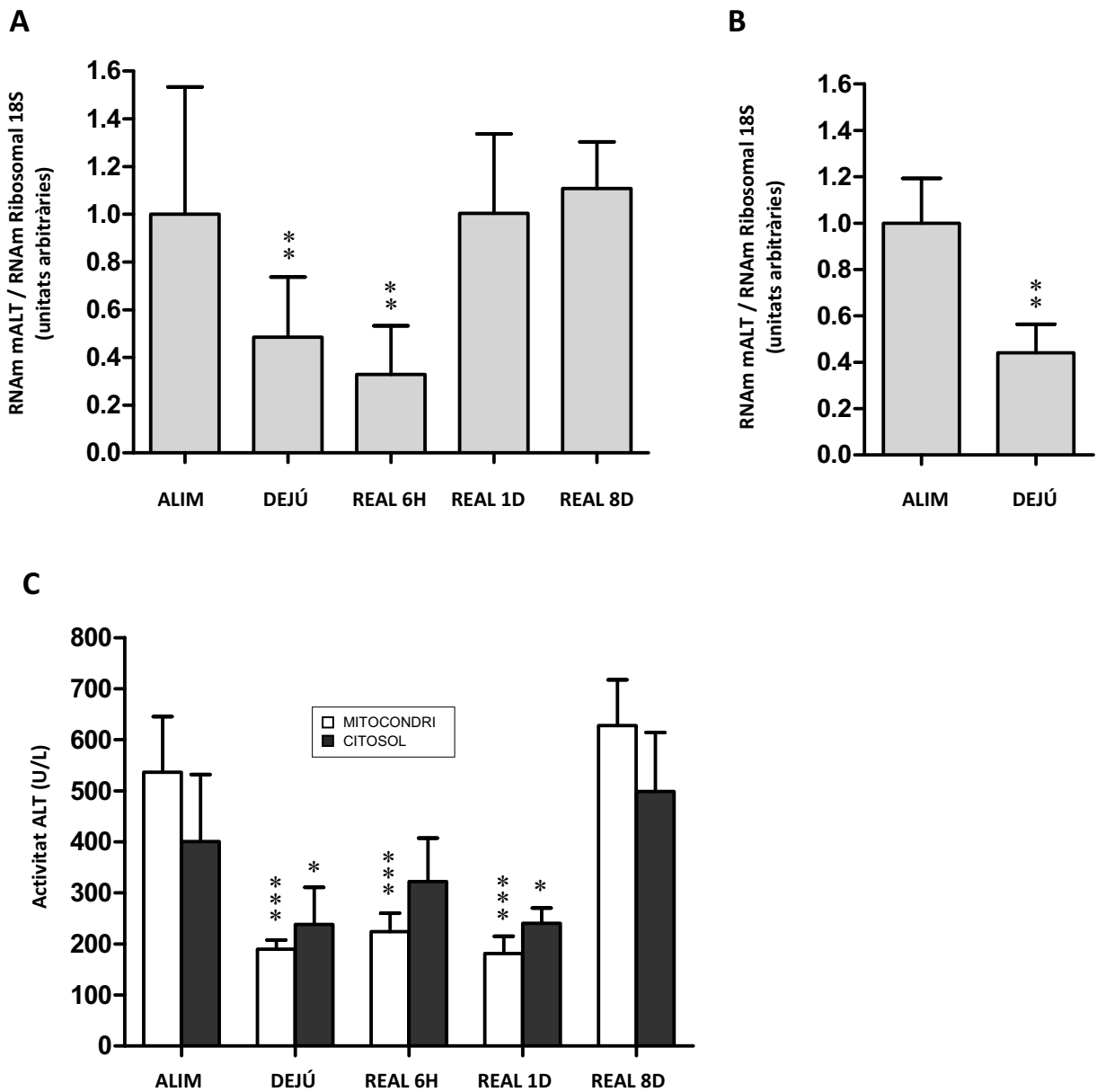


Figura 14: Efecte del dejú i la realimentació en l'expressió i l'activitat d'mALT.

A. Efecte del dejú i la realimentació en l'expressió de l'mALT hepàtica d'orada. Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNAm d'mALT en fetge d'orades alimentades, sotmeses a dejú durant 19 dies o bé després de 6 hores, 1 dia i 8 dies de realimentació. Els nivells d'RNAm d'mALT relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a la mitja \pm SD corresponent a 5-7 fetges, valors obtinguts a partir de 4 experiments independents. **B.** Efecte del dejú en l'expressió de l'mALT renal d'orada. Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNAm d'mALT en fetge d'orades alimentades o sotmeses a un dejú durant 19 dies. Els nivells d'RNAm d'mALT relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com el valor de la mitja \pm SD corresponents a quatre pools de 2 a 3 ronyons cadascun, els valors van ser obtinguts a partir de 2 experiments independents. **C.** Efecte del dejú i la realimentació en l'activitat ALT d'extractes mitocondrials i citosòlics de fetge d'orada. L'activitat ALT, expressada en U/mg de proteïna representa la mitja \pm SD de 5 a 6 fetges. La significació estadística en relació als animals control alimentats s'indica amb * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Experiments de *Northern blot* realitzats amb RNA obtingut a partir de fetge d'orades alimentades o sotmeses a dejú, corroboren que el dejú promou un descens en els nivells d'RNAm d'mALT tal com s'observa en l'anàlisi realitzat mitjançant qRT-PCR (figura 15).

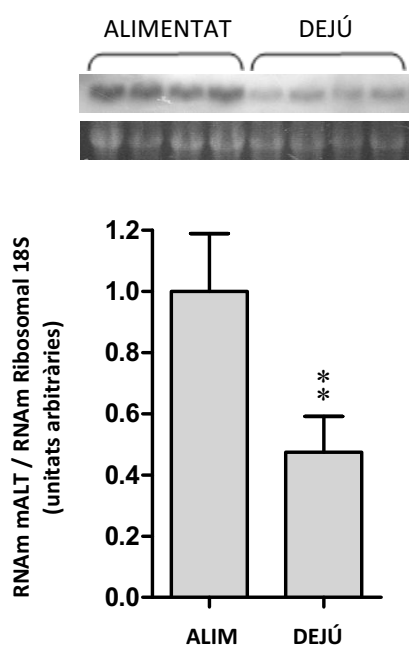


Figura 15. Efecte del dejú i la realimentació en l'expressió de l'mALT hepàtica d'orada. Anàlisi per *Northern blot* dels nivells d'RNAm d'mALT en fetge d'orades alimentades o sotmeses a un dejú de 19 dies. Els nivells d'RNAm d'mALT relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a la mitja \pm SD de 4 fetges. La significació estadística en relació als animals control alimentats s'indica amb ** $P < 0.01$.

Assajos de qRT-PCR mostren que l'expressió de GlnS, AST2 i GDH també es modula en resposta al dejú i després de la realimentació. L'AST2 i GDH presenten un comportament molt similar a l'observat per a l'mALT. En fetge d'animals en situació de dejú, els nivells d'RNAm d'AST2 i GDH disminueixen en un 60% i 70% respectivament, respecte el grup de peixos alimentats. A les 6 hores després de la realimentació dels peixos prèviament sotmesos a dejú, els nivells d'RNAm eren similars als observats en peixos en dejú. Els nivells d'RNAm d'ambdós enzims es van recuperar a partir de les 24 hores de realimentació (figura 16). L'expressió de la GlnS hepàtica disminueix dràsticament en sotmetre les orades a dejú, arribant a tant sols un 1.4% de l'expressió observada en peixos alimentats. Durant la realimentació, els nivells d'RNAm de GlnS es van restablir lentament, arribant a un 10% a les 6 h i al 14% a les 24 hores de realimentació respecte el valor del grup de peixos alimentats sotmesos a dejú. No obstant, a diferència amb d'altres enzims, els nivells d'expressió de GlnS no es recuperen als 8 dies de realimentació, essent encara un 80% inferiors als valors inicials.

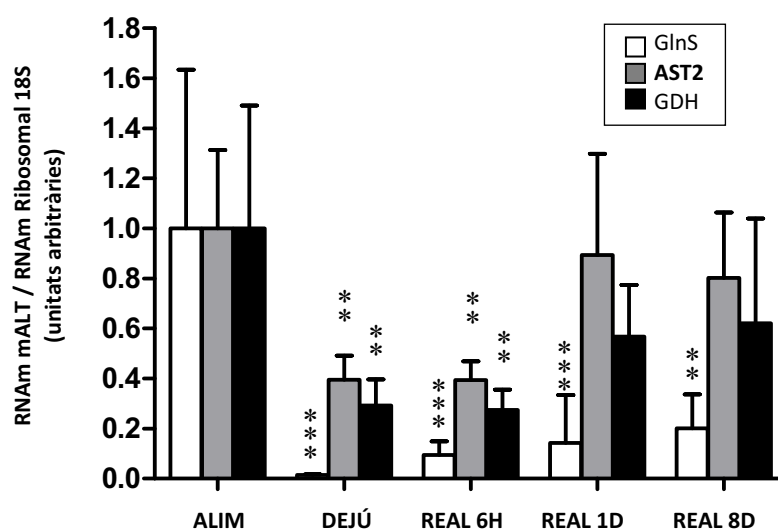


Figura 16: Efecte del dejú i la realimentació en l'expressió de GlnS, AST2 i GDH.

Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNAm d'mALT en fetge d'orades alimentades, sotmeses a un dejú de 19 dies o bé després de 6 hores, 1 dia i 8 dies de realimentació. Els nivells d'RNAm de GlnS, AST2 i GDH relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a la mitja \pm SD corresponent a 6 fetges, valors obtinguts a partir de 2 experiments independents. La significació estadística en relació als animals control s'indica amb ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.3.2 EFECTE DE L' ESTREPTOZOTOCINA I LA INSULINA SOBRE L'EXPRESSIÓ D'mALT, GlnS, AST2 I GDH

L'STZ és un derivat de glucosamina-nitrosurea que origina la necrosi de cèl·lules β . Aquest compost s'utilitza àmpliament per generar animals diabètics (Junod i col·l, 1969; Like i Rossini, 1976; Wilson i Leiter, 1990).

Per estudiar l'efecte de l'administració d'STZ i d'insulina en l'expressió hepàtica i renal d'mALT, es va realitzar un experiment on tres grups de peixos van rebre una injecció intraperitoneal de solució salina (control), insulina (10 UI/kg) o STZ (600 mg/kg). Com a resultat de l'efecte necròtic de l'STZ en les cèl·lules β pancreàtiques, 30 hores després de l'administració intraperitoneal de l'STZ, la glicèmia va augmentar 2 vegades (de 97.14 ± 13.58 mg/dL de glucosa en peixos controls ($n=4$) a 205.5 ± 33.3 mg/dL en peixos tractats amb STZ ($n=8$)). Els peixos tractats amb insulina presentaven uns valors de glicèmia de 93.81 ± 26.73 ng/dL ($n=10$).

Els estudis mitjançant qRT-PCR mostren que l'expressió de l'mALT hepàtica disminueix significativament, en un 70%, en resposta a l'STZ (figura 17A). La disminució dels nivells d'RNAm es correspon amb una disminució significativa en l'activitat ALT al mitocondri d'un 30%. Així mateix, també s'observa una disminució del 30% en l'activitat ALT citosòlica (figura 17B). A l'igual que al

fetge, els nivells d'RNAm d'mALT en ronyó disminueixen, en un 70%, en tractar les orades amb STZ (figura 17C).

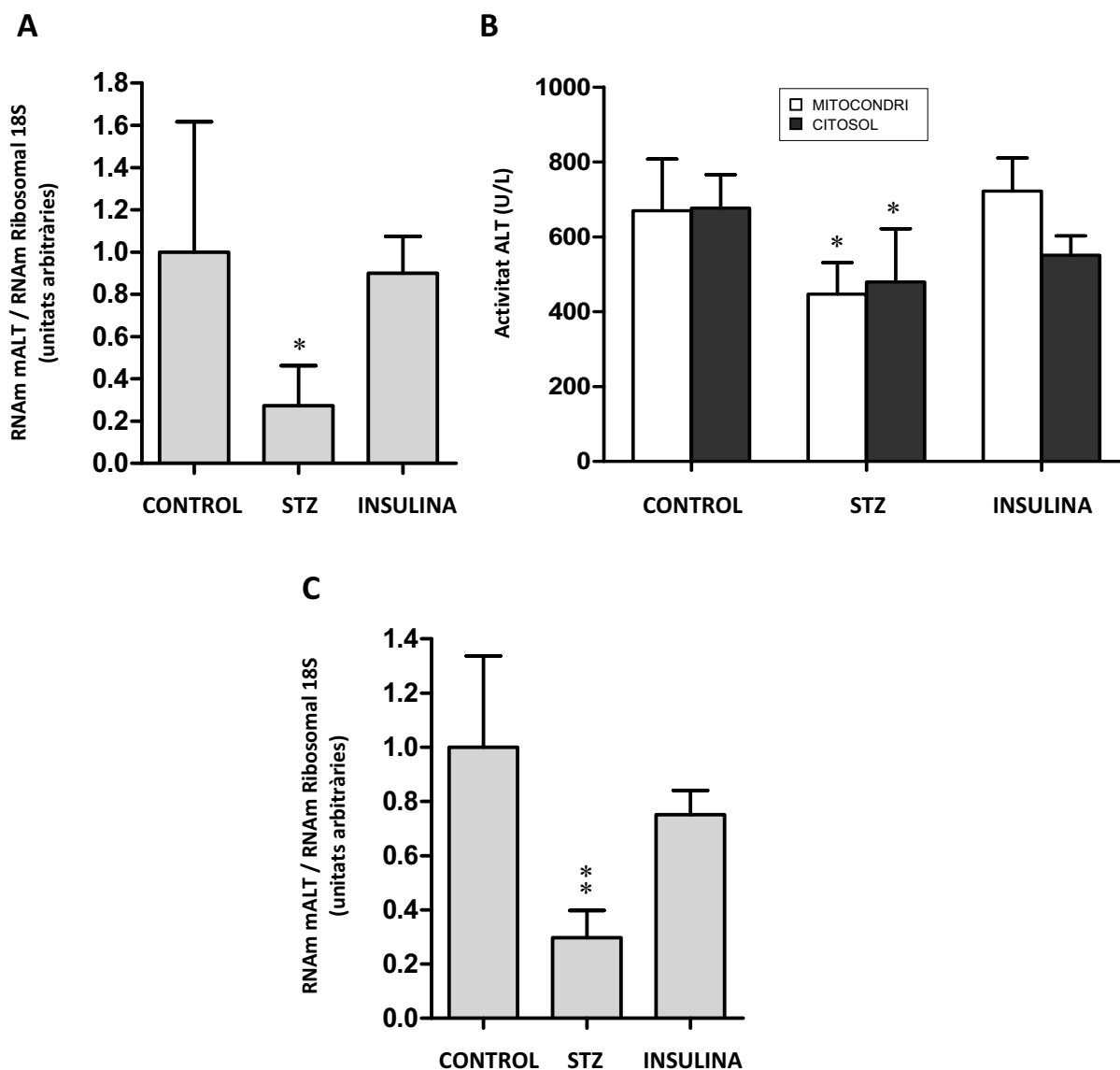


Figura 17: Efecte de l'STZ i la insulina en l'expressió i activitat d'mALT.

A. Efecte de l'STZ i la insulina en l'expressió de l'mALT hepàtica d'orada. Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNAm d'mALT en fetge d'orades sacrificades 30 hores després del tractament amb solució salina (control), 30 hores després del tractament amb STZ (600 mg/kg de peix) o 6 hores després de la injecció de 10 UI/kg de peix d'insulina. Els nivells d'RNAm d'mALT relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a la mitja \pm SD dels valors corresponents a 6-7 fetges, valors obtinguts a partir de 4 experiments independents. **B.** Efecte de l'STZ i la insulina en l'activitat ALT d'extractes mitocondrials i citosòlics de fetge d'orada. L'activitat ALT, expressada en U/mg de proteïna representa el valor mitjà \pm SD corresponent a 5 fetges. **C.** Efecte de l'STZ i la insulina en l'expressió de l'mALT renal d'orada. Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNAm d'mALT en ronyó d'orades sacrificades 30 hores després del tractament amb solució salina (control), 30 hores després del tractament amb STZ (600 mg/kg de peix) o 6 hores després de la injecció de 10 UI/kg de peix d'insulina. Els nivells d'RNAm d'mALT relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a la mitja \pm SD de quatre pools de 2 a 3 ronyons, valors corresponents als obtinguts a partir de 2 experiments independents. La significació estadística en relació als animals control s'indica amb *P<0.05, **P<0.01

En fetge, els nivells d'RNAm d'mALT i l'activitat ALT tant en citosol com en mitocondri no mostraren canvis significatius després de 6 hores de tractament amb insulina (figures 17A i 17B). Els nivells d'RNAm d'mALT en ronyó de peixos tractats amb insulina tampoc varia, respecte el control (figura 17C).

Experiments d'RT-PCR semiquantitatiu utilitzant RNA de fetge i emprant com a gen d'expressió constituït la β -actina, corroboren els resultats obtinguts en el qRT-PCR (figura 18).

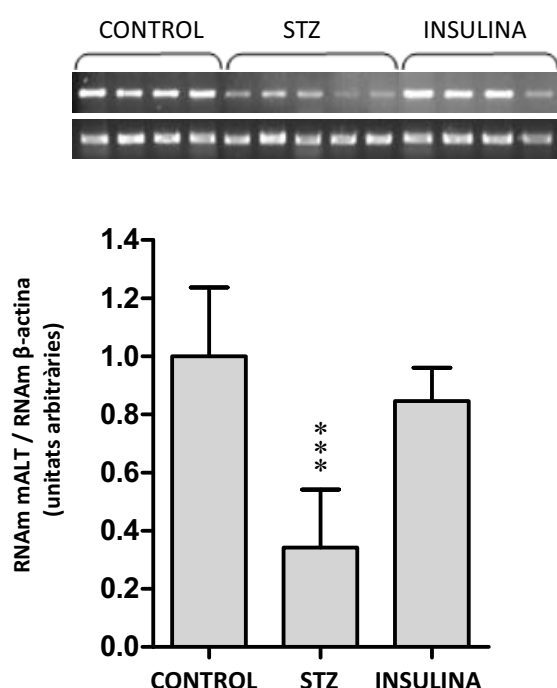


Figura 18: Anàlisi per RT-PCR semiquantitatiu de l'efecte de l'STZ en l'expressió de l'mALT hepàtica d'orada.

Anàlisi per RT-PCR semiquantitatiu dels nivells d'RNAm d'mALT en fetge d'orades sacrificades 30 hores després del tractament amb solució salina (control) o 30 hores després del tractament amb STZ (600 mg/kg de peix) i 6 hores després del tractament amb 10 UI/kg de peix d'insulina. Els nivells d'RNAm d'mALT relatius als nivells de β -actina, són expressats com a la mitja \pm SD corresponents a 4-5 fetges. La significació estadística en relació als animals control s'indica amb *** $P < 0.001$.

Així mateix, l'expressió hepàtica de GlnS, AST2 i GDH disminueix significativament, en un 90%, 70% i 80% respectivament, en resposta a l'STZ (figura 19).

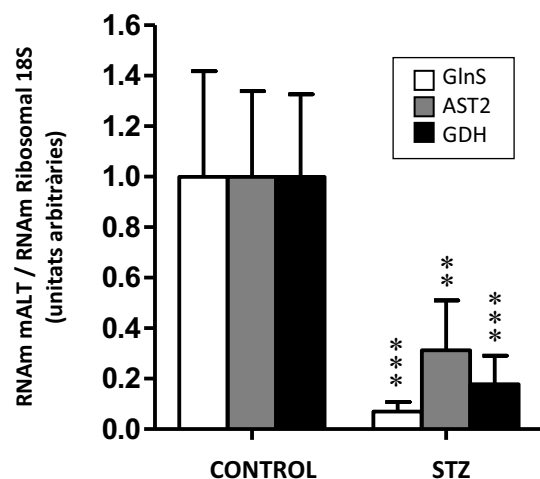


Figura 19: Efecte de l'STZ en l'expressió i activitat de GlnS, AST2 i GDH.

Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNAm de GlnS, AST2 i GDH en fetge d'orades sacrificades 30 hores després del tractament amb solució salina (control) i 30 hores després del tractament amb STZ (600 mg/kg de peix). Els nivells d'RNAm de GlnS, AST2 i GDH relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a la mitja \pm SD dels valors corresponents a 6 fetges, els valors obtinguts corresponen a 2 experiments independents. La significació estadística en relació als animals control s'indica amb ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.3.3 SEGUIMENT DE L'EFECTE DE L'ALIMENTACIÓ SOBRE L'EXPRESSIÓ D'*mALT* DURANT 24 HORES

En l'estudi es van determinar els nivells d'RNA d'*mALT* en fetge d'orada mostrejats a diferents temps (4h, 6h, 10h i 24h) després del subministrament de la dieta. Els nivells d'RNA_m mostren una tendència a augmentar al voltant de les 6 hores postprandials (figura 20).

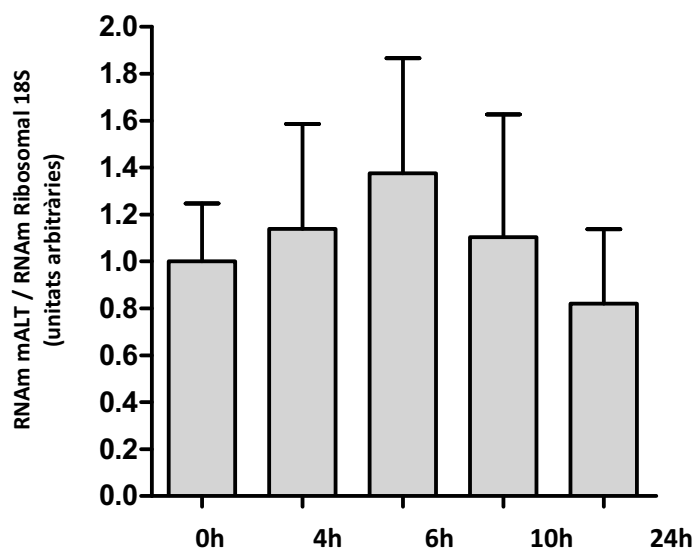


Figura 20. Efecte de l'alimentació diària en l'expressió de l'*mALT* hepàtica d'orada. Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNA_m d'*mALT* en fetge d'orades a les 0h (preprandial) i a les 4h, 6h, 12h i 24h postprandials. Els nivells d'RNA_m d'*mALT* relatius als nivells d'RNA_m ribosomal 18S, són expressats com a la mitja \pm SD de 3 a 4 fetges. Els valors obtinguts corresponen a la mitja de 4 experiments independents.

4.4 CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DE L'mALT DE FETGE D'*Sparus aurata*

La soca YDR089c de *Saccharomyces cerevisiae* va ser escollida com a sistema per a l'expressió de la proteïna mALT d'*Sparus aurata* donat que presenta una deleció en el gen putatiu per a l'ALT mitocondrial. L'activitat enzimàtica i els nivells immunodetectables d'mALT van ser analitzats en extractes proteics aïllats de llevats transformats amb el constructe d'expressió pYmALT. Per incrementar el nombre de mitocondris, els llevats es van créixer en presència d'àcid làctic (tal i com s'indica en l'apartat 3.24). Posteriorment, per induir l'activitat del promotor GAL1 i per tant l'expressió dels constructes recombinants, les cèl·lules van ser incubades en presència de galactosa com a font de carboni durant 20h a 30°C.

Es va determinar l'activitat ALT en extractes mitocondrials de llevats que expressen mALT (prèviament dessalats), en una mescla de reacció amb pHs compresos entre 6 a 9, a 30°C. Per determinar el pH òptim de la reacció de conversió d'L-alanina a piruvat (reacció directa), es van preparar diverses mescles de reacció que contenien 60 mM d'L-alanina, 50 mM d' α -cetoglutarat, 0.18 mM de NADH, 1.4 U/ml de LDH i tampó a diferents pHs (0.1 M Tris-HCl o 0.1 M de tampó de fosfats depenent del pH) (figura 21).

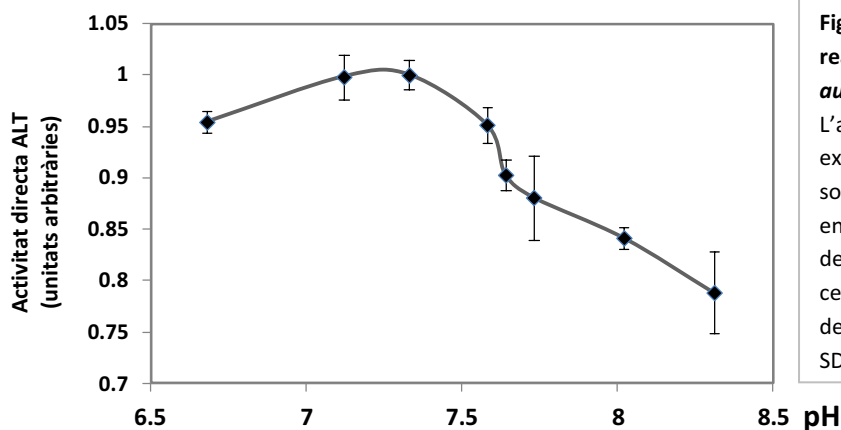


Figura 21: Efecte del pH sobre la reacció directa de l'mALT d'*S. aurata*.

L'activitat ALT fou assajada en extractes mitocondrials de llevat sobreexpressant mALT en uns pHs entre 6.68 i 8.31 a 30°C en presència de 60 mM d'L-alanina i 50 mM d' α -cetoglutarat. Es representa la mitja de dos experiments independents \pm SD.

Per determinar l'efecte del pH sobre l'activitat enzimàtica ALT en la reacció de conversió de piruvat a L-alanina (reacció inversa), es va assajar l'activitat ALT en diverses mescles de reacció que contenien 75 mM de piruvat, 300 mM d'L-glutamat, 0.18 mM de NADH, 10.04 U/ml de GDH, 33 mM de sulfat amònic i tampó a diferents pHs (0.1 M Tris-HCl o 0.1 M de tampó de fosfats depenent del pH).

Com es pot observar a la figura 21, el pH en què es va observar una major activitat ALT per a la reacció directa va ser 7.22 mentre que el pH òptim de la reacció inversa va ser de 7.65 (figura 22).

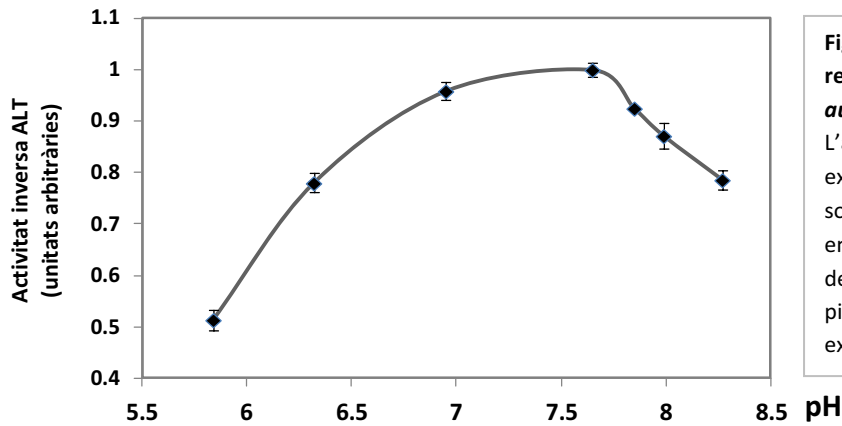


Figura 22: Efecte del pH sobre la reacció inversa de l'mALT d'*S. aurata*.

L'activitat ALT fou assajada en extractes mitocondrials de llevat sobreexpressant mALT en uns pHs entre 5.84 i 8.27 a 30°C en presència de 300 mM d'L-glutamat i 75 mM de piruvat. Es representa la mitja de dos experiments independents \pm SD.

El grau d'expressió d'mALT d'*Sparus aurata* en els llevats transformants va ser verificat per *Western Blot* mitjançant la utilització d'un anticòs policlonal que reconeix les ALT d'orada. Els llevats transformats amb pYmALT expressen una proteïna amb una massa molecular estimada de 54 kDa. En els llevats transformats amb el vector buit (pYES2) no es varen detectar proteïnes específiques (figura 23A). En condicions de velocitat màxima (100 mM d'L-alanina i 10 mM d' α -cetoglutarat per a la reacció directa, i 75 mM de L-glutamat i 12 mM de piruvat per a la reacció inversa), es va detectar un increment en l'activitat ALT en els llevats que expressaven mALT, en comparació amb els llevats transformats amb pYES2, indicant així que es va sobreexpressar l'enzim mALT. L'activitat ALT, determinada segons la reacció directa, expressada com a U/g, fou 7 vegades superior a l'observat en la reacció inversa (figura 23B).

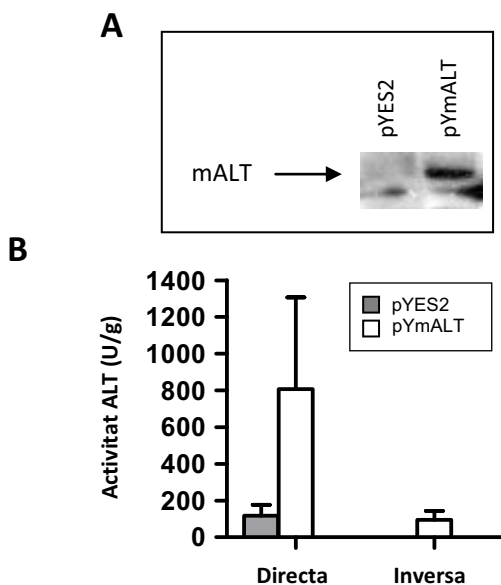


Figura 23. Expressió d'mALT en llevat.

A. Nivells immunodetectables de l'enzim mALT en extractes proteics mitocondrials obtinguts a partir de llevats crescuts durant 24h a 30°C després de la transformació amb el vector buit (pYES2) o pYmALT. **B.** Nivells d'activitat ALT determinats d'acord amb la reacció directa i inversa en extractes proteics desalats obtinguts de llevats expressant el vector buit (pYES2) o pYmALT. Les dades s'expressen com a la mitja \pm SD de 4 a 6 determinacions efectuades amb extractes proteics de llevat.

En base a aquests resultats, vam postular que en les condicions estudiades, mALT catalitza preferentment la reacció directa.

Per verificar aquesta observació, es va determinar la relació d'activitat ALT directa respecte l'activitat ALT inversa en presència de diverses concentracions dels substrats de la reacció. Es van emprar concentracions òptimes de substrat, corresponent a la concentració de substrat en què la velocitat de reacció és màxima, i concentracions baixes de substrat, propera al valor de la Km. Les concentracions òptimes o baixes corresponen a les trobades experimentalment per a l'enzim mALT. Aquestes determinacions d'activitat ALT es van dur a terme utilitzant extractes mitocondrials que sobreexpressaven mALT d'orada i extractes citosòlics de llevat sobreexpressant cALT1 i cALT2 d'*S. aurata*.

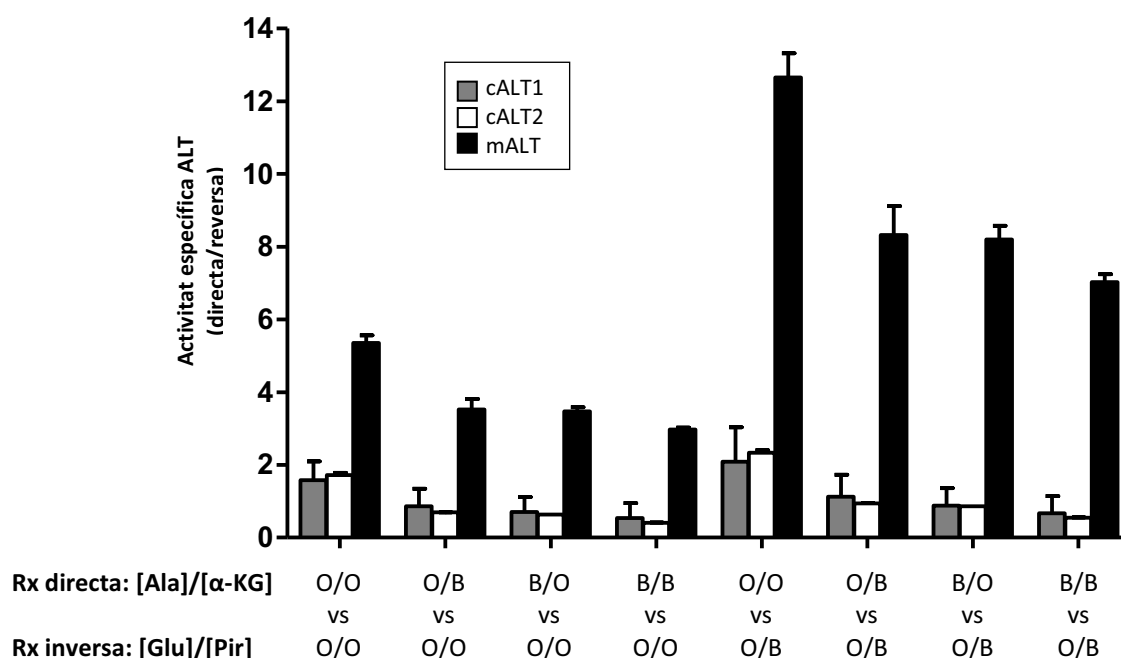


Figura 24. Efecte de la concentració de substrat en la relació de reacció directa (conversió d'L-alanina a piruvat) respecte reversa (conversió de piruvat a L-alanina) per a les proteïnes cALT1, cALT2 i mALT d'*S. aurata*.

Les reaccions directa i inversa foren determinades en extractes proteics de llevats expressant els isoenzims ALT a les concentracions indicades d'L-alanina (O: 100mM; B: 2mM) i α-cetoglutarat (O: 10mM; B: 0.2 mM) per a la reacció directa, i d'L-glutamat (O: 75mM) i piruvat (O: 12mM; B: 0.2mM) per a la reacció inversa. Els valors s'expressen com a la mitja ± SD de dos extractes proteics desalats de llevat expressant cALT1, cALT2 o mALT. La lletra O indica concentració òptima pel substrat (concentració a la qual la velocitat de reacció és màxima) i la lletra B indica concentració baixa del substrat, corresponent a valors propers a la Km. Aquests valors òptims i baixos corresponen als adients per a l'mALT.

En les condicions assajades, s'observa que en les concentracions òptimes de substrat per a ambdós sentits de la reacció, mALT catalitza millor la reacció directa que la inversa, presentant una activitat unes 6 vegades superior. En el cas de cALT1 i cALT2, aquestes catalitzen també

preferentment la reacció directa en les condicions assajades però aquesta relació és aproximadament 3 vegades inferior per a ambdós enzims, comparant amb mALT. Mantenint les conc òptimes pels dos substrats de la reacció inversa, però disminuint un dels dos substrats de la directa, observem una disminució en la relació d'activitat directa/inversa d'aproximadament un 34%; a concentracions baixes dels dos substrats de la directa, la relació directa/inversa presenta valors lleugerament inferiors (figura 24).

Considerant les isoformes citosòliques, en disminuir la concentració d'un o dos dels substrats de la reacció directa, tot mantenint en concentracions òptimes els substrats de la reacció inversa, s'arriba a l'equilibri d'ambdues reaccions. El descens en la concentració d'un o els dos substrats de la reacció directa, origina una disminució més important de la relació directa/inversa que en el cas d'mALT, al voltant del 50-60% quan disminueix la concentració d'un dels substrats i del 60-75% quan la concentració d'ambdós L-Ala i α -KG són baixes, per a cALT1 i cALT2, respectivament.

En disminuir la concentració de piruvat per a la reacció inversa, mALT catalitza encara més eficaçment la reacció directa, l'activitat de la qual arriba a ser 12 vegades superior a l'activitat de la reacció inversa. En aquestes condicions, en disminuir la concentració d'un o els dos substrats de la reacció directa, s'observa una disminució de l'activitat en la mateixa proporció que en el cas anterior. L'activitat ALT de la reacció directa per a mALT en aquestes condicions és 8 vegades superior a l'activitat per a la reacció inversa, i és lleugerament superior a l'observada quan les concentracions de substrat per a ambdós reaccions són òptimes. A diferència d'mALT, les isoformes citosòliques incrementen tant sols un 30% la seva relació directa/inversa en disminuir la concentració de piruvat, i en disminuir les concentracions d'L-Ala i α -KG la disminució de la relació és molt similar a la trobada anteriorment (figura 24).

En un altre assaig, es van determinar les relacions d'activitat ALT directa/inversa per als isoenzims mALT i cALT1 però en aquest cas utilitzant les concentracions òptimes per a cada enzim.

L'activitat d'mALT a la reacció directa va ser 9 vegades superior a l'activitat trobada per a la reacció inversa. cALT1 també catalitza preferentment la relació directa en les condicions de substrat òptimes per a aquest enzim, però la relació directa/inversa és de 4 (un 60% inferior a la trobada per mALT). Per tant, mALT va mostrar una major activitat ALT en la relació activitat directa/activitat inversa que no pas cALT1 (figura 25).

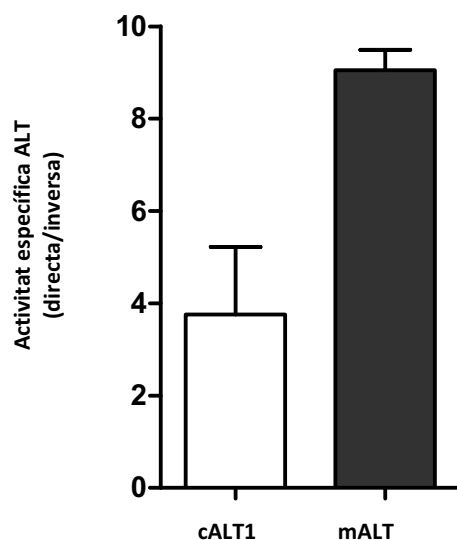


Figura 25. Efecte de la concentració de substrat en la relació de reacció directa (conversió d'L-alanina a piruvat) respecte la inversa (conversió de piruvat a L-alanina) per a les proteïnes cALT1 i mALT d'*S. aurata*.

Les reaccions directa i inversa foren determinades en extractes proteics de llevats expressant els isoenzims ALT a les concentracions òptimes de substrat per a cada enzim. Per a la reacció directa catalitzada per cALT1, les concentracions d'L-alanina i α -cetoglutarat van ser de 500 mM i 50 mM, respectivament, per a la reacció inversa, les concentracions d'L-glutamat i piruvat van ser de 300 mM i 75 mM, respectivament. En el cas d'mALT, les concentracions d'L-alanina i α -cetoglutarat van ser de 100 mM i 10 mM, respectivament, i per a la reacció inversa, les concentracions d'L-glutamat i piruvat van ser de 75 mM i 12 mM, respectivament. Els valors s'expressen com a la mitja \pm SD de tres extractes proteics desalats de llevat expressant cALT1 o mALT.

L'anàlisi cinètic d'mALT es va dur a terme utilitzant els extractes proteics obtinguts dels llevats transformants. Considerant la reacció directa, els gràfics observats per a l'mALT eren hiperbòlics quan l'activitat era representada com a funció de la concentració de l'L-Ala o l' α -KG.

En representar els inversos de les activitats obtingudes front als inversos de les concentracions de substrat utilitzats s'observaven en les gràfiques doble-recíproques rectes paral·leles que indiquen que la reacció segueix un mecanisme *ping-pong*, com està descrit per a altres ALTs (figura 26). Els valors de K_m obtinguts per a l'L-Ala i l' α -KG foren de 2.22 mM i 0.21 mM, respectivament (figura 26 A i B) (taula 3).

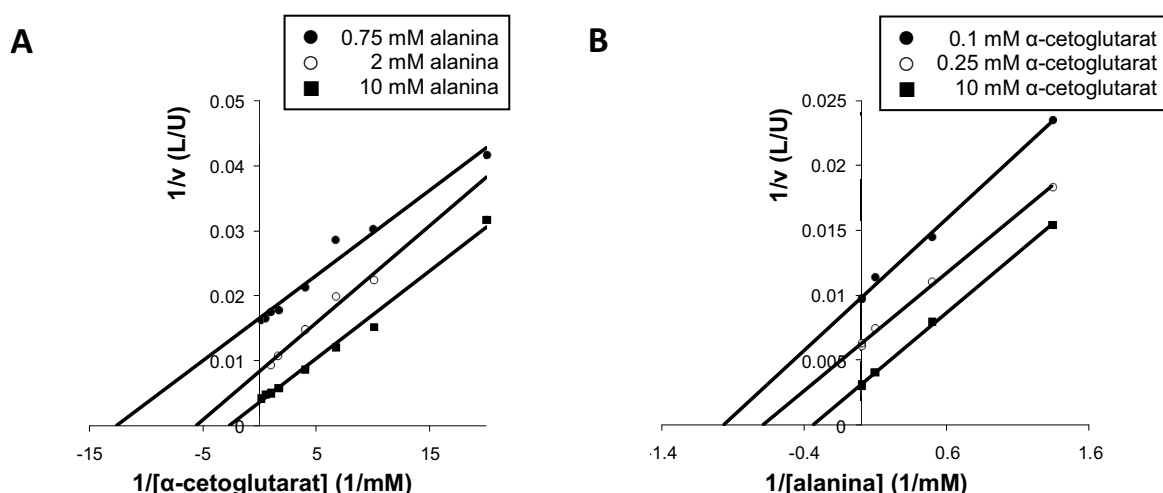


Figura 26. Cinètiques de saturació per a L-alanina i α-cetoglutarat d’*mALT* d’*S. aurata*.

A. Cinètiques de saturació d’*mALT* en relació a l’α-cetoglutarat. L’activitat ALT (reacció directa) va ser assajada a concentracions variables d’α-cetoglutarat (entre 0.05 a 10 mM) i en presència de 0.75 mM (●), 2 mM (○) o 10 mM (■) d’L-alanina. **B.** Cinètiques de saturació d’*mALT* en relació a l’L-alanina. L’activitat ALT (reacció directa) va ser assajada a concentracions variables d’L-alanina (entre 0.75 a 100 mM) en presència de 0.1 mM (●), 0.25 mM (○), o 10 mM (■) d’α-cetoglutarat. Les gràfiques doble-recíproques són representatives d’experiments duts a terme amb dos extractes proteics diferents aïllats de llevats que expressen *mALT* d’*S. aurata*.

El comportament cinètic d’*mALT* també es va examinar considerant la reacció inversa. El comportament cinètic d’*mALT* per a la reacció inversa és hiperbòlic. Els valor de *K_m* determinats per a l’L-glutamat i el piruvat són de 11.30 mM i 0.32 mM, respectivament (figura 27 A i B; taula 3).

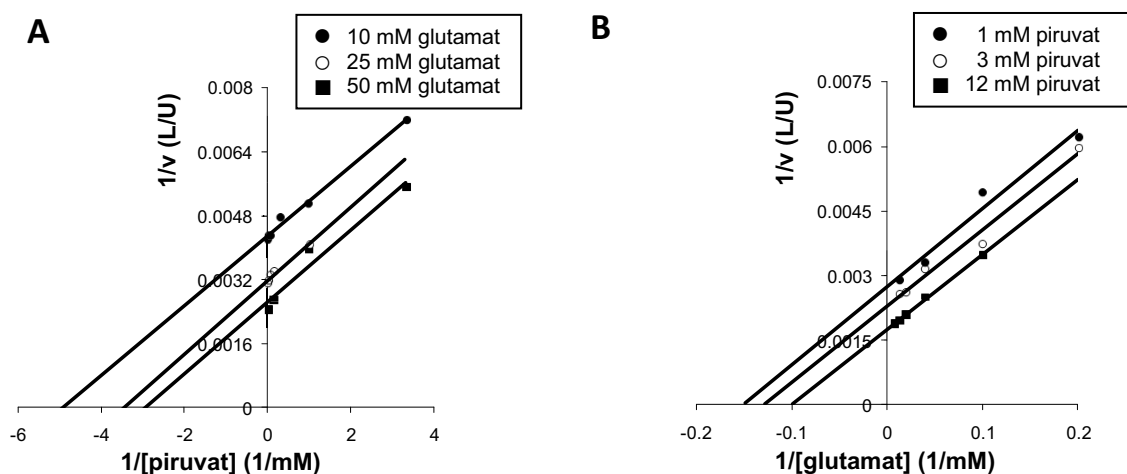


Figura 27. Cinètiques de saturació per a piruvat i L-glutamat d’*mALT* d’*S. aurata*.

A. Cinètiques de saturació d’*mALT* en relació al piruvat. L’activitat ALT (reacció inversa) va ser assajada variant la concentració de piruvat (entre 0.3 a 12 mM) i quan l’L-glutamat estava present a concentracions 10 mM (●), 25 mM (○) o 50 mM (■). **B.** Cinètiques de saturació d’*mALT* en relació a l’L-glutamat. L’activitat ALT (reacció inversa) va ser assajada variant la concentració d’L-glutamat (entre 5 a 75 mM) en presència d’1 mM (●), 3 mM (○) o 12 mM (■) de piruvat. Les gràfiques doble-recíproques són representatives d’experiments duts a terme amb dos extractes proteics diferents aïllats de llevats expressant *mALT*.

Reacció directa	
K_m L-Ala (mM)	2.22 ± 0.221
K_m α-KG (mM)	0.21 ± 0.036
V_{max} (μmol/(min/g))	402.54 ± 67.56
V_{max} / K_m L-Ala	0.182
V_{max} / K_m α-KG	1.890
Reacció inversa	
K_m L-Glu (mM)	11.30 ± 2.651
K_m Pyr (mM)	0.32 ± 0.169
V_{max} (μmol/(min/g))	533.76 ± 21.5
V_{max} / K_m L-Glu	0.047
V_{max} / K_m Pyr	1.678

Taula 3. Valors de K_m i V_{max} d'mALT.

Es mostren els valors de K_m per a cadascun dels substrats i la V_{max} per a les reaccions directa i inversa, així com les relacions V_{max} / K_m . Els resultats presentats són la mitja ± SD d'experiments duts a terme amb dues preparacions enzimàtiques diferents.

L'aminooxiacetat (AOA) és un potent inhibidor dels enzims PLP dependents. Es va estudiar l'efecte de l'AOA sobre l'activitat ALT d'*S. aurata*.

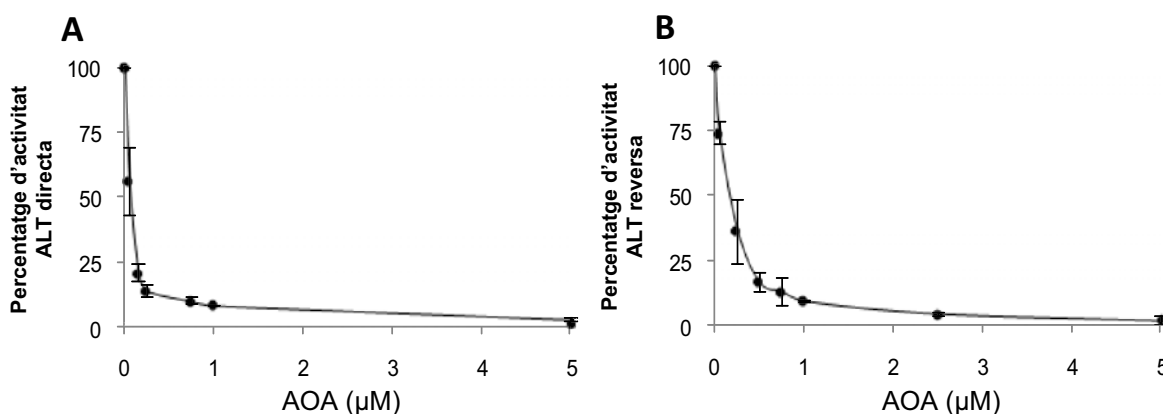


Fig 28. Efecte de l'AOA en mALT d'*S. aurata*.

A. Efecte de l'AOA en l'activitat directa d'mALT. L'activitat ALT (reacció directa) va ser assajada variant les concentracions d'AOA en presència de 100 mM d'L-alanina i 10 mM d'α-cetoglutarat.

B. Efecte de l'AOA en l'activitat inversa d'mALT. L'activitat ALT (reacció inversa) va ser assajada variant les concentracions d'AOA en presència de 75 mM d'L-glutamat i 12 mM de piruvat.

El percentatge de la reacció ALT directa o inversa es representa com a la mitja ± SD d'experiments duts a terme amb 2 extractes proteics diferents aïllats de llevats expressant mALT.

Per a tal fi, es van incubar diferents mescles de reacció amb els extractes d'mALT, en presència de concentracions òptimes d'L-alanina (100 mM) i α -cetoglutarat (10 mM) a diferents concentracions d'AOA, per determinar l'efecte sobre la reacció directa. Per a determinar l'efecte de l'AOA sobre la reacció inversa, diferents mescles de reacció amb els extractes d'mALT es van incubar en presència de concentracions òptimes d'L-glutamat (75 mM) i piruvat (12 mM) i a diferents concentracions d'AOA. L'IC⁵⁰ de l'mALT per a l'AOA va ser de $0.5 \mu\text{M} \pm 0.01$ per a la reacció directa i d' $1.5 \mu\text{M} \pm 0.02$ per a la reacció inversa, respectivament (figura 28).

4.5 CLONACIÓ del PROMOTOR de l'mALT d'ORADA

A fi d'estudiar el control transcripcional d'mALT, vam clonar i caracteritzar la regió promotora del gen mALT d'*S. aurata* mitjançant la tècnica del passeig cromosòmic, partint de DNA genòmic i utilitzant oligonucleòtids específics per a l'mALT de fetge d'orada. En la figura 29 es mostra l'esquema de la tècnica utilitzada.

El primer pas fou la construcció de 4 llibreries genòmiques obtingudes per digestió del DNA genòmic purificat de fetge d'orada, amb els enzims de restricció *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* i *StuI* i posterior lligació d'una seqüència adaptadora. Les 4 llibreries genòmiques obtingudes, anomenades: DL-1, DL-2, DL-3 i DL-4 respectivament, es van analitzar mitjançant PCR utilitzant els oligonucleòtids subministrats amb el *kit* (apartat 3.2) i oligonucleòtids específics (apartat 3.2) dissenyats en base a la seqüència del cDNA de l'mALT prèviament descrita per a orada (Metón i col·l, 2004b).

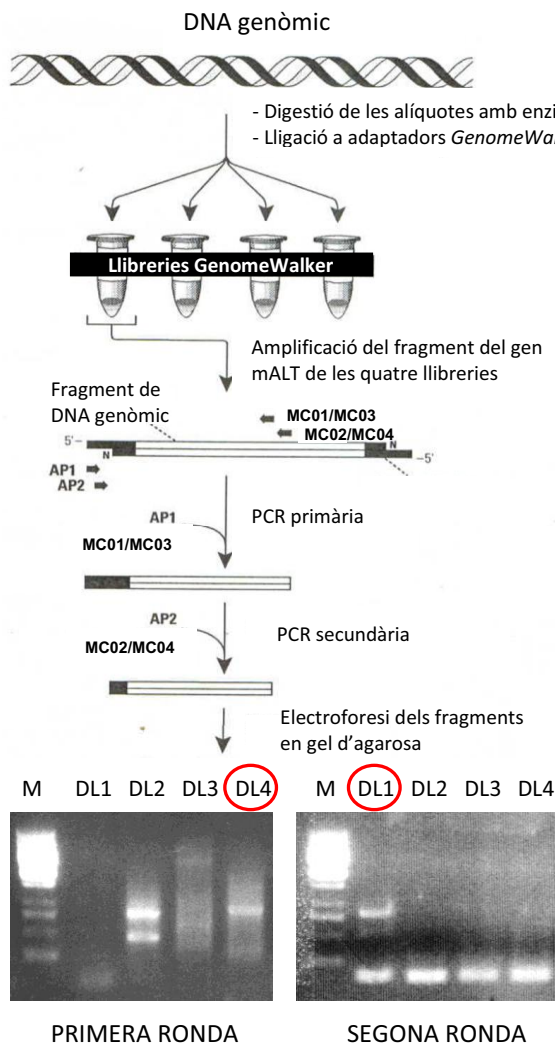


Figura 29: Esquema del clonatge del promotor mitjançant la tècnica de passeig cromosòmic.

Per a la primera ronda de passeig genòmic van utilitzar-se els oligonucleòtids MC01/MC02. Els encebadors MC03/MC04 es van emprar per a la segona ronda. Amb un cercle es marca la llibreria a partir de la que va ser clonat el fragment de PCR, en la primera i segona ronda, respectivament.

D'aquesta segona ronda vàrem obtenir un fragment d'uns 800 pb a partir de la llibreria DL-1 que va ser lligat a pGEM-T *Easy* per tal de generar pGEM-mALT824 (aquest plasmidi conté el fragment de promotor de -1540 a -717). La seqüència nucleotídica, amb un total de 1632 pb, fou sotmesa a les bases de dades de DDBJ/EMBL/GeneBank amb el número d'accés DQ114990 (figura 30).

4.5.1 CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DE L'mALT D'ORADA

L'anàlisi mitjançant el programa informàtic *MatInspector* (Cartharius i col·l, 2005) de la seqüència de 1632 pb adjacent a l'extrem 5' del cDNA que hem clonat com s'indica a l'apartat 3.15 i que codifica per a l'mALT de fetge d'orada, indica la presència de possibles llocs d'unió per a diferents factors de transcripció, entre els quals podem destacar: ATF6, C/EBP β i HNF4 α (figura 30).

Per tal d'analitzar l'activitat transcripcional de la seqüència de 1632 pb obtinguda en les dues rondes consecutives de recorregut cromosòmic, s'havia de clonar aquesta seqüència en el vector pGL3-*Basic*. Els fragments de promotor obtinguts clonats en pGEM-T *Easy* (pGEM-mALT820 i pGEM-mALT824), no es podien unificar en el vector pGL3-*Basic* directament donat que no disposaven de cap diana de restricció comuna. Es va haver de seguir la següent estratègia:

Primerament, es va subclonar l'insert del vector pGEM-mALT820 en pGL3-*Basic*. Es va fer una PCR amb els encebadors MC06 i MC05 utilitzant com a DNA motlle pGEM-mALT820 que posteriorment va ser digerit amb *MluI* i *HindIII* i clonat en pGL3-*Basic* tallat amb els mateixos enzims obtenint així pGm820.

Seguidament, es va fer una reacció de recorregut cromosòmic on es van utilitzar els oligonucleòtids AP1 i MC0503 per a la PCR primària, emprant com a DNA motlle les llibreries DL2 i DL3. El producte de PCR va ser diluït i utilitzat com a motlle per fer una PCR secundària amb els oligonucleòtids específics MC05S3 i MC05S4. A partir de la llibreria DL3 es va obtenir la banda esperada de 1028 pb, corresponent als nucleòtids -1540 a -513 pb, que va ser clonat en el vector pGEM-T *Easy* per a generar pGEM-mALT1028.

Finalment, el constructe pGEM-mALT1028 va ser digerit amb *MluI* i *PstI*. Aquest insert, es va clonar en el vector pGm820, prèviament digerit amb els mateixos enzims de restricció, obtenint així el constructe pGmALT1540 (comprèn els nucleòtids que van des de la posició -1540 fins +92 en relació a l'origen de transcripció de l'mALT hepàtica d'orada). La utilització del plasmidi pGL3-*Basic* ens va permetre determinar si la regió de DNA genòmic flanquejant a l'exó 1 conté un promotor funcional.

Per examinar les regions del promotor implicades en la modulació de l'expressió basal d'*mALT* en orada es van dur a terme delecions de l'extrem 5' del fragment del promotor, mitjançant la utilització d'enzims de restricció o amplificació per PCR. Els fragments delecionats en 5' des de -519 fins a +62 pb (mantenint +92 com a extrem 3') foren fusionats al gen reporter de la luciferasa en el plasmidi *pGL3-Basic*. Es van obtenir així els constructes *pGmALT519* (de -519 a +92 pb), *pGmALT325* (de -325 a +92 pb), *pGmALT153* (de -153 a +92 pb), *pGmALT103* (de -103 a +92 pb), *pGmALT49* (de -49 a +92 pb) i *pGmALT+62* (de +62 a +92 pb) (tal com s'indica a l'apartat 3.3). Els plasmidis recombinants obtinguts, foren cotransfectats transitòriament en cèl·lules HEK293 amb el plasmidi *pCMV-β*, que expressa *lacZ* (β -galactosidasa), utilitzat com a control intern de l'eficiència de la transfecció. L'anàlisi de l'activitat luciferasa dels constructes reporters que contenen els fragments del promotor de 1540 a 49 pb presenten una activació transcripcional de 6 a 11 vegades (figura 31) respecte el control negatiu *pGL3-Basic*. No es va observar activitat promotora en el cas de transfectar les cèl·lules amb el constructe més petit (*pGmALT+62*; +62 a +92 pb). Aquests resultats suggereixen que la regió corresponent als 1540 nucleòtids corrent amunt de l'extrem 5' respecte l'inici de transcripció d'*mALT* de fetge d'orada conté un promotor funcional, i que la regió promotora situada entre -49 pb i +62 pb podria incloure elements reguladors en *cis* essencials per a la transcripció basal del gen que codifica per a l'*mALT* d'orada.

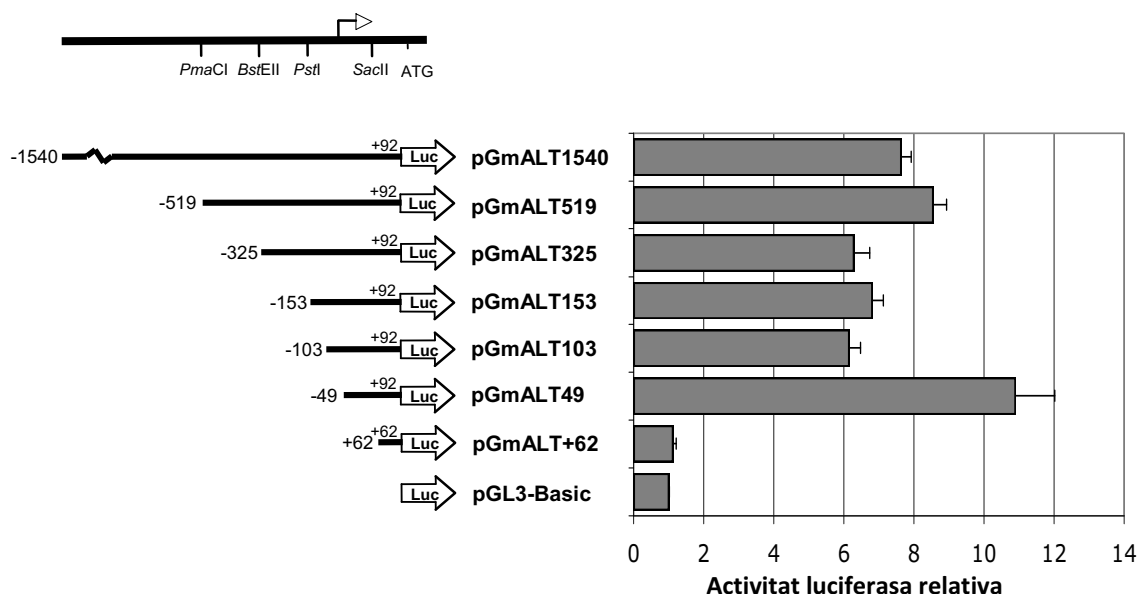


Figura 31. Estudi de l'activitat basal del promotor d'*mALT* en cèl·lules HEK293.

En la part esquerra de la figura es representa la regió adjacent a l'extrem 5' del gen que codifica per a l'*mALT* d'orada. En la barra superior estan indicats alguns llocs de restricció i l'inici de transcripció. La numeració nucleotídica s'inicia des de +1, que correspon a l'inici de transcripció. Els constructes reporters, amb diferents extrems 5' però extrems 3' idèntics (+92), foren utilitzats per transfectar cèl·lules HEK293. Les cèl·lules es van transfectar amb 2 μ g dels constructes reporters i 0,25 μ g de *pCMVβ*. L'activitat luciferasa és expressada com a vegades d'inducció en relació a l'activitat observada en transfectar el plasmidi reporter *pGL3-Basic* sense promotor, valor que es va establir en 1. Els resultats representen el valor mitjà de la inducció de l'activitat luciferasa \pm SD d'almenys tres experiments realitzats per duplicat.

4.6 PAPER D’HNF4 α EN LA REGULACIÓ DE L’ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL DE L’*mALT*

4.6.1 ACTIVACIÓ DEL PROMOTOR D’*mALT* PER HNF4 α

L’anàlisi *in silico* de la seqüència del promotor de l’*mALT* d’orada ens va permetre localitzar tres possibles llocs d’unió per a HNF4 α (HRE), entre les posicions -865/-845, -411/-391 i -59/-39 en relació a l’inici de transcripció (figura 30). Per tal de conèixer la implicació d’aquest factor en la transcripció de l’*mALT* vàrem efectuar assajos de cotransfecció transitòria en cèl·lules HEK293. Per a aquest fi es van utilitzar els constructes reporters que presentaven diferents delecions a l’extrem 5’ del fragment del promotor clonat, juntament amb el plasmidi d’expressió que codifica per a HNF4 α d’orada (veure apartat 4.7.1) o de rata.

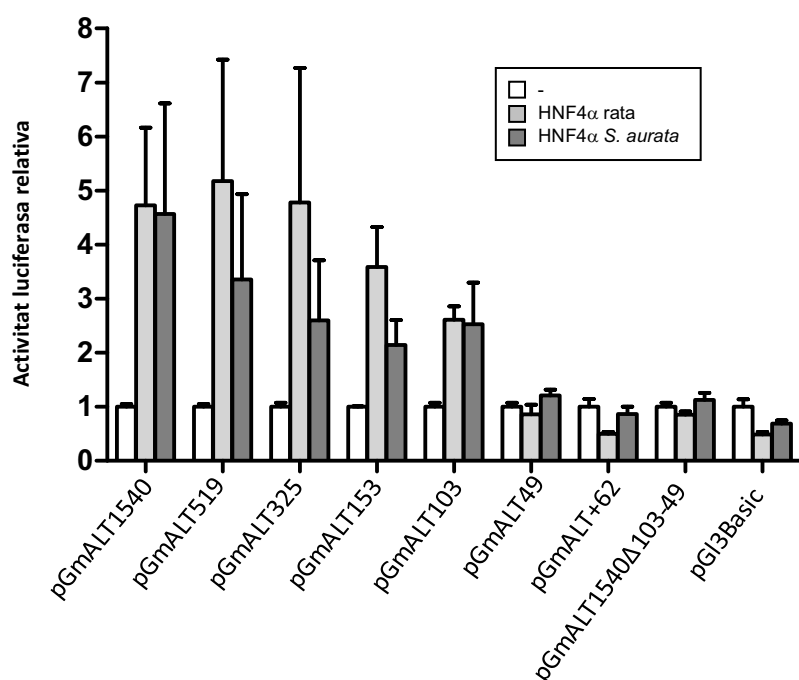


Figura 32. Efecte d’HNF4 α sobre la transcripció del promotor d’*mALT* de *S. aurata*.

Es van transfectar cèl·lules HEK293 amb 2 μ g dels constructes reporters pGmALT1540, pGmALT519, pGmALT325, pGmALT153, pGmALT103, pGmALT49, pGmALT1540 Δ 103-49 i pGL3-*Basic* amb o sense 0,2 μ g del plasmidi d’expressió que codifica per a HNF4 α d’orada o de rata i 0,25 μ g de pCMV β . L’activitat luciferasa s’expressa com a vegades d’inducció en relació a l’activitat observada amb el constructe corresponent en absència de factor de transcripció, valor que es va establir en 1. Els resultats representen el valor mitjà de l’increment de l’activitat luciferasa \pm SD corresponent a quatre experiments realitzats per duplicat.

Quan els experiments de cotransfecció inclouen els constructes que contenen un fragment del promotor amb 103 pb corrent amunt des de l’inici de transcripció o superior (pGmALT1540,

pGmALT519, pGmALT325, pGmALT153 i pGmALT103) i els plasmidis que codifiquen per a HNF4 α murí o d'orada, es va observar un increment de l'activitat promotora de 3 a 5 vegades respecte la transfecció amb només el constructe que conté el promotor. Per contra, en cotransfectar les cèl·lules amb el plasmidi pGmALT+49, no es va observar l'activació del promotor mALT per HNF4 α (figura 32). El fet que el constructe pGmALT103 respongués a HNF4 α , suggeria que com a mínim, l'element HRE situat en els nucleòtids -63/-39 (comprès en el plasmidi pGmALT103), podria ser responsable de la transactivació del promotor d'mALT per HNF4 α . Per tal de verificar si els altres possibles llocs d'unió per HNF4 α tenien un paper en l'activació d'mALT per aquest factor, es va dissenyar un constructe amb una deleció des del nucleòtid -103 a +62 (pGmALT1540 Δ 103/+62). Aquest constructe, en ser cotransfectat en cèl·lules HEK293 juntament amb pcDNA3.HNF4, no mostrava increment de l'activitat promotora (figura 32). Aquesta dada, juntament amb el fet de que l'activitat promotora induïda per HNF4 α , en els constructes del promotor superiors al pGmALT103 no mostraren un increment significatiu en l'activitat induïda per HNF4 α , ens va portar a la conclusió de que l'HRE funcional és el situat entre les posicions -63/-39.

Per tal de determinar si l'efecte d'HNF4 α era específic sobre el promotor d'mALT, es van transfectar cèl·lules HEK293 amb el plasmidi pGmALT1540, que conté el fragment més gran de promotor d'mALT, el plasmidi pGalt2096, que comprèn els nucleòtids que van des de la posició -2096 fins a +126 en relació a l'origen de transcripció de la cALT hepàtica d'orada (Anemaet i col·l, 2010) i pGL3-Basic, en absència o conjuntament amb el plasmidi d'expressió d'HNF4 α d'orada.

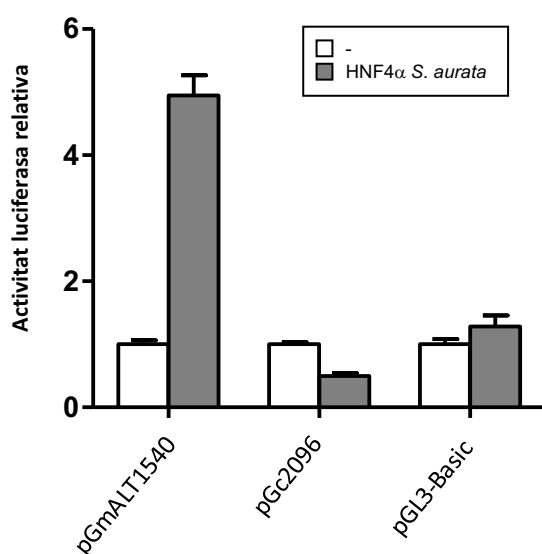


Figura 33. Efecte d'HNF4 α sobre la transcripció dels promotors dels gens mALT i cALT d'*S. aurata*.

Es van transfectar cèl·lules HEK293 amb 2 μ g dels constructes reporters pGmALT1540 (promotor del gen mALT), pGalt2096 (promotor del gen cALT) i pGL3-Basic amb o sense 0,2 μ g del plasmidi d'expressió que codifica per a HNF4 α d'orada i 0,25 μ g de pCMV β . L'activitat luciferasa s'expressa com a vegades d'inducció en relació a l'activitat observada amb el constructe corresponent en absència de factor de transcripció, valor que es va establir en 1. Els resultats representen el valor mitjà de l'increment de l'activitat luciferasa \pm SD corresponent a un experiment realitzat per duplicat.

Com es pot observar a la figura 33, HNF4 α indueix l'activitat transcripcional mALT però no indueix l'activitat promotora del gen cALT.

4.6.2 HNF4α S'UNEIX A LA CAIXA HRE -63/-39

El constructe més petit deletionat del gen mALT que va mostrar transactivació per HNF4α en els experiments de transfecció transitòria, fou pGmALT103. Aquest constructe conté una caixa HRE situada entre les posicions -63/-39 en relació a l'inici de transcripció. Per tal d'analitzar si HNF4α pot unir-se a aquesta caixa HRE es van realitzar assajos de retardació en gel (apartat 3.23). Per a tal fi s'utilitzaren extractes nuclears de fetge d'orada i una sonda que conté els nucleòtids compresos entre les posicions -66/-37 en relació a l'inici de transcripció del promotor de l'mALT hepàtica d'orada. Aquesta seqüència nucleotídica conté l'hipotètic lloc d'unió a HNF4α (HRE) situat entre -63/-39 (figura 30). Els experiments de retardació en gel revelaren que el complex DNA-proteïna format en l'assaig generava una banda de mobilitat retardada (carril 7 de la figura 34). Com a control positiu es va utilitzar una sonda que contenia la regió *consensus* d'unió a HNF4α (HNF4α-cons), que donava lloc a una banda de la mateixa mobilitat (carril 2)

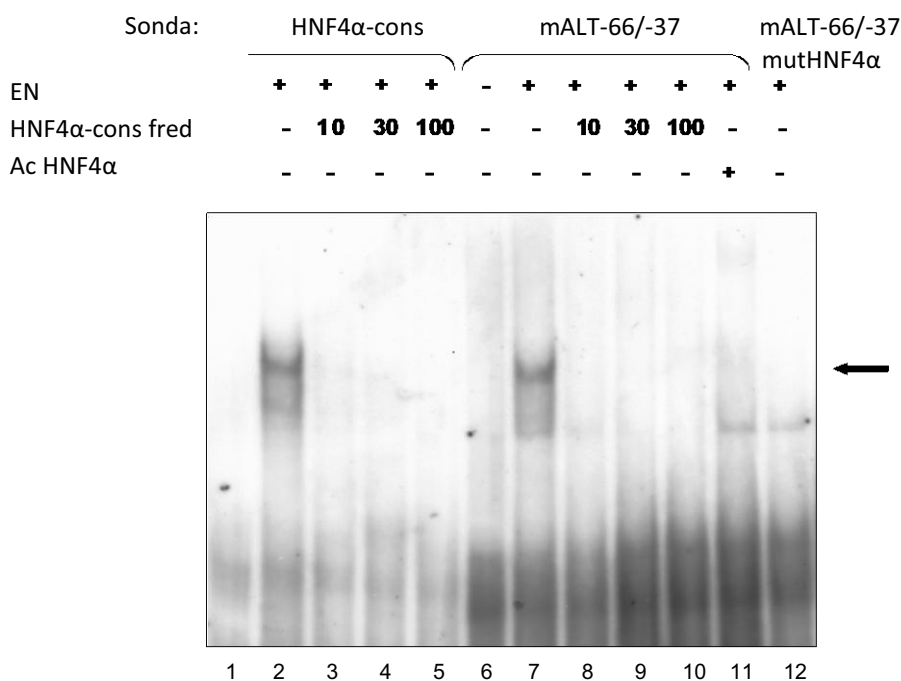


Figura 34. Experiments de retardació en gel.

Els assajos de retardació en gel s'han dut a terme utilitzant extractes nuclears (EN) hepàtics d'orada i les sondes marcades HNF4α-cons (carrils 1-5), mALT-66/-37 (carrils 6-11), o mALT-66/-37mutHNF4α (carril 12). Les mostres aplicades en els carrils 1 i 6 corresponen a assajos efectuats en absència d'extractes nuclears. En els carrils 2 i 7 s'observa una banda retardada, corresponent a la unió en presència d'extractes nuclears i oligonucleòtid marcat (HNF4α-cons, mALT-66/-37), i en absència del competidor. Els carrils 3 a 5 i 8 a 10 mostren els estudis de competició realitzats amb 10, 30 i 100 vegades respectivament, d'excés molar de competidor no marcat (HNF4α-cons fred). L'assaig de superretardació (carril 11) ha estat efectuat utilitzant un anticòs anti-HNF4α (Ac HNF4α) (20 µg). Els oligonucleòtids utilitzats estan descrits a l'apartat 3.2. La figura és representativa de 3 experiments realitzats independentment.

En efectuar experiments de competició amb un excés molar de 10, 30 i 100 vegades de sonda HNF4 α -cons no marcada (carrils 8, 9 i 10, respectivament), la banda de mobilitat retardada desapareixia. Com a control positiu es va utilitzar la sonda HNF4 α -cons, que mostrava competició quan estava present un excés molar de 10, 30 i 100 vegades la sonda *consensus* no marcada (carrils 3, 4 i 5, respectivament). Els assajos de retardació efectuats utilitzant extractes nuclears de fetge d'orada i amb una sonda mutada en la regió HRE, -66/-37mutHNF4 α , mostren que la banda retardada observada en utilitzar les sondes HNF4 α -cons i mALT -66/-37, desapareix completament (carril 12). Addicionalment, es van realitzar assajos de superretardació utilitzant un anticòs anti-HNF4 α . La banda de mobilitat retardada produïda per la unió de la sonda mALT -66/-37 i la proteïna HNF4 α , present en els extractes nuclears, desapareix en presència de l'anticòs anti-HNF4 α (carril 11), fet que suggereix que la unió de l'anticòs a HNF4 α bloqueja la unió del factor de transcripció al lloc HRE present a la sonda. En conjunt, aquests experiments indiquen que HNF4 α s'uneix a la caixa HRE situada entre els pb -63/-39 en relació a l'inici de transcripció del promotor de l'mALT d'orada.

4.6.3 LA MUTACIÓ DE LA CAIXA HRE ELIMINA LA TRANSACTIVACIÓ PRODUÏDA PER HNF4 α

A fi de caracteritzar l'efecte que produeix la mutació del lloc HRE en el promotor de l'mALT vam obtenir el constructe reporter pGmALT1540mut. Aquest constructe conté el fragment de 1632 pb (-1540 a +92 en relació a l'origen de transcripció d'mALT) amb les mateixes mutacions que presenta l'oligonucleòtid de doble cadena mALT-66/-37mutHNF4 α que vam utilitzar en els assajos de retardació. Es van dur a terme experiments de cotransfecció en cèl·lules HEK293 utilitzant els constructes pGm1540, pGm1540mutHNF4 α i pGL3-*Basic* en presència del vector d'expressió per a HNF4 α d'orada. Tal com mostra la figura 35, HNF4 α no és capaç de promoure activació transcripcional quan el lloc HRE està mutat.

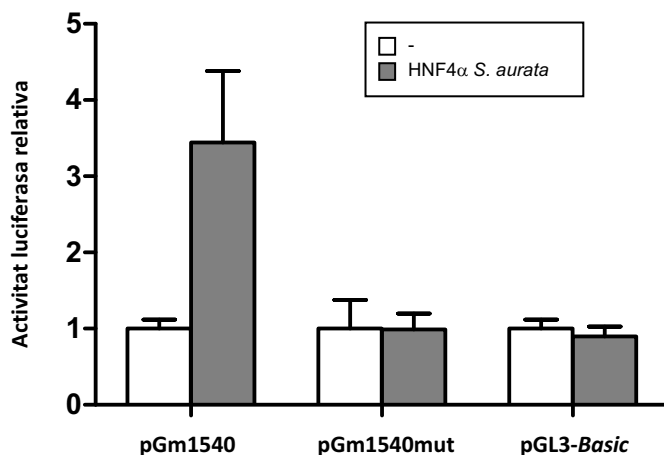


Figura 35. Efecte d'HNF4 α sobre l'activitat promotora d'mALT amb la caixa HRE mutada.

Els constructes pGm1540 i pGm1540mut i pGL3-*Basic* (2 μ g) foren cotransfectats en cèl·lules HEK293 juntament amb 0,2 μ g del vector d'expressió que codifica per a HNF4 α d'orada i 0,25 μ g de pCMV β . L'activitat luciferasa s'expressa com a vegades d'inducció de l'activitat promotora en relació a l'activitat obtinguda amb el constructe reporter en absència del factor de transcripció, valor que es va establir en 1. Les dades representen la mitja \pm SD dels valors observats en dos experiments independents efectuats per duplicat.

Aquests resultats indiquen que el lloc HRE situat entre els pb -63 i -39 en relació a l'inici de transcripció del promotor de l'mALT d'orada, és el responsable de la transactivació induïda per HNF4 α .

4.7 CLONACIÓ i REGULACIÓ de l'EXPRESSION d'HNF4 α

4.7.1 CLONACIÓ D'HNF4 α D'ORADA

Per tal de clonar el factor de transcripció HNF4 α d'orada, es va fer servir la tècnica d'*SMART RACE PCR* (figura 10). Primerament, es va amplificar un fragment de cDNA d'HNF4 α d'orada. A partir de les seqüències descrites per a HNF4 α de la base de dades es van dissenyar uns encebadors i, fent servir com a DNA motlle cDNA de fetge d'orada, es va fer una PCR. Com a resultat, es va obtenir un fragment de 1080 pb que va ser clonat en pGEM-T *Easy* (protocols descrits a l'apartat 3.17) i posteriorment seqüenciat. El fragment obtingut mostrava una elevada homologia amb les altres seqüències prèviament descrites per a HNF4 α . A partir d'aquesta seqüència, es van dissenyar els encebadors adequats per dur a terme l'obtenció dels extrems 5' i 3' del cDNA d'HNF4 α mitjançant la tècnica del RACE 5' i 3', respectivament.

Per obtenir l'extrem 5', van ser necessàries dues rondes de RACE 5' en què es van utilitzar els oligonucleòtids MC23/UPM i MC24/NUPM per a les PCR primària i secundària de la primera ronda, i els encebadors MC25/UPM i MC26/NUPM per a la segona ronda.

Per obtenir l'extrem 3', es va dur a terme una ronda de RACE 3' en què s'empraren els oligos MC27/UPM i MC28/NUPM per a les PCR primària i secundària, respectivament.

Un cop analitzada la seqüència del cDNA obtinguda a partir de les diferents PCRs, es van dissenyar dos oligonucleòtids, MC29 i MC30, que permetien amplificar la seqüència completa a partir de cDNA de fetge d'orada. El producte d'aquesta última PCR va ser clonat en pGEM-T *Easy* i posteriorment seqüenciat. Com a resultat, vam obtenir un total de 2341 pb. La mateixa operació es va dur a terme usant com a DNA motlle cDNA de ronyó d'orada, obtenint idèntics resultats, indicant així la presència de la mateixa isoforma en fetge i ronyó.

1	ggtagttgagaatttgtttgtccaagcgccggcagac ATGGACATGGCAGACTACAGCG	
		M D M A D Y S 7
61	AGGCTCTGGACCCAGCCTATACTACTGGAGTTCGAAAACATGCAAGTGTCCCACTGG	
	E A L D P A Y T T L E F E N M Q V L P L	27
121	GCACAGACTCCTCACGGGTGAGAGCGCCAACATGAACGCCACCGCCACCTGGGGCGG	
	G T D S S P A E S A N M N A T G H L G A	47
181	GCAGCCTCTGCGCCATATGTGGAGACAGAGCCACAGGCAAACTACGGGGCGTCCAGCT	
	G S L C A I C T G D R A T G K H Y G A S S	67
241	GTGACGGCTGCAAGGGCTTCTTACAGCAGCGTTCGCAAAAACCATGTACTCGTCA	
	C D G C K G F F R R S V R K N H M Y S C	87
301	GATTCAACAGACAATGCATCGTGGACAAAGACAAGCGAAATCAATGCAGATACTGCAGGC	
	R F N R Q C I V D K D K R N Q C R Y C R	107
361	TGAAGAAATGCTTCAGACCGGCATGAAGAAAGAAGCCGTGCAGAAATGAAAGAGACAGAA	
	L K K C F R A G M K K E A V Q N E R D R	127
421	TCAGCACCAGGAGTCCAGCTACGAGGACAGCAGTTTACCATCCATCAATGCACTCATCC	
	I S T R R S S Y E D S S L P S I N A L I	147
481	AGGCAGCTACTGTCAAGACAGATCACCTCCCCTGCTCTATACTGAACGGCGACATAA	
	Q A D V L S R Q I T S P A P I L N G D I	167
541	GGACCAAAAAGATCGCCACCATCACAGACGTGTGCGAGTCCATGAAGCAGCAGCTGCTGG	
	R T K K I A T I T D V C E S M K Q Q L L	187
601	TCCTGGTGGAGTGGGCCAAGTACATCCCAGCCTTCTGTGACCTGCCCTGGATGACCAGG	
	V L V E W A K Y I P A F C D L P L D Q	207
661	TGGCGCTGCTGCGAGCTCATGCCGAGAGCACCTTCTGCTCGGTGCTGCAAGAGGTCCA	
	V A L L R A H A G E H L L L G A A K R S	227
721	TGCTATACAAGGACATCCTCTTATTAGGAAATGACTACATCATTTCCAGAACTGCCCGG	
	M L Y K D I L L L G N D Y I I P R N C P	247
781	AGTTGGAGGTGGGCAGGGTAGCATTGAGAATCCTGGACGAGCTGGTGCTTCCCTCCAGG	
	E L E V G R V A L R I L D E L V L P F Q	267
841	AGCTTCAGATAGATGACAATGAATATGCCTGCTTGAAGCCATAGTTTCTTCGACCCAG	
	E L Q I D D N E Y A C L K A I V F F D P	287
901	ATGCTAAAGGTCTCAGTGACCTGGAAAGATCAAGCGGATGCGATACCAGGTCCAGGTCA	
	D A K G L S D P G K I K R M R Y Q V Q V	307
961	GCCTGGAAGACTACATCAACGACAGGCAGTACGACTCCCAGGGCCGCTTCGGGGAGCTGC	
	S L E D Y I N D R Q Y D S R G R F L G E L	327
1021	TCCTGCTGCTGCCGACGCTACAGAGCATCACCTGGCAGATGATCGAACAGATCCAGTTTG	
	L L L L P T L Q S I T W Q M I E Q I Q F	347
1081	TCAAACCTCTTCGGCATGGCCAAGATCGACAACCTGCTGCAGGAAATGCTCCTCGGAGGT	
	V K L F G M A K I D N L L Q E M L L G G	367
1141	CTGCCAATGAGGCTCCACATGCACCTCACTCTCTGCACCCCTCACCTGGTTCAGGAGCACC	
	S A N E A P H A P H S L H P H L V Q E H	387
1201	TCAGCAGCAATGTTATAGTGTCCAACAACATGCCAACGCCGATTCCATAATGGTCAAATCT	
	L S S N V I V S N N M P T P I H N G Q I	407
1261	CCACTCCTGAAACCCCGATCCCGTCTCCGCTACTGCCTCCAGCTCAGAACATTATAAAA	
	S T P E T P I P S P P T A S S S E H Y K	427
1321	TGGCACAGGGGGTCATAGCCACCGTGCCAAGCAGCCAACCTCCATCCCTCAGCCTACTA	
	M A Q G V I A T V P K Q P T S I P Q P T	447
1381	TTACAAGCAAGAGGCCATCTAAcaaccctctgcatccttaaatccttcagttttttttt	
	I T K Q E A I *	454
1441	ttttattgtgttaaacagggtcctttatatgtaagtttatacacaatcagcattgaagct	
1501	gtttaagtcctagctgtgtacgtagaatgtaattacaatgatggttccttgacagattgcagt	
1561	tttttcttcagggatctattgtttcacacacgcagctgcagctcgagctccacaaagcagc	
1621	gaatgccagacaaaactagaagcatccaaactctcagctcgtgctgtgttctgtgaagatc	
1681	gacacgtagaaacgcattgtgtatataatagtttattattgggttatatcacttccttca	
1741	gcgtggcctcagtggtgttcagtaaggctgatgttagacatggtgacgggatcatgtca	
1801	gtattttcatgaatgttacaacaggcctttacgatgtcatgtgtctagcgtgcacagat	
1861	tttatttcatgttcattagtgacaactctcagtagcaactttgaagatgtcatctcatca	
1921	aagctgaaggaaatcccttgaacgacttcagcatttgaggaatctatttgaaatcctct	
1981	gtgacaggactaaaaatattggttggtttgggtgactggaataatgcatatttacagta	
2041	ggaacatttgcaattcacaccaagaaatcttggatcattttgtgaagctgtggtgccac	
2101	tttgtaaaagtcacgagcacacatgctgaggaagtttccaataatattgtgtattgggt	
2161	tttaaaaaatatataattttttgttttagtactttgtgtggtttaaactggtgga	
2221	taaagtgtgcctttagcctgtactgccttacaacacaggcactatttcgcttacaat	
2281	gtgaagatgaatttaataatctcaaggtctatttttagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	
2341	a	

Figura 36. Seqüències nucleotídica i aminoàcida deduïda per l'HNF4α d'*Sparus aurata*.
 Els nucleòtids corresponents al marc obert de lectura apareixen en majúscules, mentre que les regions 5' i 3' UTR estan representades en minúscules. Els codons d'inici (ATG) i de parada (TAA) apareixen en negreta. Les seqüències de poliadenilació de l'extrem 3' estan subratllades. La seqüència aminoàcida deduïda per l'HNF4α d'*Sparus aurata* està representada en negreta i majúscules. A la seqüència nucleotídica de l'HNF4α d'orada li correspon el número FJ360721 en les bases de dades del *GenBank*.

A

<i>Spa</i> HNF4α	MMDADYSBAL	DPAYTTLEFE	NVOVLPICND	SSPAESANMN	ATGHLGAGSL	CAICGDRATG	KHYGASSCDG	CKGFFRRSVR	KNHMYSCREN	RQCIVDKDKR	100
<i>Tet</i> HNF4α	MMDADYSBAL	DPAYTTLEFE	NVOVLPICND	SSPAETANMN	ASSHLGTGSL	CAICGDRATG	KHYGASSCDG	CKGFFRRSVR	KNHMYSCREN	RQCIVDKDKR	100
<i>Dan</i> HNF4α	MMDADYSBAL	DPAYTTLEFE	NVOVLPICND	SSPAESANMN	AANHLGAGTL	CAICGDRATG	KHYGASSCDG	CKGFFRRSVR	KNHMYSCREN	RQCIVDKDKR	100
<i>Xen</i> HNF4α	MMDADYSBAL	DPAYTTLEFE	NVOVLPICND	TSTSDVTSLS	ASNSLGLNSL	CAICGDRATG	KHYGASSCDG	CKGFFRRSVR	KNHMYSCREN	RQCIVDKDKR	100
<i>Gal</i> HNF4α	MMDADYSBAL	DPAYTTLEFE	NVOVLPICND	RSPSEANLN	TSNSLGVLSL	CAICGDRATG	KHYGASSCDG	CKGFFRRSVR	KNHMYSCREN	RQCIVDKDKR	100
<i>Rat</i> HNF4α	MMDADYSBAL	DPAYTTLEFE	NVOVLPICND	TSPSEANLN	SSNSLGVLSL	CAICGDRATG	KHYGASSCDG	CKGFFRRSVR	KNHMYSCREN	RQCIVDKDKR	100
<i>Bos</i> HNF4α	MMDADYSBAL	DPAYTTLEFE	NVOVLPICND	TSPSEANLN	APNSLGVLSL	CAICGDRATG	KHYGASSCDG	CKGFFRRSVR	KNHMYSCREN	RQCIVDKDKR	100
<i>Hom</i> HNF4α	MMDADYSBAL	DPAYTTLEFE	NVOVLPICND	TSPSEANLN	APNSLGVLSL	CAICGDRATG	KHYGASSCDG	CKGFFRRSVR	KNHMYSCREN	RQCIVDKDKR	100
<i>Spa</i> HNF4α	NQCRYCRLKK	CFRAGMKKEA	VQNERDRIST	RRSSYEDSSL	PSINALIQAE	VLSQOITSPV	PIIINGDIRAK	KIATITDVCB	SMKQOLLVLV	EWAKYIPAFK	200
<i>Tet</i> HNF4α	NQCRYCRLKK	CFRAGMKKEA	VQNERDRIST	RRSSYEDSSL	PSINALIQAE	VLSQOITSPV	PIIINGDIRAK	KIATITDVCB	SMKQOLLVLV	EWAKYIPAFK	200
<i>Dan</i> HNF4α	NQCRYCRLKK	CFRAGMKKEA	VQNERDRIST	RRSSYEDSSL	PSINALIQAE	VLSQOITSPV	PIIINGDIRAK	KIATITDVCB	SMKQOLLVLV	EWAKYIPAFK	200
<i>Xen</i> HNF4α	NQCRYCRLKK	CFRAGMKKEA	VQNERDRIST	RRSSYEDSSL	PSINVLQAE	VLSQOITSPV	GVINGDIRGK	KIATITDVCB	SMKQOLLVLV	EWAKYIPAFK	200
<i>Gal</i> HNF4α	NQCRYCRLKK	CFRAGMKKEA	VQNERDRIST	RRSSYEDSSL	PSINVLQAE	VLSQOITSPV	LVINGDIRGK	KIATITDVCB	SMKQOLLVLV	EWAKYIPAFK	200
<i>Rat</i> HNF4α	NQCRYCRLKK	CFRAGMKKEA	VQNERDRIST	RRSSYEDSSL	PSINVLQAE	VLSQOITSPV	SGINGDIRAK	KIATITDVCB	SMKQOLLVLV	EWAKYIPAFK	200
<i>Bos</i> HNF4α	NQCRYCRLKK	CFRAGMKKEA	VQNERDRIST	RRSSYEDSSL	PSINVLQAE	VLSQOITSPV	SGINGDIRAK	KIATITDVCB	SMKQOLLVLV	EWAKYIPAFK	200
<i>Hom</i> HNF4α	NQCRYCRLKK	CFRAGMKKEA	VQNERDRIST	RRSSYEDSSL	PSINVLQAE	VLSQOITSPV	SGINGDIRAK	KIATITDVCB	SMKQOLLVLV	EWAKYIPAFK	200
<i>Spa</i> HNF4α	DLPLDDQVAL	LRAHAGEHLL	LGAAKRSMVF	KDVLILGNDY	IIVPRNCPPEL	EVSRVAVRIL	SDLVLPFOEL	QIDDNEYACL	KAIIFVDPDA	KGLSDPGKIK	299
<i>Tet</i> HNF4α	DLPLDDQVAL	LRAHAGEHLL	LGAAKRSMVF	KDVLILGNDY	IIVPRNCPPEL	EVSRVAVRIL	SDLVLPFOEL	QIDDNEYACL	KAIIFVDPDA	KGLSDPGKIK	299
<i>Dan</i> HNF4α	DLPLDDQVAL	LRAHAGEHLL	LGAAKRSMVF	KDVLILGNDY	IIVPRNCPPEL	EVSRVAVRIL	SDLVLPFOEL	QIDDNEYACL	KAIIFVDPDA	KGLSDPGKIK	299
<i>Xen</i> HNF4α	ELPLDDQVAL	LRAHAGEHLL	LGAAKRSMVF	KDVLILGNDY	IIVPRNCPPEL	EVSRVAVRIL	SDLVLPFOEL	QIDDNEYACL	KAIIFVDPDA	KGLSDPGKIK	299
<i>Gal</i> HNF4α	ELPLDDQVAL	LRAHAGEHLL	LGAAKRSMVF	KDVLILGNDY	IIVPRNCPPEL	EVSRVAVRIL	SDLVLPFOEL	QIDDNEYACL	KAIIFVDPDA	KGLSDPGKIK	299
<i>Rat</i> HNF4α	ELPLDDQVAL	LRAHAGEHLL	LGAAKRSMVF	KDVLILGNDY	IIVPRNCPPEL	EVSRVAVRIL	SDLVLPFOEL	QIDDNEYACL	KAIIFVDPDA	KGLSDPGKIK	300
<i>Bos</i> HNF4α	ELPLDDQVAL	LRAHAGEHLL	LGAAKRSMVF	KDVLILGNDY	IIVPRNCPPEL	EVSRVAVRIL	SDLVLPFOEL	QIDDNEYACL	KAIIFVDPDA	KGLSDPGKIK	300
<i>Hom</i> HNF4α	ELPLDDQVAL	LRAHAGEHLL	LGAAKRSMVF	KDVLILGNDY	IIVPRNCPPEL	EVSRVAVRIL	SDLVLPFOEL	QIDDNEYACL	KAIIFVDPDA	KGLSDPGKIK	300
<i>Spa</i> HNF4α	RMRYQOVVSL	EDYINDROYD	SRGRFGELL	LLPTLQSIITW	OMIEQIQVVK	LFGMAKIDNL	LQEMLLGGSA	NEAPHAPHSI	HPHIVQEHLS	SNVIVSNL	399
<i>Tet</i> HNF4α	RMRYQOVVSL	EDYINDROYD	SRGRFGELL	LLPTLQSIITW	OMIEQIQVVK	LFGMAKIDNL	LQEMLLGGSA	NEAPHAPHSI	HPHIVQEHLS	SNVIVSNL	399
<i>Dan</i> HNF4α	RMRYQOVVSL	EDYINDROYD	SRGRFGELL	LLPTLQSIITW	OMIEQIQVVK	LFGMAKIDNL	LQEMLLGGSA	NEAPHAPHSI	HPHIVQEHLS	SNVIVSNL	399
<i>Xen</i> HNF4α	RMRYQOVVSL	EDYINDROYD	SRGRFGELL	LLPTLQSIITW	OMIEQIQVVK	LFGMAKIDNL	LQEMLLGGSA	NEAPHAPHSI	HPHIVQEHLS	SNVIVSNL	400
<i>Gal</i> HNF4α	RMRYQOVVSL	EDYINDROYD	SRGRFGELL	LLPTLQSIITW	OMIEQIQVVK	LFGMAKIDNL	LQEMLLGGSA	NEAPHAPHSI	HPHIVQEHLS	SNVIVSNL	399
<i>Rat</i> HNF4α	RMRYQOVVSL	EDYINDROYD	SRGRFGELL	LLPTLQSIITW	OMIEQIQVVK	LFGMAKIDNL	LQEMLLGGSA	NEAPHAPHSI	HPHIVQEHLS	SNVIVSNL	400
<i>Bos</i> HNF4α	RMRYQOVVSL	EDYINDROYD	SRGRFGELL	LLPTLQSIITW	OMIEQIQVVK	LFGMAKIDNL	LQEMLLGGSA	NEAPHAPHSI	HPHIVQEHLS	SNVIVSNL	400
<i>Hom</i> HNF4α	RMRYQOVVSL	EDYINDROYD	SRGRFGELL	LLPTLQSIITW	OMIEQIQVVK	LFGMAKIDNL	LQEMLLGGSA	NEAPHAPHSI	HPHIVQEHLS	SNVIVSNL	400
<i>Spa</i> HNF4α	PTPIHNGQMS	TPETPQSPSP	TASSSEHYKM	ACGVIAIVVK	QPSSTIQQTI	TKQBAI	454				
<i>Tet</i> HNF4α	PTPIHNGQMS	TPETPQSPSP	TASSSEHYKM	ACGVIAIVVK	QPSSTIQQTI	TKQBAI	454				
<i>Dan</i> HNF4α	ATPIHNGQMS	TPETPQSPSP	TASSSEHYKM	ACGVIAIVVK	QPSSTIQQTI	TKQBAI	454				
<i>Xen</i> HNF4α	PSOLHNGQMS	TPETPQSPSP	TASSSEHYKM	ACGVIAIVVK	QPSSTIQQTI	TKQBAI	455				
<i>Gal</i> HNF4α	PTPIHNGQMS	TPETPQSPSP	TASSSEHYKM	ACGVIAIVVK	QPSSTIQQTI	TKQBAI	454				
<i>Rat</i> HNF4α	PTPIHNGQMS	TPETPQSPSP	TASSSEHYKM	ACGVIAIVVK	QPSSTIQQTI	TKQBAI	455				
<i>Bos</i> HNF4α	PTPIHNGQMS	TPETPQSPSP	TASSSEHYKM	ACGVIAIVVK	QPSSTIQQTI	TKQBAI	455				
<i>Hom</i> HNF4α	PTPIHNGQMS	TPETPQSPSP	TASSSEHYKM	ACGVIAIVVK	QPSSTIQQTI	TKQBAI	455				

B

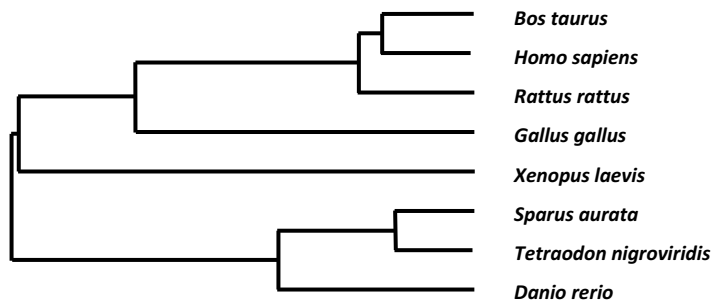


Figura 37. Aliniament múltiple i arbre filogenètic de seqüències d'HNF4α.

A. Aliniament múltiple de les seqüències aminoacídiques predites per *S. aurata* i altres animals. L'aliniament es va fer emprant el programa ClustalW. En negre es marquen els residus aminoacídics idèntics; en gris, substitucions conservatives d'aminoàcids. Les entrades de GenBank mostrades són: *Spa* HNF4α, *Sparus aurata* HNF4α (FJ360721); *Tet* HNF4α, *Tetraodon nigroviridis* HNF4α (CAG03838); *Dan* HNF4α, *Danio rerio* HNF4α (NP 919349); *Xen* HNF4α, *Xenopus laevis* HNF4α (CAA85763); *Gal* HNF4α, *Gallus gallus* HNF4α (NP 001026026); *Rat* HNF4α, *Rattus rattus* HNF4α (CAA40412); *Bos* HNF4α, *Bos taurus* HNF4α (NP 001015557) i *Hom* HNF4α, *Homo sapiens* HNF4α (CAA61133). B. Arbre filogenètic d'HNF4α d'*S. aurata* i altres seqüències reportades per a altres animals. L'arbre filogenètic va ser construït usant el programa informàtic TreeTop (<http://www.genebee.msu.su/services/phtreereduced.html>), basat en l'apilament múltiple mostrat a la figura A.

La seqüència clonada de 2341 pb, conté un marc obert de lectura (ORF) de 1365 pb. L'ATG inicial de l'ORF està inclosa en una seqüència *consensus* per a la iniciació transcripcional en vertebrats (Kozac, 2002). Un codó de parada es troba situat en 5' a 36 pb de l'ATG inicial, indicant així de que es disposa de tot l'ORF. Així mateix, disposa de dues senyals de poliadenilació (AATAAA) que es troben a 95 i 20 pb per sobre de la cua de poli(A+) (figura 36). La seqüència aminoacídica deduïda per HNF4 α d'orada, prediu una proteïna de 454 aminoàcids amb una massa molecular calculada de 50.68 kDa (figura 37A).

Per investigar la relació filogenètica de l'HNF4 α d'orada amb la d'altres vertebrats, la seqüència descrita va ser apilada amb la d'altres vertebrats emprant el programa ClustalW per posteriorment aplicar el sistema de predicció d'arbres filogenètics TreeTop (<http://www.genebee.msu.su/services/phtreereduced.html>). La seqüència d'orada va ser apilada amb les descrites pel peix zebra (*Danio rerio*), un peix globus (*Tetraodon nigroviridis*), granota (*Xenopus laevi*), brau (*Bos taurus*), rata (*Rattus rattus*), gall (*Gallus gallus*) i humà (*Homo sapiens*). L'anàlisi de l'apilament ens indica que la seqüència trobada mostra alta homologia amb la d'altres peixos, amb un 97% d'identitat amb *T. nigroviridis* i un 93% amb *D. rerio*. Si comparem amb altres vertebrats, *S. aurata* comparteix una identitat del 83% amb mamífers, un 84% amb *G. gallus* (au) i un 85% amb *X. laevi* (amfibi) (figura 37B).

Finalment, la regió del cDNA codificant per a la proteïna, va ser clonada en el vector pcDNA3 per permetre l'expressió en eucariotes.

4.7.2 EXPRESSIÓ D'HNF4 α EN TEIXITS D'ORADA

A partir d'RNA total aïllat d'orades alimentades, i mitjançant la tècnica de qRT-PCR, s'ha determinat l'expressió d'HNF4 α en diferents teixits: fetge, cervell, múscul esquelètic, cor, intestí, ronyó, brànquies, melsa i teixit adipós. HNF4 α s'expressa majoritàriament a l'intestí, el fetge i el ronyó, com està descrit per a altres espècies (Sladek i Seidel, 2001) (figura 38).

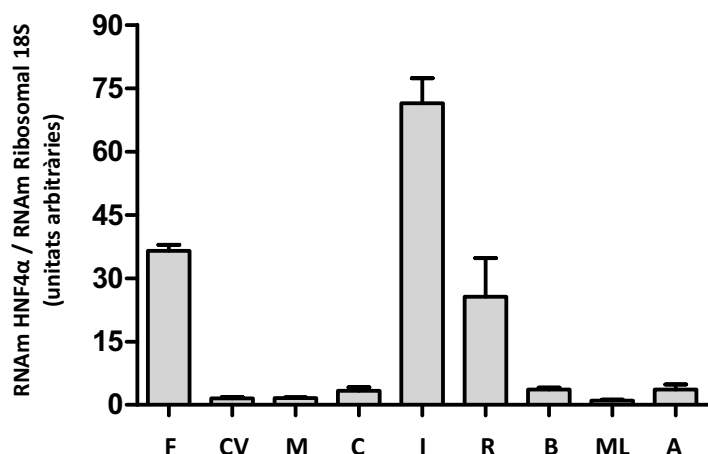


Figura 38: Anàlisi per qRT-PCR de l'expressió d'HNF4 α en diferents teixits d'*S. aurata*.

L'RNA total extret de fetge (F), cervell (CV), múscul esquelètic (M), cor (C), intestí (I), ronyó (R), brànquies (B), melsa (ML) i teixit adipós (A) d'orades alimentades es va sotmetre a un posterior anàlisi per qRT-PCR utilitzant oligonucleòtids específics per a HNF4 α . Es representen els resultats de dos experiments independents realitzats amb RNAm extret de teixits d'orades alimentades.

4.7.3 REGULACIÓ HORMONAL I NUTRICIONAL DE L'EXPRESSIÓ D'HNF4α

Un cop observada la transactivació d'mALT pel factor de transcripció d'HNF4α, ens vam proposar conèixer si l'expressió d'aquest factor de transcripció estava regulada per condicions nutricionals i hormonals en ronyó d'orades. Per a aquesta finalitat es va analitzar l'expressió d'HNF4α en extractes de ronyó procedents d'orades sotmeses a un període de 19 dies de dejú (apartat 3.1.2), i de peixos prèviament tractats amb insulina o STZ (apartat 3.1.4).

Experiments de qRT-PCR mostren que l'expressió d'HNF4α disminueix en un 40% en ronyó d'orades sotmeses a dejú, respecte al d'orades alimentades (figura 39).

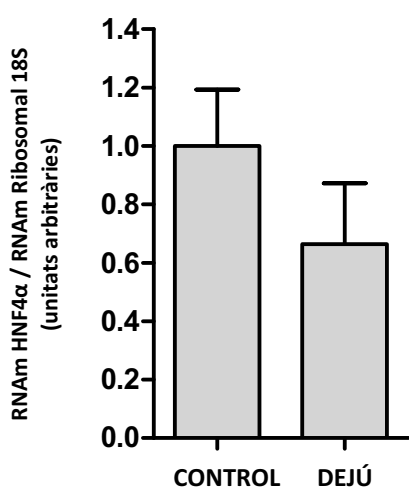


Figura 39: Efecte del dejú en l'expressió renal de l'HNF4α. Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNAm d'HNF4α en ronyó d'orades alimentades o sotmeses a dejú durant 19 dies. Els nivells d'RNAm de l'HNF4α relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a valors corresponents a la mitja ± SD de quatre pools de 2 a 3 ronyons cadascun, els valors representats foren obtinguts a partir de 2 experiments independents.

En relació a la regulació de l'expressió d'HNF4α en ronyó d'orades tractades amb STZ, experiments de qRT-PCR mostren que els nivells d'RNAm d'HNF4α disminueixen dràsticament en ronyó de peixos tractats amb STZ, essent els nivells un 83% inferiors als observats en individus control. En canvi, en tractar les orades amb insulina, no es produeix un canvi significatiu en els nivells de missatger HNF4α a les 6 h del tractament (figura 40).

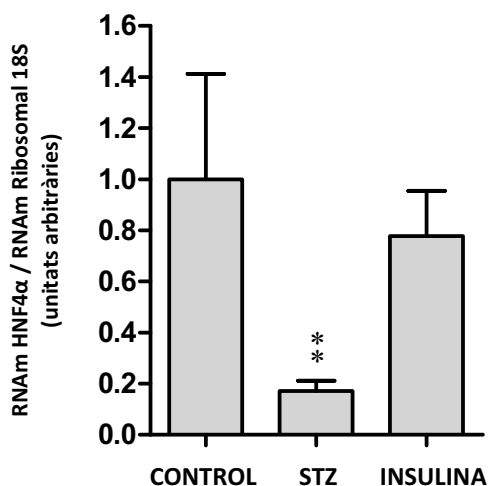


Figura 40: Efecte de l'STZ i la insulina en l'expressió renal d'HNF4α. Anàlisi per qRT-PCR dels nivells d'RNAm d'HNF4α en ronyó d'orades sacrificades 30 hores després de l'administració de solució salina (control), 30 hores després del tractament amb STZ (600 mg/kg de peix) o 6 hores després de la injecció de 10 UI d'insulina per kg de peix. Els nivells d'RNAm d'HNF4α relatius als nivells d'RNAm ribosomal 18S, són expressats com a valors corresponents a la mitja ± SD de quatre pools de 2 a 3 ronyons, valors obtinguts a partir de 2 experiments independents. La significació estadística en relació als animals control s'indica amb **P<0.01.

5. DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

Els peixos carnívors presenten baixa capacitat per utilitzar els carbohidrats de la dieta. En canvi, utilitzen de manera eficient els aminoàcids de les proteïnes per al creixement i l'obtenció d'energia (Ballantyne, 2001; Stone i col·l, 2003). De fet, en aquests organismes, els aminoàcids són una font d'energia més important que no pas els carbohidrats. La limitada capacitat per metabolitzar els carbohidrats i el perfil metabòlic que presenten els peixos carnívors després de l'administració de glucosa o la ingesta de dietes amb alt contingut en carbohidrats, va portar a considerar aquests organismes com a intolerants a la glucosa (Moon, 2001; Hemre i col·l, 2001, Novoa i col·l, 2004; Enes i col·l, 2009).

En els darrers anys els aminoàcids han emergit com a potents moduladors del metabolisme de la glucosa i la sensibilitat a la insulina. Estudis *in vitro* i *in vivo* indiquen que els aminoàcids participen en l'homeòstasi de la glucosa mitjançant la modulació de l'acció de la insulina en el transport de glucosa al múscul, actuant com a precursors gluconeogènics, influint en la secreció d'insulina i glucagó per part del pàncrees i regulant l'expressió de gens i proteïnes en diversos teixits (Linn i col·l, 2000; Tremblay i col·l, 2001, 2005; Krebs i col·l, 2002; 2005; Howell i Manning, 2011). A més, els aminoàcids activen la via de senyalització mTOR, l'activitat de la qual es troba incrementada al fetge d'animals obesos i en humans amb resistència a la insulina induïda per aminoàcids (Tremblay i col·l, 2001, 2005; Gual i col·l, 2003; Um i col·l, 2004; Baum i col·l, 2005; Khamzina i col·l, 2005). De fet, diversos estudis a llarg termini realitzats en humans, han relacionat el consum d'elevades quantitats de proteïna amb un increment en el risc de patir diabetis tipus 2 (Linn i col·l, 2000; Schulze i col·l, 2003; Fung i col·l, 2004; Song i col·l, 2004; Schulze i col·l, 2008; Vang i col·l, 2008; Sluijs i col·l, 2010).

En aqüicultura, els pinsos subministrats a peixos en cultiu tenen un elevat contingut en proteïnes. Les proteïnes i els lípids components d'aquests pinsos són majoritàriament procedents de peix (farines i olis de peix). Actualment, un dels principals objectius en l'aqüicultura està dirigit a minimitzar la quantitat de proteïna en la dieta subministrada als peixos en cultiu i reemplaçar-la, parcialment, per carbohidrats i nutrients més econòmics d'origen no marí, els quals cobririen les necessitats energètiques. A més, l'aport en excés de proteïnes amb la dieta provoca un increment en la degradació d'aminoàcids que dona lloc a una major alliberació d'amoni al medi per part dels peixos, augmentant així el risc d'eutrofització (Zhang i col·l, 2006; Thomas i col·l, 2010). Addicionalment, una disminució del contingut de proteïnes en les dietes utilitzades en piscicultura permetria reduir la pressió sobre els bancs de peixos oceànics, que estan essent sobreexplotats i on

una part important de les seves captures es dediquen a la manufacturació de pinsos per a peixos en cultiu (Naylor i col·l, 2000, 2009; Tacon i Metian, 2009).

Els estudis duts a terme en la present tesi s'emmarquen dins del projecte del grup dedicat a l'anàlisi de la funció de les isoformes ALT. La finalitat d'aquests estudis és determinar si és possible realitzar una intervenció biotecnològica sobre les isoformes ALT per tal de reduir part de la proteïna de la dieta que els peixos destinen a finalitats energètiques. S'intenta forçar així a què aquests organismes utilitzin fonts alternatives d'energia, com ara els carbohidrats, i per tant reduir la quantitat de proteïnes que és necessari subministrar als peixos en cultiu. Així mateix, ens vam plantejar estudiar la regulació d'altres enzims clau en el metabolisme d'aminoàcids en orada, en especial aquells implicats en el metabolisme mitocondrial. El mitocondri té com a principal funció obtenir energia en forma d'ATP a partir de la fosforilació oxidativa de carbohidrats, proteïnes i greixos. La disfunció mitocondrial ha estat relacionada amb malalties com ara la resistència a la insulina, cardiomiopatia, malalties d'Alzheimer, de Parkinson i de Luft, entre d'altres (revisions: Johannsen i Ravussin, 2009; Murrow i Hoehn, 2010). En estudis recents, el nostre grup ha analitzat la regulació transcripcional, l'expressió i les característiques cinètiques de les isoformes citosòliques de l'alanina aminotransferasa, cALT1 i cALT2 d'orada (Anemaet i col·l, 2008, 2010). Per tal de caracteritzar la isoforma mitocondrial mALT, ens vam plantejar analitzar la distribució tissular, estudiar la regulació nutricional i hormonal, analitzar les característiques cinètiques de l'enzim i caracteritzar el promotor del gen que codifica per a mALT. Addicionalment, es va determinar l'expressió a nivell d'RNAm d'altres enzims importants en el metabolisme d'aminoàcids, com ara l'aspartat aminotransferasa mitocondrial (AST2), la glutamat deshidrogenasa (GDH), amb un paper important en la síntesi/degradació del glutamat, i la glutamina sintetasa (GlnS), implicada en la producció de glutamina com a principal sistema de detoxificació d'amoni en peixos amoniotèlics com ara l'orada.

5.1 METABOLISME D'AMINOÀCIDS EN DIFERENTS CONDICIONS NUTRICIONALS I HORMONALS

En peixos, l'excedent dels aminoàcids necessaris per al creixement, no pot emmagatzemar-se directament, amb la qual cosa, els aminoàcids són desaminats i oxidats via TCA o convertits a greixos i carbohidrats (Ballantyne, 2001; Stone i col·l, 2003). En peixos teleostis que com l'orada, són amoniotèlics, el principal producte final de la degradació dels aminoàcids és l'amoni. En peixos, els nivells d'amoni estan influenciats pel contingut de proteïna en la dieta (Beamish i Thomas, 1984;

Carvalho i col·l, 2009), i incrementen marcadament després d'un àpat (Brown i Cameron, 1991; Wicks i Randall, 2002a). L'amoní excretat és molt superior en animals alimentats que no pas en situació de dejú (Guerin-Ancey, 1976; Kaushik i Teles, 1985). El principal mecanisme de producció d'amoní és la transdesaminació.

En aquest estudi, la determinació dels nivells d'RNAm mitjançant qRT-PCR dels enzims mALT, GDH, AST2 i GlnS en diferents teixits d'orades alimentades indica que l'enzim mALT s'expressa a ronyó, fetge i intestí, i en menor quantitat en els altres teixits analitzats. La GDH s'expressa fonamentalment al fetge, seguit del cor, ronyó i intestí. L'AST2 és present majoritàriament en cor, múscul esquelètic, cervell, fetge i ronyó. La GlnS s'expressa fonamentalment en cervell, seguida d'altres òrgans com ara el fetge, l'intestí i el ronyó.

La distribució tissular de l'ALT mitocondrial no ha estat estudiada prèviament en altres espècies de peixos, i en mamífers difereix en funció de l'espècie analitzada. En humans, la isoforma mitocondrial ALT2 és expressada en grans quantitats en múscul, greix, ronyó i cervell i en menor mesura en fetge i mama (Yang i col·l, 2002). En ratolí, l'RNAm d'ALT2 s'expressa de forma important en múscul, fetge i teixit adipós blanc, i s'observen nivells moderats en cervell i ronyó (Jadhao i col·l, 2004). En rata, l'expressió és més elevada en múscul i fetge, seguit de teixit adipós blanc i cervell, i en menor quantitat en cor, ronyó i còlon (Yang i col·l, 2009). L'expressió d'mALT en orades és diferent a la trobada en els mamífers analitzats, donat que en aquests organismes, múscul, teixit adipós i fetge són els teixits on es troba la major expressió a nivell d'RNAm. Si comparem amb les isoformes citosòliques ALT descrites en orada, la distribució d'mALT és semblant a la de cALT1, que s'expressa fonamentalment en fetge, cervell, múscul esquelètic, intestí i ronyó en peixos alimentats (Anemaet i col·l, 2008).

Els valors més elevats d'activitat GDH en altres espècies de peixos, es troben a fetge, i nivells més baixos es troben també en ronyó, intestí, brànquies, cervell i múscul esquelètic (Auerswald i col·l, 1997; Walton i Cowey, 1977; Wicks i Randall, 2002b). Aquesta distribució d'activitat en els diferents teixits es correspon amb els nivells d'RNAm de GDH trobats en orada.

La distribució tissular d'AST2 en teixits no ha estat prèviament analitzada en peixos. En humans, els nivells d'expressió a nivell d'RNAm més alts es donen a ronyó, placenta, estómac, melsa i en fetge (Pol i col·l, 1988); distribució no coincident amb la trobada en orada. En peixos, els valors d'activitat AST total més elevats s'han reportat en cervell, cor, múscul i fetge (Jürss, 1979, 1981; Jürss i col·l, 1985; Wicks i Randall, 2002b), distribució que s'assemblaria més a la trobada en orada. L'elevada

expressió d'AST2 trobada en cervell, podria estar relacionada amb la participació d'AST2 en la síntesi del neurotransmissor glutamat i en l'important paper que té la llançadora malat-aspartat, de la qual forma part, en aquest òrgan, per a la transferència d'equivalents reduïts des del citosol al mitocondri (Palaiologos i col·l, 1989; McKenna i col·l, 2006). En peixos, s'ha descrit que AST2 en múscul esquelètic participa en el cicle dels nucleòtids purina, que adquireix importància durant l'exercici i la hipòxia (Lowestein i Goodman, 1978, Van Waarde, 1981, 1983; Mommsen i Hochachka, 1988).

En altres teleostis, el teixit on principalment s'expressa la GlnS és el cervell, amb activitats molt superiors a les observades en altres òrgans com ara l'intestí, i el fetge, on l'activitat és de 50 a 100 vegades inferior a la trobada en cervell (Webb i Brown, 1976; Chamberlin i col·l, 1991; Wang i Walsh, 2000; Wicks i Randall, 2002a; Mommsen i col·l, 2003; Essex-Fraser i col·l, 2005).

En condicions d'alimentació, fetge, intestí i ronyó són probablement els teixits on el metabolisme d'aminoàcids és més actiu en orada, donat que és en aquests teixits on l'expressió de transaminases (mALT, cALT1) i GDH és més important. La GlnS en orada, a l'igual que en altres espècies de peixos (Webb i Brown, 1976; Chamberlin i col·l, 1991; Wang i Walsh, 2000; Wicks i Randall, 2002a; Mommsen i col·l, 2003; Essex-Fraser i col·l, 2005), s'expressa majoritàriament en cervell, on s'ha descrit que té una important funció de protecció d'aquest òrgan front la toxicitat de l'amoni producte de la degradació d'aminoàcids (Jow i col·l, 1999; Iwata i col·l, 2000). Els nivells d'RNAm de GlnS en fetge, intestí i ronyó, també són elevats en relació amb els altres teixits analitzats, encara que els nivells d'expressió són 6, 10 i 60 vegades inferiors, respectivament, que els trobats en cervell. L'elevada expressió de GlnS en aquests teixits d'orada probablement sigui deguda a la producció putativa d'elevades quantitats d'amoni derivades de l'activitat de les transaminases i la GDH. En experiments duts a terme en truita irisada (Karlsson i col·l, 2006) i juvenils d'*Oxyeleotris marmorata* (Tng i col·l, 2008) ja es va indicar que una part dels aminoàcids de la dieta es metabolitzen en l'intestí, on s'observa que l'alimentació promou un increment en les activitats GDH i GlnS (Tng i col·l, 2008). Així mateix, en exposar peixos a amoni exogen, la GlnS incrementa la seva activitat, els nivells de proteïna i d'RNAm en fetge, intestí i múscul (Anderson i col·l, 2002; Peh i col·l, 2010).

El fetge juga un paper important en la regulació dels nivells d'aminoàcids en sang i en la síntesi de glucosa i altres metabòlits a partir dels productes de degradació de l'excedent d'aquests metabòlits. En aquest teixit, l'ALT exerceix una funció essencial en el metabolisme intermediari per obtenir energia i proveir substrats gluconeogènics. Les activitats ALT i AST són quantitativament les aminotransferases més importants al fetge dels peixos teleostis (Cowey i Walton, 1989). A partir

d'estudis del nostre grup i d'altres investigadors, l'activitat ALT en fetge és considerada un bon indicador de la utilització de proteïna de la dieta en els peixos teleostis (Fynn-Aikins i col·l, 1995; Sánchez-Muros i col·l, 1998; Metón i col·l, 1999a, Fernández i col·l, 2007). Prèviament havíem reportat un comportament diferenciat entre les activitats ALT i AST en fetge d'*S. aurata* en funció de l'estat nutricional. En fetge d'orada, l'activitat ALT disminueix en situació de dejú i és més sensible que l'AST a canvis en la composició de la dieta o quantitat d'aliment subministrat (Metón i col·l, 1999a). El nostre grup ha clonat tres isoenzims ALT en fetge d'*S. aurata*. Les isoformes citosòliques cALT1 i cALT2, producte de l'ensamblament alternatiu del gen citosòlic cALT, i la mitocondrial mALT, primera seqüència aminoacídica animal descrita per a una ALT mitocondrial (Metón i col·l, 2004b; Anemaet i col·l, 2008). En el fetge d'orades, l'expressió de cALT2 incrementa en condicions relacionades amb un increment de la gluconeogènesi, com ara situacions de dejú i el tractament amb STZ, mentre que els nivells d'RNAm de cALT1 incrementen en situacions en què s'aporta aliment i la seva expressió sembla més relacionada amb l'aprofitament dels nutrients de la dieta després de la ingesta (Anemaet i col·l, 2008).

Estudis previs del nostre grup indicaren que en fetge d'orades en dejú, disminueix l'expressió d'enzims glicolítics, tals com la GK, PFK-1 i PK, de l'enzim bifuncional PFKFB1, i d'enzims implicats en la ruta de les pentoses fosfat, G6P-DH i 6PG-DH, alhora que incrementa l'expressió d'enzims gluconeogènics com ara la G6Pasa i FBPasa en fetge d'orada (Metón i col·l, 1999a,b; Caseras i col·l, 2000, 2002).

En el present estudi hem observat que les orades sotmeses a dejú presenten uns nivells d'RNAm d'mALT en fetge inferiors als observats en orades alimentades i que aquesta disminució en els nivells d'RNAm es correspon amb una menor activitat ALT en mitocondri. L'activitat ALT citosòlica també va mostrar una disminució durant el dejú, probablement deguda als nivells més baixos d'RNAm de cALT1 trobats en orades en dejú (Anemaet i col·l, 2008), encara que el descens en l'activitat ALT és menor que l'observat al mitocondri. Una baixada en l'activitat ALT total durant el dejú va ser descrita anteriorment en fetge d'orades (Metón i col·l, 1999b). En canvi, els nivells de missatger hepàtics de la isoforma cALT2, incrementen en resposta al dejú (Anemaet i col·l, 2008).

Els enzims GDH, AST2 i GlnS mostren el mateix comportament que mALT. Després de 19 dies de dejú, els nivells d'RNAm en fetge d'orada disminueixen.

En orades alimentades, els nivells d'expressió d'mALT, GDH i AST2 en fetge són superiors als observats durant una situació de dejú, indicant que probablement aquests enzims estan relacionats amb processos catabòlics, d'aprofitament dels aminoàcids per a l'obtenció d'energia mitjançant el

procés de transdesaminació. En canvi, durant el dejú, els nivells d'RNAm dels enzims d'mALT, GDH i AST2 disminueixen, disminució que es podria explicar per la manca de l'excés d'aminoàcids procedents de la dieta per a l'obtenció d'energia o una disminució del metabolisme basal. Durant el dejú prolongat, a banda de la depleció de glicogen, que en orada els seus nivells ja són baixos després de 8 dies de dejú (García de Frutos i col·l, 1990), i la mobilització de les reserves lipídiques per a l'obtenció d'energia i glucosa, es produeix la degradació de les proteïnes del múscul amb finalitats energètiques. Per tant, en orada, mALT, GDH i AST2 mantindrien un nivell d'expressió suficient per a l'aprofitament d'aquests aminoàcids com a font energètica durant una situació de dejú. En peixos, l'elevada expressió d'aquests enzims en resposta als nivells d'aminoàcids aportats amb la dieta també ha estat suggerida en estudis de la regulació de les activitats enzimàtiques en base al subministrament de dietes amb diferent contingut proteic. Així, en *Rhamdia quelen* alimentats amb dietes altes en proteïna, s'ha observat un increment de les activitats ALT, AST i GDH hepàtiques, juntament amb un increment en l'excreció de nitrogen, la qual cosa suggereix que l'excés d'esquelets carbonatats procedents dels aminoàcids és utilitzat per cobrir les demandes energètiques (Melo i col·l, 2006). De la mateixa manera, el nostre grup ha observat en orades alimentades amb una dieta alta en proteïnes i baixa en carbohidrats un increment en les activitats AST i ALT en fetge (Metón i col·l, 1999b; Fernández i col·l, 2007). Respostes similars van ser observades en truita irisada per a l'ALT i GDH (Sánchez-Muros i col·l, 1998) i en *Anguilla anguilla* per GDH (Suárez i col·l, 1995). No es descarta, però, que en fetge d'orades sotmeses a dejú l'activitat GDH sigui més alta o es mantingui, malgrat l'RNAm d'aquest enzim sigui més baix, donat que aquest enzim s'activa en condicions de baix estat energètic (l'ADP es comporta com a un activador al·lostèric de l'enzim). De fet, en truites sotmeses a dejú durant 4 setmanes, Sánchez-Muros i col·l (1998) van trobar que l'activitat GDH era dues vegades superior que la trobada en truites alimentades. No obstant, en la mateixa espècie, Tranulis i col·l (1991) prèviament havien indicat que l'activitat GDH no va mostrar canvis durant un període de dejú similar. En llobarro, l'activitat GDH disminueix després de 9 dies de dejú quan els peixos prèviament han estat alimentats amb una dieta amb un contingut proteic del 50%, o bé no s'observen variacions en l'activitat d'aquest enzim si aquests peixos van ser alimentats amb una dieta elaborada amb un 42% de proteïna (Pérez-Jiménez i col·l, 2007).

Estudis previs realitzats en orada indiquen que l'activitat AST en fetge dels peixos en dejú incrementa, possiblement degut a la contribució de la isoforma citosòlica (Metón i col·l, 1999). Pel que fa a la GlnS, l'expressió d'aquest enzim disminueix dràsticament en fetge d'orades sotmeses a dejú. Aquesta menor expressió seria congruent amb la disminució que s'ha reportat dels nivells d'amoni en algunes espècies de peixos, que arriben a ser 10 vegades inferiors en peixos sotmesos a

situació de dejú respecte els alimentats (Guerin-Ancey, 1976; Kaushik i Teles, 1985), la qual cosa estaria indicant que en aquesta situació no fos tant necessària la síntesi de glutamina per a la detoxificació de l'amoni. Com en orada, l'activitat GlnS en rates, va mostrar un lleuger descens durant el dejú degut a una disminució del nombre de cèl·lules que expressen l'enzim (Lie-Venema i col·l, 1998). De manera similar, en fetge de ratolins en dejú, es va observar una disminució de l'expressió de la GlnS d'1.9 i 2.9 vegades després de 24h o 48h de dejú, respectivament (Bauer i col·l, 2004). Arola i col·l (1981) van reportar un decrement significatiu en l'activitat GlnS en fetge, estómac, intestí i cervell de rates sotmeses a dejú durant 24h, però un increment en l'activitat muscular; aquests resultats van ser confirmats en un estudi més recent de Mouchard i col·l (2008) en què van determinar que després de 5 dies de dejú, l'activitat GlnS disminuïa en fetge de rates fins a dues vegades, mentre que l'activitat en múscul era superior a l'observada en rates alimentades. De fet, la glutamina, a l'igual que l'alanina pot ser utilitzada per a la producció de glucosa i es podria pensar que en múscul d'orada també es pogués donar un comportament similar a l'observat en rata.

En orades, la realimentació a curt termini (24h) dels peixos sotmesos prèviament a dejú restaura els nivells d'RNAm d'mALT en fetge. No obstant, els nivells d'activitat ALT mesurats en extractes mitocondrials no van recuperar els valors observats en peixos control fins als 8 dies de realimentació, fet que podria ser degut a modificacions postraduccionals de la proteïna, ja que s'ha reportat que resulta inhibida per modificacions com la glicació (Beranek i col·l, 2001). La recuperació de l'activitat després d'un dia o més de realimentació s'ha observat per als enzims glicolítics PFK-1 i PK, l'activitat quinasa de l'enzim bifuncional PFKFB1, l'enzim gluconeogènic G6Pasa i els enzims relacionats amb la via de les pentoses fosfat G6P-DH i 6PG-DH (Metón i col·l, 1999a,b). Les isoformes cALT1 i cALT2 també recuperen els nivells inicials d'RNAm després de realimentar durant 24 hores les orades sotmeses a dejú. En el cas de cALT1 els nivells de missatger incrementen per retornar als nivells basals en condicions d'alimentació i en el cas de cALT2 els nivells d'RNAm, elevats durant el dejú, disminueixen fins arribar als nivells inicials (Aneamet i col·l, 2008). Quan es va determinar l'activitat ALT en citosol, es va observar que l'activitat es recupera, a l'igual que al mitocondri, als 8 dies de realimentació.

Els nivells d'RNAm corresponents als enzims GDH i AST2 hepàtics es recuperen passades 24h després de la realimentació. No obstant, els nivells d'expressió de la GlnS hepàtica d'orada continuen essent baixos després de 8 dies de realimentació, malgrat que s'observa un increment gradual en els seus nivells d'expressió. Probablement, durant els períodes inicials de realimentació, les proteïnes es destinen prioritàriament a creixement, donat que en estudis duts a terme al nostre laboratori, s'han

reportat disminucions significatives en el pes corporal de les orades després d'un període de dejú de 19 dies. Per tant, la producció d'amoní podria ser més baixa, essent necessari una menor quantitat d'activitat GlnS, si més no al fetge.

En mamífers, l'STZ, en promoure necrosi del pàncrees, origina una situació similar a la de diabetis tipus 1. En aquesta situació de dèficit d'insulina circulant, la glucosa no pot ser incorporada als teixits perifèrics i s'origina hiperglicèmia. Els teixits gluconeogènics estarien produint glucosa i per tant, l'expressió de l'activitat dels enzims implicats en la gluconeogènesi es troba incrementada, com s'ha reportat en mamífers (Sugita i col·l, 2008).

En fetge d'orades tractades amb STZ, hem observat que els nivells d'RNAm d'mALT disminueixen, així com l'activitat ALT hepàtica tant en mitocondri com en citosol. L'expressió a nivell d'RNAm dels enzims AST2, GDH i GlnS en fetge, també descendeix, a l'igual que en el cas d'mALT, en resposta a l'administració d'STZ. En estudis previs realitzats al nostre grup es va reportar també una menor expressió de la isoforma citosòlica cALT1 en fetge d'orades tractades amb STZ en relació als controls (Anemaet i col·l, 2008). En canvi, cALT2 experimenta un increment en la seva expressió, contribuint així a la producció de glucosa endògena a partir d'aminoàcids després de l'administració d'STZ (Anemaet i col·l, 2008). En fetge de rates sotmeses a tractament amb STZ, Rasschaert i col·l (1994), van trobar que l'activitat GDH tendia a disminuir. No obstant, altres investigacions han indicat que els nivells de proteïna GDH incrementaven, encara que no significativament (Hwang i col·l, 2008). Posteriorment, i de manera congruent amb els nostres resultats, Hwang i col·l (2009) van reportar mitjançant *microarrays* que l'expressió d'un 80% dels gens relacionats amb el metabolisme d'aminoàcids es trobava disminuïda en tractar rates amb STZ, entre ells l'ALT1, amb una disminució de 3.6 vegades, i la tirosina aminotransferasa, amb un decrement en els nivells d'RNAm de 2.6 vegades. No obstant això, en fetge de rates tractades amb STZ, s'ha observat que o bé les activitats ALT i AST no experimenten canvis significatius (Singh i col·l, 2001), o bé disminueixen (Fernandes i col·l, 2010) o fins i tot incrementen (Prakasam i col·l, 2004).

A fi de caracteritzar cinèticament l'enzim, l'mALT d'orada va ser sobreexpressada en *S. cerevisiae*. La proteïna sobreexpressada, detectada per *Western Blot* utilitzant un anticòs anti-ALT d'orada, presentava un pes molecular estimat de 54KDa i tenia activitat ALT. Al representar els inversos de l'activitat ALT obtinguda front als inversos de les concentracions de substrat utilitzades s'observaven gràfiques doble-recíproques que indiquen que la reacció segueix un mecanisme *ping-*

pong, tal com s'ha descrit per a les ALTs d'altres organismes. Experimentalment vam trobar que els valors de K_m observats per a la isoforma mALT d'orada per a l'L-Ala, α -KG, L-Glu i Pyr són de $2.22 \text{ mM} \pm 0.221$, $0.21 \text{ mM} \pm 0.036$, $11.3 \text{ mM} \pm 2.651$ i $0.32 \text{ mM} \pm 0.169$, respectivament. La major diferència en les constants cinètiques de les isoformes ALT citosòliques i mitocondrials es va trobar en els valors de K_m per a l' α -KG que fou 4 vegades superior per a l'mALT d'orada. Actualment es desconeix si aquesta característica cinètica estaria condicionant la direcció de la reacció o bé si és el resultat d'una diferència en la concentració d' α -KG entre el citosol i el mitocondri.

Els estudis cinètics realitzats indiquen que mALT catalitza de manera preferent la formació d'L-Glu i Pyr a partir d'L-Ala i α -KG (reacció directa). La relació V_{\max} / K_m per a l'alanina és major que l'observada per al glutamat. Els valors d'activitat ALT determinats d'acord amb la reacció directa, en presència de concentracions d'L-Ala i α -KG a les què l'activitat és màxima, van ser set vegades superiors als observats mitjançant la reacció inversa (formació d'L-Ala i α -KG a partir d'L-Glu i Pyr), en presència de concentracions òptimes d'L-Glu i Pyr a les què l'activitat és màxima. En els assajos duts a terme en presència de concentracions de substrat òptimes per a la reacció inversa i baixes per als substrats de la reacció directa, la direcció de la reacció per a mALT continuava indicant que la reacció directa està afavorida. A més, en assajos d'activitat on es relacionava l'activitat de la reacció directa respecte l'activitat de la reacció inversa, mesurades en les condicions òptimes de substrat per a cadascun dels enzims mALT i cALT1, hem observat que mALT catalitza la reacció directa dues vegades més eficaçment que cALT1. De fet, en l'estudi d'Anemaet i col·l (2008), es va proposar que la cALT1 catalitzaria preferentment la reacció inversa. Podria ser que, a l'igual que amb l'AST de mamífers, cALT1 i mALT catalitzessin reaccions oposades canalitzant així els diversos substrats/productes de la reacció d'un compartiment a l'altre de la cèl·lula. De manera similar a *S. aurata*, els estudis cinètics d'mALT realitzats en brànquies del bivalve *Corbicula japonica* indicaren que l'mALT catalitza preferentment la reacció de formació de piruvat (reacció directa) (Hayashi i col·l, 1993). Les mateixes relacions es van reportar per a l'enzim de fetge de rata (Swick, 1965; Walker i Barret, 1991).

L'mALT d'orada en catalitzar més eficientment la reacció directa, podria donar lloc a la formació neta de piruvat i glutamat. El piruvat format podria ser convertit a PEP per ser exportat al citosol i transformar-se a glucosa, per ser aquesta emmagatzemada com a glicogen, o bé formar acetil-coA a la matriu mitocondrial, que podria derivar cap a la formació d'àcids grassos al citosol en situacions d'alimentació o bé podria ser oxidat en el TCA. El glutamat format podria captar amoni i ser transformat a glutamina mitjançant l'acció de la GlnS mitocondrial, ser emprat per a la síntesi de proteïnes, o bé ser utilitzat per la GDH, que el desaminaria per formar α -KG. L' α -KG podria ser

utilitzat de nou per diverses transaminases, integrar-se al TCA, o bé participar en la llançadora malat-aspartat (figura 41).

En els estudis *in vitro* realitzats en extractes de llevat que sobreexpressen mALT d'orada, l'AOA origina una disminució en l'activitat mALT tant en la reacció directa com en la inversa. No obstant, en estudis recents duts a terme en el nostre laboratori, s'ha observat que *in vivo*, l'administració intraperitoneal en orades d'AOA no inhibeix l'activitat ALT mitocondrial, mentre que l'activitat total resulta inhibida. Probablement la impossibilitat d'aquest compost per travessar la membrana mitocondrial sigui la causa de l'absència d'inhibició d'mALT per AOA *in vivo* (González i col·l, 2011). Per tant, aquest compost no seria el més adequat per tractar d'inhibir l'mALT *in vivo*.

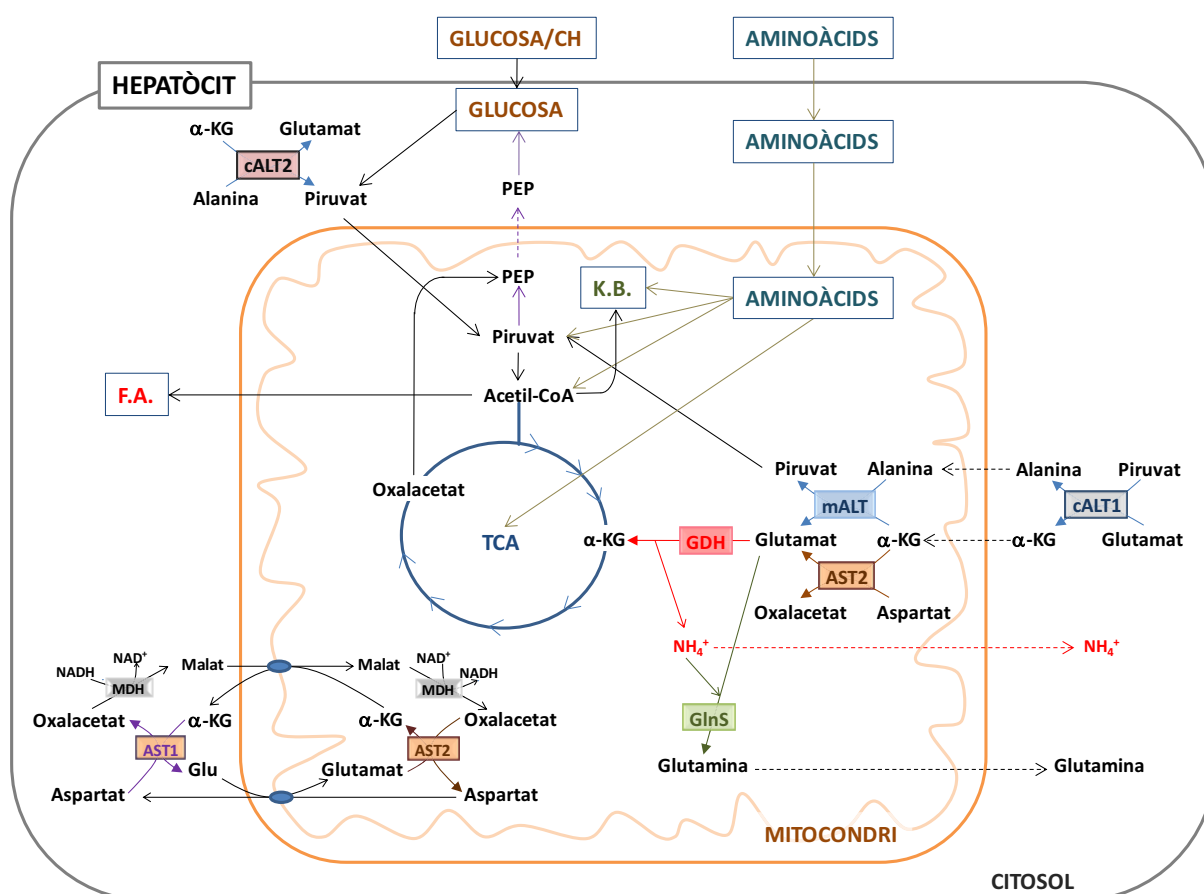


Fig 41. Model del metabolisme d'aminoàcids en fetge d'orada.

Es representen els enzims mALT, cALT1, cALT2, GDH, AST1, AST2, GlnS i malat deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37). Durant l'alimentació, l'expressió d'mALT, cALT1, GDH, AST2 i GlnS en fetge d'orades es troba incrementada. L'mALT estaria catalitzant la formació de piruvat i glutamat a partir d'alanina i α-cetoglutarat. Es mostren els diferents destins que podrien tenir aquests metabòlits. La cALT1 podria donar lloc a la reacció inversa ALT. L'AST2 participaria en el procés de transdesaminació o bé en la llançadora malat-aspartat. La GlnS estaria formant glutamina a partir de l'amoni produït per la GDH que actuaria en la direcció de desaminació. Durant el dejú o després del tractament amb STZ, hi ha menor expressió dels enzims mALT, cALT1, GDH, AST2 i GlnS en fetge d'orades. Els nivells de cALT2 serien superiors que els observats en condicions d'alimentació i podrien promoure un increment en el nivell de glucosa hepàtica a partir de l'alanina derivada de la proteòlisi del múscul.

Els nostres resultats mostren que l'mALT sembla més eficaç en la catalització de la conversió d'L-Ala i α -KG en Pyr i L-Glu (reacció directa). En condicions d'alimentació, mALT s'expressa en teixits metabòlicament molt actius, que presenten concomitantment l'expressió d'altres enzims importants en el metabolisme dels aminoàcids com ara la GDH, GlnS i la transaminasa cALT1. L'anàlisi dels nostres estudis en orada indiquen que l'expressió de la isoforma mALT és elevada en condicions d'alimentació i disminueix en condicions relacionades amb la gluconeogènesi, com ara el tractament amb STZ o el dejú, tant en fetge com en ronyó. El seguiment dels canvis postprandials en l'expressió d'mALT en resposta a l'administració d'aliment a orades alimentades regularment un cop al dia, va portar a l'observació de què els nivells hepàtics d'RNAm corresponents a mALT tendien a incrementar després de 6h d'haver alimentat els peixos. En les condicions analitzades, hem trobat que els nivells d'expressió d'mALT es modulen, la qual cosa suggereix que l'enzim tindria un rol important que podria ser complementari al de la isoforma cALT1, que resulta modulada de la mateixa manera que mALT i presenta una distribució tissular similar. Per tant, mALT i cALT1, podrien cooperar per direccionar els aminoàcids de la dieta al mitocondri per destinar-los a l'obtenció d'energia. Per altra banda, hem comprovat que la variació en la quantitat de proteïna de la dieta, del 45% al 60%, no afecta ni els nivells d'RNAm d'mALT ni l'activitat ALT mitocondrial en fetge d'orades, en canvi, l'activitat ALT citosòlica incrementa quan el contingut de proteïna de la dieta és més elevat (resultats no presentats). Aquests resultats suggereixen que mALT podria estar implicada en el metabolisme energètic basal a partir d'aminoàcids i que seria cALT1, de localització citosòlica, la que metabolitzaria l'excedent d'aminoàcids aportats amb la dieta. Donat que mALT sembla implicada en el metabolisme basal, la inhibició parcial d'aquesta podria ajudar a forçar la utilització d'altres nutrients amb finalitats energètiques com ara els carbohidrats. No obstant, caldria realitzar més estudis per determinar la importància d'aquest enzim en el metabolisme aminoacídic. En aquest sentit, s'estan duent a terme assajos d'inhibició i sobreexpressió de les diferents isoformes ALT *in vitro* i *in vivo* per comprovar com es veu afectat el metabolisme intermediari d'orades com a conseqüència de canvis en l'expressió d'aquests enzims. Addicionalment, també s'estan estudiant mitjançant el sistema de doble híbrid les possibles interaccions amb altres proteïnes.

5.2 CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DE L'mALT

El coneixement de la regulació de l'expressió d'ALT a nivell transcripcional és actualment escàs. Gray i col·l (2007) van reportar que el factor de transcripció KLF15 indueix l'expressió del gen ALT1, però no el d'ALT2, en ratolins. Posteriorment, Takashima i col·l (2010) van mostrar que ratolins injectats amb un adenovirus que conté un shRNA contra KLF15 (shKLF15) presentaven una disminució significativa dels nivells hepàtics d'RNAm de l'ALT1 hepàtic. Per altra banda, Thulin i col·l (2008), reportaren que el factor de transcripció PPAR α promou l'activació del promotor ALT1 en hepatòcits, mentre que no afecta la transcripció d'ALT2. En orades, en un estudi dut a terme al nostre laboratori, Anemaet i col·l (2010) van clonar i caracteritzar el promotor del gen cALT d'*S. aurata* i van determinar que els factors p300 i cMyb participen en l'activació transcripcional del promotor.

En el nostre estudi, amb la finalitat de conèixer la regulació transcripcional d'mALT, vam aïllar i caracteritzar la regió promotora d'mALT d'*S. aurata*. Un fragment de 1632 pb adjacent a la regió 5' del gen que codifica per a l'mALT va ser aïllat després de dues rondes consecutives de recorregut cromosòmic a partir de DNA genòmic d'*S. aurata*. La funcionalitat de la presumpta regió promotora de l'mALT va ser estudiada al transfectar cèl·lules HEK293 amb constructes de fusió del fragment genòmic aïllat amb el gen reporter luciferasa. Es van realitzar deleccions seqüencials de l'extrem 5' del fragment de 1632 pb i es va efectuar l'anàlisi de l'activitat promotora després de la transfecció d'aquests constructes en cèl·lules HEK293. Aquests estudis van indicar que la regió promotora que conté els 49 pb corrent amunt respecte l'inici de transcripció del gen és essencial per a l'activitat basal d'mALT i constitueix el nucli funcional del promotor per a aquest gen.

La presència de diversos elements de resposta a HNF4 i l'evidència de la participació d'HNF4 α en el control transcripcional de diversos enzims reguladors del metabolisme de proteïnes com ara tirosina aminotransferasa, ornitina aminotransferasa, alfa 1-antitripsina i GlnS (Monaci i col·l, 1988; Kimura i col·l, 1993; Inoue i col·l, 2002; Stalunović i col·l, 2007), ens va portar a investigar la possible implicació d'HNF4 α en el control transcripcional d'mALT. Addicionalment, vam clonar la proteïna HNF4 α d'orada per tal de determinar si aquest factor de transcripció podria ser responsable de la baixa capacitat que presenten els peixos carnívors de metabolitzar la glucosa, donat que en humans s'ha reportat que determinades mutacions en la seqüència proteica d'HNF4 α estan relacionades amb l'aparició de MODY1.

El cDNA que codifica per a HNF4 α d'*S. aurata* va ser aïllat a partir d'RNAm de ronyó. La proteïna deduïda de la seqüència de cDNA clonada és de 454 aminoàcids i altament homòloga a la isoforma

HNF4 α 1 humana. La comparació de la seqüència proteica d'HNF4 α d'*S. aurata* amb les reportades per a altres vertebrats va revelar un alt grau de conservació d'aquesta proteïna en peixos, amfibis, aus i mamífers. Els nostres resultats i l'anàlisi de l'arbre filogenètic són consistents amb la jerarquia taxonòmica. La seqüència proteica de l'HNF4 α d'orada té major homologia amb la d'altres peixos que no pas amb mamífers, aus o amfibis. Considerant els peixos, l'HNF4 α d'orada i de *Tetraodon nigroviridis*, que pertanyen al mateix superordre (Acanthopterygii), comparteixen entre elles un major grau d'homologia que amb l'HNF4 α de *Danio rerio*, que pertany al superordre Ostariophysi. Els residus aminoacídics assenyalats com a importants per a l'estructura i la funció dels dominis d'AF-1, AF-2 i LBD apareixen totalment conservats a l'HNF4 α d'*S. aurata*, com ara els aminoàcids Y6, Y14, F19, L10 i L17, essencials per a la funció AF-1, i S181, M182, Q185, L219, L220, R226, K300, E327, I338, I346, E363, importants pels LBD i AF-2 (Green i col·l, 1998; Bogan i col·l, 2000; Hertz i col·l, 2003; Aggelidou i col·l, 2004; Iordanidou i col·l, 2005). Les mutacions D69A, R80Q, G115S, V121I, R125W, R127W, T130I, D206Y, R244Q, V255M, M364R, E276Q, R303H, I314F, R324H, G326R, L332P, T339I, V393I i I454V s'han relacionat amb l'aparició de MODY1 en humans (Furuta i col·l, 1997; Sladek i col·l, 1998; Malecki i col·l, 1999; Moller i col·l, 1999; Navas i col·l, 1999; Saud i col·l, 1999; Lausen i col·l, 2000; Price i col·l, 2000; Pruhova i col·l, 2003; Zhu i col·l, 2003; Oxombre i col·l, 2004). Donat que cap d'aquestes mutacions apareix en la proteïna d'orada, no sembla que HNF4 α sigui responsable de l'aparició d'intolerància a la glucosa en aquests animals.

Comparant la seqüència trobada per a HNF4 α d'orada amb l'HNF4 α 1 humana, s'observa una homologia del 83%. Les zones més conservades són les corresponents al domini d'unió al DNA, amb un 98% d'homologia i el LBD, amb un 88% de conservació. Les regions activadora AF-1 i repressora F, tenen una homologia del 68% i 62% respectivament. Per tant, les regions més relacionades amb la unió al DNA i dimerització de l'enzim serien altament homòlogues, la qual cosa explicaria que tant l'HNF4 α d'orada com la de rata presentin el mateix efecte d'activació del promotor d'mALT d'orada per unió a l'HRE. L'LBD a més de la seva funció estructural, interacciona amb diversos factors de transcripció. PGC1 α i SRC-3, interaccionen amb els residus M182, L219, L220 i I338 d'HNF4 α ; mutacions en aquests aminoàcids provoquen una pèrdua en la coactivació amb HNF4 α (Iordanidou i col·l, 2005). En estudis previs en què es va caracteritzar el promotor de la G6Pasa d'orada, es va mostrar un efecte sinèrgic entre HNF4 α i PGC1 α en l'activació transcripcional d'aquest gen, cosa que seria raonable ja que els residus relacionats amb la interacció d'ambdós factors de transcripció estan conservats en orada (Salgado i col·l, 2004). Les diferències a nivell de seqüència aminoacídica en la regió AF-1, implicada en la interacció amb altres factors de transcripció i coactivadors que podrien modular la interacció d'HNF4 α amb el promotor, estarien indicant que en orada aquests factors

podrien ser diferents als trobats en mamífers. La repressió de la transcripció d'HNF4 α , mediada per la regió F, podria ser també diferent en orada.

Els experiments de transfecció transitòria duts a terme en cèl·lules HEK293 emprant diferents constructes que contenen fragments del promotor mALT d'*S. aurata* amb delecions en la regió 5', ens va permetre demostrar que HNF4 α , tant d'orada com de rata, confereix un senyal d'activació mitjançant la unió a l'HRE situat a les posicions -63/-39 corrent amunt de l'inici de transcripció del promotor del gen mALT d'*S. aurata*. Mitjançant experiments d'EMSA emprant una sonda que incloïa aquest element del promotor i extractes nuclears de fetge d'*S. aurata* de peixos alimentats, es va observar la formació d'un complex DNA-proteïna amb la mateixa mobilitat que quan fou emprada una sonda *consensus* per a HNF4 (HNF4-cons). El complex format va desaparèixer per competició amb un excés d'HNF4-cons no marcat. A més, mutacions puntuals en l'element de resposta a HNF4 provocaren que no es pogués formar el complex de retardació. Els experiments de transfecció en HEK293 amb el constructe pGm1540mutHNF4, obtingut a partir del vector reporter pGm1540, on s'havia inclòs les mateixes mutacions en l'HRE, van mostrar la pèrdua total de l'activació transcripcional promoguda per HNF4 α . En conjunt, aquests resultats indiquen que HNF4 α està implicat en l'activació transcripcional del promotor mALT d'*S. aurata* i que la inducció de la transcripció es dona per unió a l'element de resposta a HNF4 situat a les posicions -63/-39 corrent amunt de l'inici de transcripció del promotor del gen mALT. A més, en experiments de transfecció transitòria d'HEK293 amb el promotor cALT d'*S. aurata*, no s'observà que HNF4 α incrementés l'activitat transcripcional d'aquest promotor, resultats que suggereixen que HNF4 α exerceix un efecte activador específic sobre el gen mALT.

Utilitzant cèl·lules SBL, derivades de la larves de llobarro, es va estudiar l'efecte del coactivador p300 sobre el promotor mALT clonat. La transfecció amb el vector que codifica per p300 promou una activació del promotor de fins a 250 vegades. Assajos de delecions i EMSA indiquen la presència de més d'un lloc en *cis* en el promotor del gen mALT com a possibles responsables de l'efecte observat. L'expressió de p300 s'ha relacionat amb la coactivació d'una gran diversitat de gens. Així, se l'ha relacionat amb la reparació del DNA per la seva interacció amb l'antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA) (Hasan i col·l, 2001) i amb l'activació de gens tant gluconeogènics com glicolítics: després de l'estimulació per glucagó, el coactivador transcripcional 2 regulat per CREB (CRTC2) per associació amb p300, estimula l'expressió de gens gluconeogènics en una primera fase del dejú (Liu i col·l, 2008) i per altra banda, l'increment en l'expressió de la GK per insulina en hepatòcits primaris de rata és mediat a nivell de promotor per la interacció de p300 amb els factors de transcripció HIF-1 α i HNF4 (Roth i col·l, 2004). En quant al metabolisme proteic, s'ha assenyalat que en cèl·lules

humanes de càncer de còlon deficientes en p300, hi ha una disminució en els nivells del transcrit corresponent a GDH (Bundy i col·l, 2006). A més, els estudis d'Anemaet i col·l (2010) indiquen que p300 activa el promotor que regula el gen cALT en fetge d'orades amb gluconeogènesi incrementada. En els nostres estudis, la regulació de l'expressió de p300 en fetge d'orada a nivell d'RNAm no es correspon amb la regulació d'mALT en aquest teixit. No obstant, seria d'interès estudiar possibles interaccions de p300 amb altres factors de transcripció que poguessin estar regulant la interacció amb el promotor d'mALT en situacions d'alimentació, així com la relació i interacció de p300 i mALT en altres teixits.

Els factors de transcripció KLF15 i PPAR no van mostrar cap efecte sobre el promotor d'mALT d'orada (resultats no presentats). No obstant, estudis recents mostren que el factor de transcripció KLF15, l'expressió del qual augmenta en ratolins dejunats o diabètics, promou l'increment dels nivells de missatger ALT1 i els d'altres enzims relacionats amb la gluconeogènesi, com ara els de la PEPCCK i la G6Pasa (Teshigawara i col·l, 2005; Gray i col·l, 2007; Takashima i col·l, 2010). Gray i col·l (2007) van demostrar que ratolins deficientes en KLF15 presenten una severa hipoglucèmia en dejú deguda a l'ineficient catabolisme d'aminoàcids i que per tant limitaria la disponibilitat de substrats gluconeogènics. Així doncs, en ratolins deficientes en KLF15, es va reportar una disminució en els nivells d'ALT1, prolina deshidrogenasa, triptòfan 2,3-dioxigenasa, àcid 4-hidroxifenilpirúvic dioxigenasa, aminotrasferasa d'aminoàcids de cadena ramificada mitocondrial (BCAT2) i d'ornitina transcarbamilasa (OTC). De manera congruent amb una disminució d'un 50% en els nivells d'RNAm d'ALT1 en hepatòcits deficientes en KLF15, la injecció de piruvat, però no d'alanina, permet revertir la hipoglicèmia observada en situació de dejú, indicant que els ratolins deficientes en KLF15 tenen encara capacitat de realitzar gluconeogènesi, però són menys efectius en utilitzar l'alanina com a font de substrat gluconeogènic. En rata, la distribució d'ALT1 en la zona periportal hepàtica, zona on predomina la gluconeogènesi a partir de l'alanina (Lenartowicz i Wojtczac, 1988; Dieterle i col·l, 1978; Matsuzawa i col·l, 1997; Botini i col·l, 2005), i el fet que el dejú prolongat produeix un increment en l'activitat citosòlica ALT però no de la mitocondrial (Swick i col·l, 1965) suggereixen que ALT1 és un enzim relacionat amb la utilització d'alanina per a gluconeogènesi. Per tant, la inducció transcripcional d'ALT1 per KLF15 és congruent amb el seu paper en la gluconeogènesi. En canvi, en el cas dels enzims mitocondrials mALT d'orada, l'expressió de la qual és superior en condicions d'alimentació, i ALT2 de mamífers, que es troba distribuït a la zona perivenosa i que la seva expressió no s'indueix en condicions de dejú (Swick i col·l, 1965), no és sorprenent que el factor de transcripció KLF15 no mostri un efecte regulador (Gray i col·l, 2007).

El factor de transcripció PPAR α , l'expressió del qual s'indueix en condicions de dejú, està principalment involucrat en el control metabòlic de l'expressió de gens que codifiquen enzims que intervenen en l'oxidació d'àcids grassos en mitocondris i peroxisomes, suggerint que PPAR α promou la resposta transcripcional durant el dejú (Costet i col·l, 1998; Leone i col·l, 1999; Kersten i col·l, 1999, 2000). En humans, PPAR α és un activador transcripcional d'ALT1 i AST1, en canvi, el promotor d'ALT2 humà no ha mostrat activació per a aquest factor de transcripció (Tomkiewicz i col·l, 2004; Thulin i col·l, 2008), la qual cosa feia pensar que el promotor d'mALT tampoc respongués a PPAR α , tal com hem comprovat experimentalment.

Estudis de l'expressió d'HNF4 α per qRT-PCR indiquen que la distribució tissular d'HNF4 α en *S. aurata* és consistent amb la descrita per a humans i rates (Sladek i col·l, 1990; Taraviras i col·l, 1994), essent el fetge, intestí i ronyó els teixits on s'expressa de forma majoritària. Precisament els teixits on l'expressió d'HNF4 α és major, són aquells on l'expressió d'mALT és més elevada. HNF4 α podria tenir, per tant, un paper important en l'expressió d'mALT específica de teixit. Aquesta hipòtesi també ha estat suggerida per a altres enzims, com ara l'aldehid deshidrogenasa 2, enzim mitocondrial involucrat en el metabolisme de l'acetaldehid, i que, a l'igual que mALT, la seva expressió disminueix en dejú, per disminució de la unió d'HNF4 α al promotor d'aquest gen degut a la fosforilació d'HNF4 α per PKA en les condicions esmentades (You i col·l, 2002).

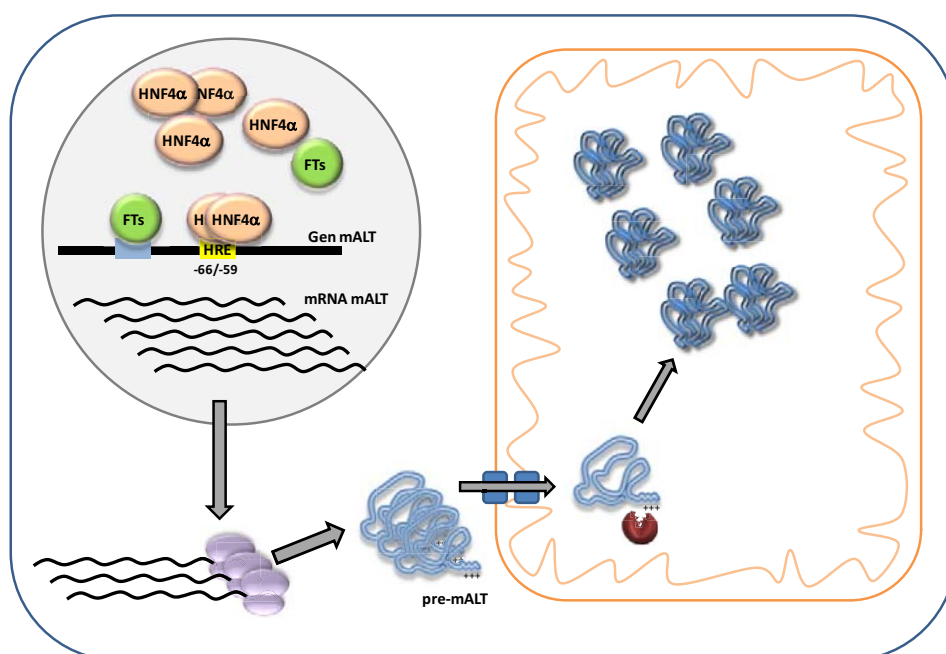


Fig 42. Transactivació del gen mALT d'*S. aurata* per HNF4 α en ronyó en condicions d'alimentació o gluconeogèniques.

Durant l'alimentació els nivells d'HNF4 α són alts. HNF4 α s'uneix a l'HRE del gen mALT i augmenten els nivells de missatger d'mALT, promovent així un increment de proteïna mALT renal.

Durant el dejú o després del tractament amb STZ, es produeix una disminució en els nivells d'HNF4 α . Això provoca una menor transcripció del gen mALT i per tant una menor quantitat de proteïna mALT renal.

Donat que el ronyó és el teixit on l'expressió d'mALT és més elevada i presenta unes taxes d'oxidació d'alanina molt elevades (en ronyó de salmó atlàntic aquesta és 10 vegades superior a la taxa d'incorporació d'alanina a glucosa; Mommsen i col·l, 1985), vam estudiar l'expressió d'HNF4 α i mALT a nivell d'RNAm en ronyó d'*S. aurata* en resposta a diferents situacions nutricionals i hormonals. Els nostres resultats indiquen que el dejú causa una disminució en els nivells d'HNF4 α i mALT en ronyó d'orada. De manera consistent amb la disminució de l'expressió d'mALT durant el dejú, el tractament amb STZ, condició que promou l'increment de gluconeogènesi, va originar un descens en els nivells d'RNAm d'mALT i HNF4 α . Niehof i Borlak (2008) també han reportat una disminució en els nivells d'HNF4 α al ronyó de rates tractades amb STZ. Donat que la disminució de l'expressió d'HNF4 α es correlaciona amb uns nivells baixos d'RNAm d'mALT en ronyó d'orades sotmeses a dejú o tractades amb STZ, els nostres resultats suggereixen que HNF4 α pot tenir un paper important en la regulació transcripcional d'mALT en aquest teixit (figura 42).

En base als nostres resultats es pot considerar que la disminució de l'expressió dels factors de transcripció HNF4 α o p300 pot promoure un descens en els nivells d'mALT, la qual cosa podria afavorir que una menor quantitat de proteïna fos utilitzada pels peixos com a font d'energia. No obstant, seria convenient realitzar estudis per determinar quins efectes a nivell metabòlic es produirien com a conseqüència d'una silenciació gènica d'HNF4 α o p300, donat que aquests factors de transcripció estan implicats en el control transcripcional de molts altres gens relacionats amb el metabolisme de glúcids, lípids i en el creixement cel·lular, entre d'altres.

6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. L'anàlisi mitjançant qRT-PCR de l'expressió tissular d'enzims implicats en el metabolisme d'aminoàcids indica que en orada mALT s'expressa principalment en ronyó, fetge i intestí. La GDH s'expressa preferentment en fetge; en altres teixits com en cor, ronyó i intestí els nivells d'RNAm també són elevats. L'AST2 s'expressa en major mesura en cor, múscul esquelètic, cervell i fetge. L'expressió de la GlnS és majoritària a cervell, seguidament el fetge i l'intestí són els òrgans que presenten uns nivells d'RNAm més elevats.
2. En fetge d'orada, els nivells d'RNAm d'mALT i l'activitat ALT mitocondrial disminueixen en sotmetre les orades a una situació de dejú. Als 8 dies de realimentació, ambdós paràmetres recuperen els valors observats en orades control. En tractar les orades amb STZ, els nivells d'RNAm d'mALT i l'activitat ALT mitocondrial de fetge disminueixen.
3. Els nivells d'RNAm corresponents a GDH, AST2 i GlnS disminueixen en fetge d'orades sotmeses a dejú o després del tractament amb STZ. Un dia després de realimentar les orades prèviament sotmeses a una situació de dejú es recuperen els nivells d'RNAm corresponent a GDH i AST2. Als 8 dies de realimentació encara no s'observa recuperació de l'expressió de GlnS.
4. L'expressió d'mALT d'*S. aurata* en *S. cerevisiae* genera una proteïna amb activitat ALT. Estudis cinètics indiquen que l'mALT d'orada segueix un mecanisme de reacció *Ping-Pong Bi-Bi* i que catalitza preferentment la reacció de conversió d'L-alanina a piruvat (reacció directa). La relació entre l'activitat ALT determinada a través de la reacció directa respecte la inversa, quan es mesura en les condicions òptimes de substrat, indica que mALT catalitza més eficaçment que cALT1 la reacció directa. L'AOA es comporta com a inhibidor de l'activitat mALT tant quan es mesura a través de la reacció directa i inversa.
5. Mitjançant recorregut cromosòmic es va clonar un fragment de 1632 pb de la regió adjacent a l'extrem 5' del gen mALT d'*Sparus aurata*. Estudis en cèl·lules HEK293 indiquen que el promotor mínim funcional de l'mALT resideix en els 49 pb corrent amunt de l'inici de transcripció del gen mALT.
6. HNF4 α transactiva el promotor mALT d'*S. aurata* per unió a l'element de resposta HRE localitzat entre les posicions -63/-39 respecte a l'inici de transcripció.
7. S'ha clonat el cDNA que codifica per a l'HNF4 α d'orada. L'anàlisi *in silico* de la seqüència indica alta homologia amb la descrita per a la d'altres HNF4 α animals. Els aminoàcids importants per a la seva funció es troben conservats. L'HNF4 α d'orada i rata exerceixen una

activació similar sobre el promotor mALT d'orada. HNF4 α no es comporta com a activador del promotor del gen cALT d'orada.

8. HNF4 α s'expressa preferentment a fetge, intestí i ronyó d'orada, teixits on l'expressió d'mALT és més elevada. En ronyó d'orada, el dejú i el tractament amb STZ promouen una disminució en els nivells d'RNAm d'HNF4 α i mALT.

7. REFERÈNCIES

7. REFERÈNCIES

A.

- Adibi, P., Sadeghi, M., Mahsa, M., Rozati, G. & Mohseni, M. (2007). Prediction of coronary atherosclerotic disease with liver transaminase level. *Liver International*, 27, 895-900.
- Aggelidou, E., Iordanidou, P., Tsantili, P., Papadopoulos, G. & Hadzopoulou-Cladaras, M. (2004). Critical Role of Residues Defining the Ligand Binding Pocket in Hepatocyte Nuclear Factor-4 α . *Journal of Biological Chemistry*, 279, 30680-30688.
- Ahn, S.-H., Shah, Y. M., Inoue, J., Morimura, K., Kim, I., Yim, S., Lambert, G., Kurotani, R., Nagashima, K., Gonzalez, F. J. & Inoue, Y. (2008). Hepatocyte nuclear factor 4 α in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14, 908-920.
- Alexis, M. N. & Papaparaskeva-Papoutsoglou, E. (1986). Aminotransferase activity in the liver and white muscle of Mugil capito fed diets containing different levels of protein and carbohydrate. *Comp Biochem Physiol B*, 83, 245-249.
- Anderson, P.M., Broderius, M.A., Fong, K.C., Tsui, K.N.T., Chew, S.F. & Ip, Y.K. (2002). Glutamine synthetase expression in liver, muscle, stomach and intestine of *Bostrichthys sinensis* in response to exposure to a high exogenous ammonia concentration. *Journal of Experimental Biology*, 205: 2053-2065.
- Andoh, T. & Nagasawa, H. (1997). Homologous enzyme immunoassay for insulin and stimulation of insulin secretion by amino acids and glucose in the barfin flounder, *Verasper moseri* (Pleuronectidae) In: *Kawashima, S., Kikuyama, S. (Eds.), Advances of comparative endocrinology, Proceedings of Thirteenth International Congress on Comparative Endocrinology. Monduzzi Editore, Bologna*, 1149-1153.
- Andoh, T. & Nagasawa, H. (1998). Stimulation of insulin secretion by amino acids in starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst.*, 62, 107-113.
- Andoh, T. (2007). Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 151, 308-317.
- Andrews, N. C. & Faller, D. V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 19, 2499.
- Anemaet, I. G., Metón, I., Salgado, M. C., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2008). A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of Sparus aurata. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 2833-2844.
- Anemaet, I. G., González, J. D., Salgado, M. C., Giral, M., Fernández, F., Baanante, I. V. & Metón, I. (2010). Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol*, 45, 119-132.
- Anuradha, S., Radha, V. & Mohan, V. Association of novel variants in the hepatocyte nuclear factor 4A gene with maturity onset diabetes of the young and early onset type 2 diabetes. *Clinical Genetics*, 2010. DOI: 10.1111
- Anty, R., Iannelli, A., Patouraux, S., Bonnafous, S., Lavallard, V. J., Senni-Buratti, M., Ben Amor, I., Staccini-Myx, A., Saint-Paul, M. C., Berthier, F., Huet, P. M., Le Marchand-Brustel, Y., Gugenheim, J., Gual, P. & Tran, A. (2010). A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 32, 1315-1322.
- Aranda, A. & Pascual, A. (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews*, 81, 1269-1304.
- Arillo, A., Margiocco, C., Melodia, F., Mensi, P. & Schenone, G. (1981). Ammonia toxicity mechanism in fish: Studies on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5: 316-328.
- Arola, L., Palou, A., Remesar, X. & Alemany, M. (1981). Glutamine synthetase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats. *Horm Metab Res*, 4, 199-202.
- Atherton, W.D. & Aitken, A. (1970). Growth, nitrogen metabolism and fat metabolism in *Salmo gairdneri*, rich. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 36: 719-747.
- Auerswald, L., Jurss, K., Schiedek, D. & Bastrop, R. (1997). The influence of salinity acclimatation on free amino acids and enzyme activities in the intestinal mucosa of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Comp. Biochem Physiol*, 116A, 149-155.

B.

- Baanante, I. V., García de Frutos, P., Bonamusa, L. & Fernández, F. (1991). Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P₂ and PFK-2. *Comp Biochem Physiol*, 100b, 11-17.
- Babeu, J.-P., Darsigny, M., Lussier, C. R. & Boudreau, F. o. (2009). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297, G124-G134.
- Ballantyne, J. (2001). Amino acid metabolism. In Fish Physiology, Vol. 20, Nitrogen Excretion (Wright PA, Anderson PM eds) *New York Academic Press*, 77-107.
- Baños, N., Baró, J., Castejón, C., Navarro, I. & Gutiérrez, J. (1998). Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regul. Pept.*, 77, 55-62.
- Barrero, M. J. & Malik, S. (2006). Two Functional Modes of a Nuclear Receptor-Recruited Arginine Methyltransferase in Transcriptional Activation. *Molecular Cell*, 24, 233-243.
- Bartoov-Shifman, R., Hertz, R., Wang, H., Wollheim, C. B., Bar-Tana, J. & Walker, M. D. (2002). Activation of the Insulin Gene Promoter through a Direct Effect of Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 25914-25919.
- Battle, M. A., Konopka, G., Parviz, F., Gaggl, A. L., Yang, C., Sladek, F. M. & Duncan, S. A. (2006). Hepatocyte nuclear factor alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 8419-8424.
- Bauer, M., Hamm, A. C., Bonaus, M., Jacob, A., Jaekel, J., Schorle, H., Pankratz, M. J. & Katzenberger, J. D. (2004). Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span-prolonging processes. *Physiological Genomics*, 17, 230-244.
- Baum, J. I., O'Connor, J. C., Seyler, J. E., Anthony, T. G., Freund, G. G. & Layman, D. K. (2005). Leucine reduces the duration of insulin-induced PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 288, E86-E91.
- Beamish, F.W.H. & Thomas, E. (1984). Effects of dietary protein and lipid on nitrogen losses in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 41: 359-371.
- Beaton, G.H., Curry, D.M. & Veen, M.J. (1957). Alanine-glutamic transaminase activity and protein metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 70: 288-290.
- Begum, N. & Datta, A. (1991). Effect of glucagon and some other alpha and beta adrenergic agonists and antagonists on alanine amino transferase of perfused rat liver. *Mol Cell Biochem*, 105, 7-13.
- Begum, N. & Datta, A. (1992). Effect of adrenergic agonists and antagonists on alanine amino transferase, fructose-1:6-bisphosphatase and glucose production in hepatocytes. *Mol Cell Biochem*, 113, 93-103.
- Begum, T., Oliver, M. R., Kornberg, A. J. & Dennett, X. (2000). Elevated aminotransferase as a presenting finding in a patient with occult muscle disease. *J Paediatr Child Health*, 36, 189-190.
- Beranek, M., Drsata, J. & Palicka, V. (2001). Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. *Mol Cell Biochem*, 218, 35-39.
- Bergot, F. (1979). Carbohydrate in rainbow trout diets: effects of the level and source of carbohydrates and the number of meals on growth and body composition. *Aquaculture*, 18, 157-167.
- Bergot, F. & Breque, J. (1983). Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and the intake levels. *Aquaculture*, 34, 203-212.
- Bever, K., Chenoweth, M. & Dunn, A. (1981). Amino acid gluconeogenesis and glucose turnover in kelp bass (*Paralabrax sp.*). *Am J Physiol*, 240, R246-252.
- Bogan, A. A., Dallas-Yang, Q., Ruse, M. D., Maeda, Y., Jiang, G., Nepomuceno, L., Scanlan, T. S., Cohen, F. E. & Sladek, F. M. (2000). Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4 α . *Journal of Molecular Biology*, 302, 831-851.
- Bonamusa, L., García de Frutos, P., Fernández, F. & Baanante, I. V. (1992). Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1, 113-125.
- Bondini, S., Kallman, J., Wheeler, A., Prakash, S., Gramlich, T., Jondle, D. M. & Younossi, Z. M. (2007). Impact of non-alcoholic fatty liver disease on chronic hepatitis B. *Liver Int*, 27, 607-611.
- Botini, F. F., Suzuki-Kemmelmeier, F., Nascimento, É. A., Ide, L. T. & Bracht, A. (2005). Zonation of alanine metabolism in the bivascularly perfused rat liver. *Liver International*, 25, 861-871.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Brenden, R. A. & Huizinga, H. W. (1986). Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 9, 163-167.
- Brown, A. J. & Voelker, R. A. (1980). Genetic and biochemical studies on glutamate-pyruvate transaminase from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 18, 303-309.
- Brown, J.R. & Cameron, J.N. (1991). The induction of specific dynamic action in channel catfish by infusion of essential amino acids. *Physiol Zool*, 64: 276.
- Bucking, C. & Wood, C.M. (2008). The alkaline tide and ammonia excretion after voluntary feeding in freshwater rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 211: 2533-2541.
- Bundy, J. G., Iyer, N. G., Gentile, M. S., Hu, D.-E., Kettunen, M., Maia, A.-T., Thorne, N. P., Brenton, J. D., Caldas, C. & Brindle, K. M. (2006). Metabolic Consequences of p300 Gene Deletion in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research*, 66, 7606-7614.
- Burant, C. F., Sivitz, W. I., Fukumoto, H., Kayano, T., Nagamatsu, S., Seino, S., Pessin, J. E. & Bell, G. I. (1991). Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 47, 349-387.
- Burke, S. J., Collier, J. J. & Scott, D. K. (2009). cAMP opposes the glucose-mediated induction of the L-PK gene by preventing the recruitment of a complex containing ChREBP, HNF4C ϵ , and CBP. *The FASEB Journal*, 23, 2855-2865.

C.

- Caballero, M.J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F.J., Izquierdo, M.S. & Fernández, A.J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179: 277-290.
- Campbell, J. W. & Vorhaben, J. E. (1983). Mitochondrial ammoniogenesis in liver of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Am. J. Physiol.*, 244, R709-R717.
- Capilla, E., Díaz, M., Gutiérrez, J. & Planas, J. V. (2002). Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 283, E44-E49.
- Capilla, E., Medale, F., Navarro, I., Panserat, S., Vachot, C., Kaushik, S. & Gutierrez, J. (2003). Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul Pept*, 110, 123-132.
- Capilla, E., Díaz, M., Albalat, A., Navarro, I., Pessin, J. E., Keller, K. & Planas, J. V. (2004). Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287, E348-357.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. & Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 21, 2933-2942.
- Carvalho, C.V.A., Bianchini, A., Tesser, M.B. & Sampaio, L.A. (2009). The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquaculture Research*: 1-8.
- Caseras, A., Metón, I., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2000). Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim Biophys Acta*, 1493, 135-141.
- Caseras, A., Metón, I., Vives, C., Egea, M., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2002). Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr*, 88, 607-614.
- Cattin, A.-L., Le Beyec, J., Barreau, F., Saint-Just, S., Houllier, A., Gonzalez, F.J., Robine, S., Pincon-Raymond, M., Cardot, P., Lacasa, M. & Ribeiro, A. (2009). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α , a Key Factor for Homeostasis, Cell Architecture, and Barrier Function of the Adult Intestinal Epithelium. *Mol Cell Biol*, 29: 6294-6308.
- Chabardès-Garonne, D., Méjean, A., Aude, J.-C., Cheval, L., Di Stefano, A., Gaillard, M.-C., Imbert-Teboul, M., Wittner, M., Balian, C., Anthouard, V., Robert, C., Ségurens, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Doucet, A. & Elalouf, J.-M. (2003). A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 13710-13715.
- Chamberlin, M.E., Glemet, H.C. & Ballantyne, J.S. (1991). Glutamine metabolism in a holostean (*Amia calva*) and teleost fish (*Salvelinus namaycush*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 260: R159-R166.
- Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F. & Darnell, J. E. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell

- death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes & Development*, *8*, 2466-2477.
- Chiba, H., Itoh, T., Satohisa, S., Sakai, N., Noguchi, H., Osanai, M., Kojima, T. & Sawada, N. (2005). Activation of p21CIP1/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor-4 α . *Experimental Cell Research*, *302*, 11-21.
- Christ, B., Nath, A., Bastian, H. & Jungermann, K. (1988). Regulation of the expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes by glucagon and insulin. *European Journal of Biochemistry*, *178*, 373-379.
- Christiansen, D.C. & Klungsoyr, L. (1987). Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp Biochem Physiol*, *B88*: 701-711.
- Conway, J. G., Kauffman, F. C., Tsukada, T. & Thurman, R. G. (1984). Glucuronidation of 7-hydroxycoumarin in periportal and pericentral regions of the liver lobule. *Molecular Pharmacology*, *25*, 487-493.
- Costet, P., Legendre, C., Moré, J., Edgar, A., Galtier, P. & Pineau, T. (1998). Peroxisome Proliferator-activated Receptor α -Isoform Deficiency Leads to Progressive Dyslipidemia with Sexually Dimorphic Obesity and Steatosis. *Journal of Biological Chemistry*, *273*, 29577-29585.
- Couto, A., Enes, P., Peres, H. & Oliva-Teles, A. (2008). Effect of water temperature and dietary starch on growth and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *151*: 45-50.
- Cowey, C. B., Knox, D., Walton, M. J. & Adron, J. W. (1977). The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr*, *38*, 463-470.
- Cowey, C. B. & Walton, M. J. (1989). Intermediary metabolism. *Fish Nutrition ed. J.E. Halver*, 259-329.
- D.**
- Dabrowska, H. & Wlasow, T. (1986). Sublethal effect of ammonia on certain biochemical and haematological indicators on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp Biochem Physiol*, *83C*: 179-184.
- Danulat, E. & Kempe, S. (1992). Nitrogenous waste excretion and accumulation of urea and ammonia in *Chalcalburnus tarichi* (*Cyprinidae*) endemic to the extremely alkaline Lake Van (Eastern Turkey). *Fish Physiol Biochem*, *9*: 377-386.
- Darsigny, M., Babeu, J.-P., Dupuis, A. e.-A., Furth, E. E., Seidman, E. G., L^v©vy, â., Verdu, E. F., Gendron, F.-P. & Boudreau, F. o. (2009). Loss of Hepatocyte-Nuclear-Factor-4 alpha Affects Colonic Ion Transport and Causes Chronic Inflammation Resembling Inflammatory Bowel Disease in Mice. *PLoS ONE*, *4*, e7609.
- Dave, G., Johansson-Sjoberg, M. L., Larsson, A., Lewander, K. & Lidman, U. (1975). Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, *52*, 423-430.
- De Luis, D. A., Aller, R., Izaola, O., Sagrado, M. G., Conde, R. & Bellido, D. (2008). Influence of insulin resistance and adipocytokines on elevated serum alanine aminotransferase in obese patients. *Arch Med Res*, *39*, 110-114.
- DeRosa, G. & Swick, R. W. (1975). Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem*, *250*, 7961-7967.
- DeRosa, G., Burk, T. & Swick, R. (1979). Isolation and characterization of mitochondrial alanine aminotransferase from porcine tissue. *Biochem Biophys Acta*, *567*, 116-124.
- Deryckere, F., McNair, A. & Gannon, F. (1996). Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) binding sites in the salmon HNF1 promoter. *Gene*, *175*, 35-41.
- Dhami, M. S., Drangova, R., Farkas, R., Balazs, T. & Feuer, G. (1979). Decreased aminotransferase activity of serum and various tissues in the rat after cefazolin treatment. *Clin Chem*, *25*, 1263-1266.
- Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y.-I. & Shoelson, S. E. (2002). Crystal Structure of the HNF4 alpha Ligand Binding Domain in Complex with Endogenous Fatty Acid Ligand. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 37973-37976.
- Díaz, M., Antonescu, C. N., Capilla, E., Klip, A. & Planas, J. V. (2007). Fish glucose transporter (GLUT)-4 differs from rat GLUT4 in its traffic characteristics but can translocate to the cell surface in response to insulin in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, *148*, 5248-5257.
- Dieterle, P., Brawand, F., Moser, U. K. & Walter, P. (1978). Alanine metabolism in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem*, *88*, 467-473.

- Dietrich, C. G., Martin, I. V., Porn, A. C., Voigt, S., Gartung, C., Trautwein, C. & Geier, A. (2007). Fasting induces basolateral uptake transporters of the SLC family in the liver via HNF4 alpha and PGC1 alpha. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293, G585-G590.
- Draper, R. P., Waterfield, C. J., York, M. J. & Timbrell, J. A. (1994). Studies on the muscle toxicant 2,3,5,6-tetramethyl p-phenylenediamine: effects on various biomarkers including urinary creatine and taurine. *Arch Toxicol*, 69, 111-117.
- Drakenberg, K., Sara, V. R., Falkmer, S., Gammeltoft, S., Maake, C. & Reinecke, M. (1993). Identification of IGF-1 receptors in primitive vertebrates. *Regul Pept*, 43, 73-81.
- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B. & Ryffel, G. U. (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 925-931.
- Duda, K., Chi, Y.-I. & Shoelson, S. E. (2004). Structural Basis for HNF-4 alpha Activation by Ligand and Coactivator Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 23311-23316.
- Dufour, D. R., Lott, J. A., Nolte, F. S., Gretch, D. R., Koff, R. S. & Seeff, L. B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem*, 46, 2027-2049.

E.

- Beckhoute, J., Moerman, E., Bouckenoghe, T., Lukowiak, B., Pattou, F., Formstecher, P., Kerr-Conte, J., Vandewalle, B. & Laine, B. (2003a). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Isoforms Originated from the P1 Promoter Are Expressed in Human Pancreatic β -Cells and Exhibit Stronger Transcriptional Potentials than P2 Promoter-Driven Isoforms. *Endocrinology*, 144, 1686-1694.
- Egea, M., Metón, I. & Baanante, I. V. (2007). Sp1 and Sp3 regulate glucokinase gene transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Mol Endocrinol.*, 38(4), 481-92.
- Egea, M., Metón, I., Córdoba, M., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2008). Role of Sp1 and SREBP-1a in the insulin-mediated regulation of glucokinase transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol*, 155(2), 359-367.
- Ellard, S. & Colclough, K. (2006). Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Human Mutation*, 27, 854-869.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S. & Oliva-Teles, A. (2006). Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 143A, 89-96.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S. & Oliva-Teles, A. (2009). Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism. *Fish Physiol Biochem*, 35: 519-539.
- Enes, P., Peres, H., Couto, A. & Oliva-Teles, A. (2010). Growth performance and metabolic utilization of diets including starch, dextrin, maltose or glucose as carbohydrate source by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 903-910.
- Enes, P., Peres, H., Sanchez-Gurmaches, J., Navarro, I., Gutiérrez, J. & Oliva-Teles, A. (2011). Insulin and IGF-I response to a glucose load in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 315: 321-326.
- Erdmann, S., Senkel, S., Arndt, T., Lucas, B. n., Lausen, J. r., Klein-Hitpass, L., Ryffel, G. U. & Thomas, H. (2007). Tissue-specific transcription factor HNF4 alpha inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 β -cell line. *Biological Chemistry*, 388, 91-106.
- Essex-Fraser, P.A., Steele, S.L., Bernier, N.J., Murray, B.W., Stevens, E.D. & Wright, P.A. (2005). Expression of Four Glutamine Synthetase Genes in the Early Stages of Development of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Relationship to Nitrogen Excretion. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 20268-20273.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. & Choe, K.P. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, 85: 97-177.

F.

- Fafournoux, P., Rémésy, C. & Demigné, C. (1983). Control of alanine metabolism in rat liver by transport processes or cellular metabolism. *Biochem J*, 210, 645-652.
- FAO (2010). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Roma
- Felig, P. (1973). The glucose-alanine cycle. *Metabolism*, 22, 179-207.

- Fernandes, A. A. H., Novelli, E. L. B., Okoshi, K., Okoshi, M. P., Muzio, B. P. D., Guimar, J. F. C. & Junior, A. F. (2010). Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64, 214-219.
- Fernández, F., Miquel, A. G., L.R. C., Guinea, J. & Ros, E. (1996). comparisons of faecal collection methods for digestibility determinations in gilthead sea bream. *J Fish Biol*, 49, 735-738.
- Fernández, F., Miquel, A. G., L.R. C. & Guinea, J. (1998). Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effect of diet composition and ration size. *Aquaculture*, 166, 67-84.
- Fernández, F., Miquel, A. G., Córdoba, M., Varas, M., Meton, I., Caseras, A. & Baanante, I. V. (2007). Effects of diets with distinct protein to carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. *J Exp Mar Biol Ecol*, 343, 1-10.
- Fideu, M. D., Soler, G. & Ruiz-Amil, M. (1983). Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp Biochem Physiol B*, 74, 795-799.
- Floyd Jr, J. C., Fajans, S. S., Conn, J. W., Knopf, R. F. & Rull, J. (1966). Stimulation of insulin secretion by amino acids. *Journal of Clinical Investigation*, 45, 1487-1502.
- French, C. J., Mommsen, T. P. & Hochachka, P. W. (1981). Amino acid utilization in isolated hepatocytes from rainbow trout. *Eur. J. Biochem.*, 113, 311-317.
- French, C. J., Hochachka, P. W. & Mommsen, T. P. (1983). Metabolic organization in liver during spawning migration of sockeye salmon. *Am. J. Physiol.*, 245, R827-R830.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Procl. Natl. Acad. Sci.* 23, 8998-9002.
- Fung, T. T., Schulze, M., Manson, J. E., Willett, W. C. & Hu, F. B. (2004). Dietary Patterns, Meat Intake, and the Risk of Type 2 Diabetes in Women. *Arch Intern Med*, 164, 2235-2240.
- Furuichi, M. & Yone, Y. (1980). effect of dietary dextrin levels on the growth and feed efficiency, the chemical composition of liver and dorsal muscle, and the absorption of dietary protein and dextrin in fishes. *Bull jpn Soc Sci fish*, 46, 255-229.
- Furuichi, M. & Yone, Y. (1981). Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. *Bull jpn Soc Sci fish*, 761-764.
- Furuta, H., Iwasaki, N., Oda, N., Hinokio, Y., Horikawa, Y., Yamagata, K., Yano, N., Sugahiro, J., Ogata, M., Ohgawara, H., Omori, Y., Iwamoto, Y. & Bell, G. I. (1997). Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes*, 46(10), 1652-7.
- Fynn-Aikins, F., Hughes, S. & Vanderberg, G. (1995). Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comp Biochem Physiol*, 111A, 163-170.
- G.**
- García-Campusano, F., Anaya, V. H., Robledo-Arratia, L., Quezada, H., Hernández, H., Riego, L. & González, A. (2009). ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.*, 55, 368-374.
- García de Frutos, P., Bonamusa, L., Fernández, F. & Baanante, I. V. (1990). Fructose 2,6-bisphosphate in liver of *Sparus aurata*: influence of nutritional state. *Comp Biochem Physiol B*, 96, 63-65.
- García de Frutos, P., Bonamusa, L., Fernández, F. & Baanante, I. V. (1991). Metabolic changes in fish during the starved-to-fed transition. *Comp Biochem Physiol*, B98, 329-331.
- Gat-Yablonski, G., Shalitin, S & Phillip, M. (2006). Maturity onset diabetes of the young-review. *Pediatr. Endocrinol. Rev.*, 3, 514-20.
- Gautier-Stein, A., Mithieux, G. & Rajas, F. (2005). A Distal Region Involving Hepatocyte Nuclear Factor 4 α and CAAT/Enhancer Binding Protein Markedly Potentiates the Protein Kinase A Stimulation of the Glucose-6-Phosphatase Promoter. *Mol Endocrinol*, 19, 163-174.
- Gavosto, F., Pileri, A. & Brusca, A. (1957). Increased transaminase activity in the liver after administration of cortisone. *Biochim Biophys Acta*, 24, 250-254.
- Georgopoulos, G. B. & Conides, A. J. (1999). Study on the effects of dietary starch on growth, food conversion and digestibility of adult gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac Trop*, 14, 143-152.
- Giordano, A. & Avantaggiati, M.L. (1999). p300 and CBP: Partners for life and death. *Journal of Cellular Physiology*, 181: 218-230.

- Glinghammar, B., Rafter, I., Lindstrom, A. K., Hedberg, J. J., Andersson, H. B., Lindblom, P., Berg, A. L. & Cotgreave, I. (2009). Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med*, *23*, 621-631.
- Gómez-Milan, E., Cardenete, G. & Sánchez-Muros, M. J. (2007). Annual variations in the specific activity of fructose 1,6-bisphosphatase, alanine aminotransferase and pyruvate kinase in the *Sparus aurata* liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, *147*, 49-55.
- González, F. J. (2008). Regulation of hepatocyte nuclear factor 4a-mediated transcription. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *23*, 2-7.
- González, J. D., Caballero, A., Viegas, V., Metón, I., Jones, J. G., Barra, J., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2011). Effects of alanine aminotransferase inhibition on the intermediary metabolism in *Sparus aurata* through dietary amino-oxyacetate supplementation. *British Journal of Nutrition*, DOI: 10.1017/S000711451100496X.
- Goodman, R.H. & Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes & Development*, *14*: 1553-1577.
- Gourdon, L., Lou, D.Q., Raymondjean, M., Vasseur-Cognet, M. & Kahn, A. (1999). Negative cyclic AMP response elements in the promoter of the L-type pyruvate kinase gene. *FEBS Letters*, *459*: 9-14.
- Gragnoles, C., Lindler, T., Cockburn, B. N., Kaisaki, P. J., Gragnoli, F., Marozzi, G. & Beli, G. I. (1997). Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes*, *46*, 1648-1651.
- Graham, F. L., Van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, *52*, 456-467.
- Gray, S., Wang, B., Orihuela, Y., Hong, E. G., Fisch, S., Haldar, S., Cline, G. W., Kim, J. K., Peroni, O. D., Kahn, B. B. & Jain, M. K. (2007). Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. *Cell Metab*, *5*, 305-312.
- Green, V. J., Kokkotou, E. & Ladas, J. A. A. (1998). Critical Structural Elements and Multitarget Protein Interactions of the Transcriptional Activator AF-1 of Hepatocyte Nuclear Factor 4. *Journal of Biological Chemistry*, *273*, 29950-29957.
- Gregori, C., Porteu, A., Mitchell, C., Kahn, A. & Pichard, A.-L. (2002). In Vivo Functional Characterization of the Aldolase B Gene Enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 28618-28623.
- Grewal, J. S., Tsai, J. Y. & Khan, S. R. (2005). Oxalate-inducible AMBP gene and its regulatory mechanism in renal tubular epithelial cells. *Biochem. J.*, *387*, 609-616.
- Grigo, K., Wirsing, A., Lucas, B., Klein-Hitpass, L. & Ryffel, G. U. (2008). HNF4A orchestrates a set of 14 genes to down-regulate cell proliferation in kidney cells. *Biological Chemistry*, *389*, 179-187.
- Groen, A. K., Sips, H. J., Vervoorn, R. C. & Tager, J. M. (1982). Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *Eur J Biochem*, *122*, 87-93.
- Gual, P., Grémeaux, T., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y. & Tanti, J. F. (2003). MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia*, *46*, 1532-1542.
- Guerin-Ancey, O. (1976). Étude expérimentale de l'excretion azotée du bar (*Dicentrachus labrax*) en cours de croissance. II. Effets du jeune sur l'excretion d'ammoniac et d'urée. *Aquaculture*, *9*: 187.
- Guo, H., Gao, C., Mi, Z., Wai, P. Y. & Kuo, P. C. (2006). *Phosphorylation of Ser158 regulates inflammatory redox-dependent hepatocyte nuclear factor-4alpha transcriptional activity*, (Editor ed.).
- Gutiérrez, J. & Plisetskaya, E. M. (1991). Insulin binding to liver plasma membranes of coho salmon during smoltification. *Gen Comp Endocrinol*, *82*, 466-475.
- Gutiérrez, J., Asgard, T., Fabbri, E. & Plisetskaya, E.M. (1991). Insulin receptor binding in skeletal muscle of trout. *Fish Physiol Biochem*, *9*: 351-360.
- Gutiérrez, J., Párrizas, M., Carneiro, N., Maestro, M. & Plana, J. L. (1993). Insulin and IGF-I receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries: changes with reproductive cycle. *Fish Physiol Biochem*, *11*.
- H.**
- Hall, J. R., MacCormack, T. J., Barry, C. A. & Driedzic, W. R. (2004). Sequence and expression of a constitutive, facilitated glucose transporter (GLUT1) in Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Exp Biol*, *207*, 4697-4706.
- Hall, J. R., Richards, R. C., MacCormack, T. J., Ewart, K. V. & Driedzic, W. R. (2005). Cloning of GLUT3 cDNA from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and expression of GLUT1 and GLUT3 in response to hypoxia. *Biochim Biophys Acta*, *1730*, 245-252.

- Hall, J. R., Short, C. E. & Driedzic, W. R. (2006). Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: Developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *J Exp Biol*, 209, 4490-4502.
- Harries, L. W., Locke, J. M., Shields, B., Hanley, N. A., Hanley, K. P., Steele, A., Nilstad, P. I. R., Ellard, S. & Hattersley, A. T. (2008). The Diabetic Phenotype in HNF4A Mutation Carriers Is Moderated By the Expression of HNF4A Isoforms From the P1 Promoter During Fetal Development. *Diabetes*, 57, 1745-1752.
- Hasan, S., Stucki, M., Hassa, P. O., Imhof, R., Gehrig, P., Hunziker, P., Hibscher, U. & Hottiger, M. O. (2001). Regulation of Human Flap Endonuclease-1 Activity by Acetylation through the Transcriptional Coactivator p300. *Molecular Cell*, 7, 1221-1231.
- Hayashi, Y. S. (1993). Alanine aminotransferase from gill tissue of the brackish-water bivalve *Corbicula japonica* (Prime): Subcellular localization and some enzymatic properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 170, 45-54.
- Hayhurst, G. P., Lee, Y.-H., Lambert, G., Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. (2001). Hepatocyte Nuclear Factor 4{alpha} (Nuclear Receptor 2A1) Is Essential for Maintenance of Hepatic Gene Expression and Lipid Homeostasis. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 1393-1403.
- Hemre, G. I., Lie, O., Lambertsem, G. & Sundaby, A. (1990). Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*). Hormonal response of insulin, glucagon, and glucagon-like peptide to diet and starvation. *Comp Biochem Physiol*, 97A, 41-44.
- Hemre, G. I., Mommsen, T. P. & Krogdahl, A. (2001). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *aquaculture Nutrition*, 7, 1-20.
- Hertz, L. & Schousboe, A. (1988). Metabolism of glutamate and glutamine in neurons and astrocytes in primary cultures. In: *Kvamme, E (Ed), Glutamate and Glutamine in Mammals CRC Press, Boca Raton: 39-56.*
- Hertz, R., Magenheimer, J., Berman, I. & Bar-Tana, J. (1997). Fatty acyl-coA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α . *Nature*, 392, 512-516.
- Hertz, R., Ben-Haim, N., Petrescu, A. D., Kalderon, B., Berman, I., Eldad, N., Schroeder, F. & Bar-Tana, J. (2003). Rescue of MODY-1 by Agonist Ligands of Hepatocyte Nuclear Factor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 278, 22578-22585.
- Hickling, D. R. & March, B. E. (1982). A comparative study of trout and chicks regarding dietary effects on glycogen concentration in liver and muscle during feeding and subsequent to feed withdrawal. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 72, 115-123.
- Hirota, K., Sakamaki, J.-i., Ishida, J., Shimamoto, Y., Nishihara, S., Kodama, N., Ohta, K., Yamamoto, M., Tanimoto, K. & 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. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 32432-32441.
- Holewa, B., Pogge v. Strandmann, E., Zapp, D., Lorenz, P. & Ryffel, G. U. (1996). Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 α (LFB1). *Mechanisms of Development*, 54, 45-57.
- Holewa, B., Zapp, D., Drewes, T., Senkel, S. & Ryffel, G. U. (1997). HNF4 β , a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 687-694.
- Honey, R. N., Schwarz, J. A., Mathe, C. J. & Weir, G. C. (1980). Insulin, glucagon, and somatostatin secretion from isolated perfused rat and chicken pancreas-duodenum. *Am. J. Physiol.*, 238.
- Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W. & Leff, T. (2003). AMP-activated Protein Kinase Regulates HNF4 α Transcriptional Activity by Inhibiting Dimer Formation and Decreasing Protein Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 27495-27501.
- Hopper, S. & Segal, H. L. (1964). Comparative properties of glutamic-alanine transaminase from several sources. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 105.
- Houlihan, D.F., Carter, C.G. and McCarthy, I.D. (1995). Protein synthesis in fish. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 4, chapter 8. pp. 191–220. Edited by Hochachka and Mommsen. Elsevier Science B.V.
- Howell, J. J. & Manning, B. D. (2011). mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends in Endocrinology Metabolism*, 22, 94-102.
- Huang, J., Levitsky, L. L. & Rhoads, D. B. (2009). Novel P2 promoter-derived HNF4 α isoforms with different N-terminus generated by alternate exon insertion. *Exp. Cell. Res.*, 315, 1200-1211.

- Hwang, H., Kim, S., Baek, Y., Lee, S., Hwang, H., Kumar, S., Rahman & M., Yun, J. (2008). Differential expression of liver proteins in streptozotocin-induced diabetic rats in response to hypoglycemic mushroom polysaccharides. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25, 308-322.
- Hwang, H., Kim, S., Baek, Y., Lee, S., Hwang, H. & Yun, J. (2009). Gene expression profiling in streptozotocin-induced diabetic rat liver in response to fungal polysaccharide treatment. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26, 115-126.

I.

- Iacobellis, G., Moschetta, A., Buzzetti, R., Ribauda, M. C., Baroni, M. G. & Leonetti, F. (2007). Aminotransferase activity in morbid and uncomplicated obesity: Predictive role of fasting insulin. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17, 442-447.
- Ince, B. W. & Thorpe, A. (1974). Effects of insulin and of metabolite loading on blood metabolites in the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 23, 460-471.
- Ince, B. W. & Thorpe, A. (1977). Glucose and amino acids-stimulated insulin release in vivo in the European silver eel. *Gen Comp Endocrinol*, 31, 249-256.
- Ince, B. W. & Thorpe, A. (1978). The effects of insulin on plasma amino acid levels in the Northern pike, *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.*, 12, 503-506.
- Inoue, Y., Hayhurst, G. P., Inoue, J., Mori, M. & González, F. J. (2002). Defective Ureagenesis in Mice Carrying a Liver-specific Disruption of Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha (HNF4 alpha). *Journal of Biological Chemistry*, 277, 25257-25265.
- Inui, Y., Arai, S. & Yokote, M. (1975). Gluconeogenesis in the eel. VI. Effects of hepatectomy, alloxan, and mammalian insulin on the behavior of plasma amino acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 41.
- Iordanidou, P., Aggelidou, E., Demetriades, C. & Hadzopoulou-Cladaras, M. (2005). Distinct Amino Acid Residues May Be Involved in Coactivator and Ligand Interactions in Hepatocyte Nuclear Factor-4 alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 21810-21819.
- Ip, Y.K., Chew, S.F. & Randall, D.J. (2001). Ammonia toxicity, tolerance and excretion. In *Fish Physiology*, vol 20, Nitrogen Excretion (ed W S Hoar, D J Randall and A P Farrell) San Diego: Academic Press: 109-148.
- Ip, Y.K., Lim, C.K., Lee, S.L.M., Wong, W.P. & Chew, S.F. (2004). Postprandial increases in nitrogenous excretion and urea synthesis in the giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri*. *Journal of Experimental Biology*, 207: 3015-3023.
- Ip, Y.K., Leong, M.W.F., Sim, M.Y., Goh, G.S., Wong, W.P. & Chew, S.F. (2005). Chronic and acute ammonia toxicity in mudskippers, *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*: brain ammonia and glutamine contents, and effects of methionine sulfoximine and MK801. *Journal of Experimental Biology*, 208: 1993-2004.
- Ishiguro, M., Suzuki, M., Takio, K., Matsuzawa, T. & Titani, K. (1991). Complete amino acid sequence of rat liver cytosolic alanine aminotransferase. *Biochemistry*, 30, 6048-6053.
- Ishikawa, F., Nose, K. & Shibamura, M. (2008). Downregulation of hepatocyte nuclear factor-4 α and its role in regulation of gene expression by TGF- β in mammary epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 314, 2131-2140.
- Iwata, K., Kajimura, M. & Sakamoto, T. (2000). Functional ureogenesis in the gobiid fish *Mugilogobius abei*. *Journal of Experimental Biology*, 203: 3703-3715.

J.

- Jadhao, S. B., Yang, R. Z., Lin, Q., Hu, H., Anania, F. A., Shuldiner, A. R. & Gong, D. W. (2004). Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology*, 39, 1297-1302.
- Jansonius, J. N., Eichele, G., Ford, G. C., Kirsch, J. F., Picot, D., Thaller, C., Vincent, M. G., Gehring, H. & Christen, P. (1984). Three-dimensional structure of mitochondrial aspartate aminotransferase and some functional derivatives: implications for its mode of action. *Biochem. Soc. Trans.*, 12, 424-427.
- Jeoung, K., Takeuchi, T. & Watabe, T. (1991). Improvement of nutritional quality of carbohydrates ingredients by extrusion process in diets of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1543-1549.
- Jiang, G., Nepomuceno, L., Yang, Q. & Sladek, F. M. (1997). Serine/Threonine Phosphorylation of Orphan Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 340, 1-9.
- Jiang, S., Tanaka, T., Iwanari, H., Hotta, H., Yamashita, H., Kumakura, J., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T. & Naito, M. (2003). Expression and localization of P1

- promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4alpha) isoforms in human and rats. *Nuclear Receptor*, 1, 5.
- Jing, X. & Zhang, S. (2010). An ancient molecule with novel function: Alanine aminotransferase as a lipopolysaccharide binding protein with bacteriocidal activity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35, 94-104.
- Johannsen, D. L. & Ravussin, E. (2009). The role of mitochondria in health and disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 780-786.
- Jow, L.Y., Chew, S.F., Lim, C.B., Anderson, P.M. & Ip, Y.K. (1999). The marble goby *Oxyeleotris marmoratus* activates hepatic glutamine synthetase and detoxifies ammonia to glutamine during air exposure. *Journal of Experimental Biology*, 202: 237-245.
- Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W. & Renold, A. E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigation*, 48, 2129-2139.
- Jürss, K. (1979). Effects of temperature, salinity, and feeding on aminotransferase activity in the liver and white muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 64(2), 213-8.
- Jürss, K. (1981). Influence of temperature and ratio of lipid to protein in diets on aminotransferase activity in the liver and white muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 527-533.
- Jürss, K., Bittorf, T. & Vökler, T. (1985). Influence of salinity and ratio of lipid to protein in diets on certain enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 81(1), 73-9.
- Jürss, K. & Bastrop, R. (1995). Amino acid metabolism in fish. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Editors Hochachka K and Mommsen TP. 4, Elsevier, Amsterdam, 159-189.
- K.**
- Kaletha, K., Thebault, M. & Raffin, J.P. (1991). Comparative studies on heart and skeletal muscle AMP-deaminase from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 99: 751-754.
- Karlsson, A., Eliason, E.J., Mydland, L.T., Farrell, A.P. & Kiessling, A. (2006). Postprandial changes in plasma free amino acid levels obtained simultaneously from the hepatic portal vein and the dorsal aorta in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 209: 4885-4894.
- Karmen, A. (1955). A note on the spectrometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*, 34, 131-133.
- Katanuma, N., Mikumo, K., Matsuda, M. & Okada, M. (1962). Differences between the transaminases in mitochondria and soluble fraction. I. Glutamic-pyruvic transaminase. *J. Vitaminol.*, 8, 68-73.
- Kaushik, S.J. & De Oliva Teles, A. (1985). Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture*, 50: 89-101.
- Kaushik, S.J. & Médale, F. (1994). Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture*, 124: 81-97.
- Kenyon, A. J. (1967). The role of the liver in the maintenance of plasma proteins and amino acids in the eel, *Anguilla anguilla* L., with reference to amino acid deamination. *Comp Biochem Physiol*, 22, 169-175.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., González, F.J., Desvergne, B. A. & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 1489-1498.
- Kersten, S., Desvergne, B. & Wahli, W. (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405, 421-4.
- Khamzina, L., Veilleux, A., Bergeron, S. b. & Marette, A. (2005). Increased Activation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Liver and Skeletal Muscle of Obese Rats: Possible Involvement in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Endocrinology*, 146, 1473-1481.
- Kim, S. K. & Kim, Y. C. (2002). Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 545-549.
- Kim, R., Kim, D.-W., Choi, S.-H., Chae, S.-H., Nam, S.-H., Kim, D.-W., Kim, A., Kang, A., Park, K.-H., Lee, Y., Hirai, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Hashimoto, K., Kim, D.-S. & Park, H.-S. (2011). Major chimpanzee-specific structural changes in sperm development-associated genes. *Functional & Integrative Genomics*, 11, 507-517.
- Kimura, A., Nishiyori, A., Murakami, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Osumi, T., Okamura, R., Mori, M. & Takiguchi, M. (1993). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner

- antagonistic to hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4). *Journal of Biological Chemistry*, 268, 11125-11133.
- King, P. A. & Goldstein, L. (1983). Renal ammonia excretion and production in goldfish, *Carassius auratus*, at low environmental pH. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 245, R590-R599.
- Kirchner, S., Kaushik, S. & Panserat, S. (2003). Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 134, 337-347.
- Kirchner, S., Seixas, P., Kaushik, S. & Panserat, S. (2005). Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 140, 333-340.
- Kirchner, S., Panserat, S., Lim, P. L., Kaushik, S. & Ferraris, R. P. (2008). The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. *J Comp Physiol B*, 178, 429-438.
- Klein, S. L., Strausberg, R. L., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S. W. & Richardson, P. (2002). Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Developmental Dynamics*, 225, 384-391.
- Klug, A. (1999). Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *Journal of Molecular Biology*, 293: 215-218.
- Kong, H., Edberg, D.D., Korte, J.J., Salo, W.L., Wright, P.A. & Anderson, P.M. (1998). Nitrogen excretion and expression of carbamoyl-phosphate synthetase III activity and mRNA in extrahepatic tissues of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 350: 157-168.
- Kornberg, R.D. & Lorch, Y. (1999). Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell*, 98: 285-294.
- Kozac, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299, 1-34.
- Krasnov, A., Teerijoki, H. & Molsa, H. (2001). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim Biophys Acta*, 1520, 174-178.
- Krebs, M., Krssak, M., Bernroider, E., Anderwald, C., Brehm, A., Meyerspeer, M., Nowotny, P., Roth, E., Waldhäusl, W. & Roden, M. (2002). Mechanism of Amino Acid-Induced Skeletal Muscle Insulin Resistance in Humans. *Diabetes*, 51, 599-605.
- Krebs, M. (2005). Amino acid-dependent modulation of glucose metabolism in humans. *European Journal of Clinical Investigation*, 35, 351-354.
- Ktistaki, E., Ktistakis, N. T., Papadogeorgaki, E. & Talianidis, I. (1995). Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9876-9880.
- Kumar, V., Sahu, N., Pal, A., Kumar, S., Sinha, A., Ranjan, J. & Baruah, K. (2010). Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish (*Labeo rohita*) fed gelatinized and non-gelatinized starch diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 491-499.
- L.**
- Ladias, J. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V. & Cladaras, C. (1992). Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 15849-15860.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lansard, M., Panserat, S., Plagnes Juan, E., Seillez, I. & Skiba-Cassy, S. (2010). Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids*, 39, 801-810.
- Larsson, A. & Lewander, K. (1973). Metabolic effects of starvation in the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comp Biochem Physiol*, 44A, 367-374.
- Lausen, J. R., Thomas, H., Lemm, I., Bulman, M., Borgschulze, M., Lingott, A., Hattersley, A. T. & Ryffel, G. U. (2000). Naturally occurring mutations in the human HNF4 α gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Research*, 28, 430-437.

- Lazarevich, N. L., Cheremnova, O. A., Varga, E. V., Ovchinnikov, D. A., Kudrjavitseva, E. I., Morozova, O. V., Fleishman, D. I., Engelhardt, N. V. & Duncan, S. A. (2004). Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology*, 39, 1038-1047.
- Lee, M. A., Squirrell, D. J., Leslie, D. L. & Brown, T. (2004). Homogeneous Fluorescent Chemistries. In: *Real-Time PCR; An Essential Guide*. K.J. Edwards et al., editors. Horizon Bioscience. Wymondham, p. 31-70.
- Leeds, J. S., Forman, E. M., Morley, S., Scott, A. R., Tesfaye, S. & Sanders, D. S. (2009). Abnormal liver function tests in patients with Type 1 diabetes mellitus: prevalence, clinical correlations and underlying pathologies. *Diabetic Medicine*, 26, 1235-1241.
- Legate, N. J., Bonen, A. & Moon, T. W. (2001). Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *Gen Comp Endocrinol*, 122, 48-59.
- Leklem, J. E. (1991). Vitamin B6. *Machlin LJ eds. Handbook of vitamins*. Marcel Dekker New York, 341-392.
- Lenartowicz, E. & Wojtczak, A. B. (1988). Significance of the alanine aminotransferase reaction in the formation of alpha-ketoglutarate in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 260, 309-319.
- Lenburg, M. E., Liou, L. S., Gerry, N. P., Frampton, G. M., Cohen, H. T. & Christman, M. F. (2003). Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer*, 3, 31.
- Leone, T. C., Weinheimer, C. J. & Kelly, D. P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in the cellular fasting response: The PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 7473-7478.
- Leong, J. S., Jantzen, S. G., von Schalburg, K. R., Cooper, G. A., Messmer, A. M., Liao, N. Y., Munro, S., Moore, R., Holt, R. A., Jones, S. J., Davidson, W. S. & Koop, B. F. (2010). *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics*, 11:279
- Lerner, R. L. & Porte Jr., D. (1971). Relationships between intravenous glucose loads, insulin responses and glucose disappearance rate. *J. Clin. Endocrinol.*, 33, 409-417.
- Lie-Venema, H., Hakvoort, T. B. M., Van Hemert, F. J., Lamers & W. T. (1998). Regulation of the spatiotemporal pattern of expression of the glutamine synthetase gene. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 61, 243-308.
- Like, A. A. & Rossini, A. A. (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*, 193, 415-417.
- Lim, C.K., Chew, S.F., Tay, A.S.L. & Ip, Y.K. (2004a). Effects of peritoneal injection of NH_4HCO_3 on nitrogen excretion and metabolism in the swamp eel *Monopterus albus*— increased ammonia excretion with an induction of glutamine synthetase activity. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301A: 324-333.
- Lim, C.K., Wong, W.P., Lee, S.M.L., Chew, S.F. & Ip, Y.K. (2004b). The ammonotelic African lungfish, *Protopterus dolloi*, increases the rate of urea synthesis and becomes ureotelic after feeding. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 174: 555-564.
- Lindblom, P., Rafter, I., Copley, C., Andersson, U., Hedberg, J. J., Berg, A.-L., Samuelsson, A., Hellmold, H., Cotgreave, I. & Glinghammar, B. (2007). Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum--Differential tissue expression using novel antibodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 466, 66-77.
- Linehan, W. M. & Zbar, B. (2004). Focus on kidney cancer. *Cancer Cell*, 6, 223-228.
- Linn, T., Santosa, B., Grönemeyer, D., Aygen, S., Scholz, N., Busch, M. & Bretzel, R. G. (2000). Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. *Diabetologia*, 43, 1257-1265.
- Liu, Y., Dentin, R., Chen, D., Hedrick, S., Ravnskjaer, K., Schenk, S., Milne, J., Meyers, D. J., Cole, P., Yates, J., Olefsky, J., Guarente, L. & Montminy, M. (2008). A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature*, 456, 269-73.
- Liu, R., Pan, X. & Whittington, P. F. (2009). Increased hepatic expression is a major determinant of serum alanine aminotransferase elevation in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver international*.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Louet, J.-F. o., Hayhurst, G., Gonzalez, F. J., Girard, J. & Decaux, J.-F. o. (2002). The Coactivator PGC-1 Is Involved in the Regulation of the Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Gene Expression by cAMP in Combination with HNF4 α and cAMP-response Element-binding Protein (CREB). *Journal of Biological Chemistry*, 277, 37991-38000.

- Lowenstein, J.M. & Goodman, M.N. (1978). The purine nucleotide cycle in skeletal muscle. *Federation Proceedings*, 37: 2308-2312.
- Lucas, B., Grigo, K., Erdmann, S., Lausen, J., Klein-Hitpass, L. & Ryffel, G. U. (2005). HNF4a reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 24, 6418-6431.
- Lun, L. M., Zhang, S. C. & Liang, Y. J. (2006). Alanine aminotransferase in amphioxus: Presence, localization and up-regulation after acute lipopolysaccharide exposure. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 511-515.
- Lupiáñez, J., Sánchez-Lozano, M., García-Rejón, L. & DE la Higuera, M. (1989). Long-term effect of a high-protein non carbohydrate diet on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 79, 91-101.
- Lushchak, V. & Storey, K. (1994a). Influence of exercise on the distribution of enzymes in trout white muscle and kinetic properties of AMP-deaminase from free and bound fractions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 13: 407-418.
- Lushchak, V.I. & Storey, K.B. (1994b). Effect of exercise on the properties of AMP-deaminase from trout white muscle. *International Journal of Biochemistry*, 26: 1305-1312.
- Lushchak, V.I., Smirnova, Y.D. & Storey, K.B. (1998). AMP-deaminase from sea scorpion white muscle: Properties and redistribution under hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 119: 611-618.
- Lushchak, V.I., Husak, V.V. & Storey, K.B. (2008). Regulation of AMR-deaminase activity from white muscle of common carp *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149: 362-369.

M.

- MacDonald, M., Neufeldt, N., Park, B.N., Berger, M. & Ruderman, N. (1976). Alanine metabolism and gluconeogenesis in the rat. *Am J Physiol*, 231: 619-626.
- Malecki, M. T., Yang, Y., Antonellis, A., Curtis, S., Warram, J. H. & Krolewski, A. S. (1999). Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4a gene among families with early onset Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 16, 193-200.
- Malik, S., Wallberg, A. E., Kang, Y. K. & Roeder, R. G. (2002). TRAP/SMCC/Mediator-Dependent Transcriptional Activation from DNA and Chromatin Templates by Orphan Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 5626-5637.
- Marten, N. W., Sladek, F. M. & Straus, D. S. (1996). Effect of dietary protein restriction on liver transcription factors. *Biochem. J.*, 317, 361-370.
- Massillon, D., Arinze, I. J., Xu, C. & Bone, F. (2003). Regulation of Glucose-6-phosphatase Gene Expression in Cultured Hepatocytes and H4IIE Cells by Short-chain Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 40694-40701.
- Massimi, M., Lear, S. R., Williams, D. L., Jones, A. L. & Erickson, S. K. (1999). Differential expression of apolipoprotein E messenger RNA within the rat liver lobule determined by in situ hybridization. *Hepatology*, 29, 1549-1555.
- Matsuzawa, T., Kobayashi, T., Ogawa, H. & Kasahara, M. (1997). Microheterogeneity and intrahepatic localization of human and rat liver cytosolic alanine aminotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1340, 115-122.
- Mazur, C. N., Higgs, D. A., Plisetskaya, E. M. & March, B. E. (1992). Utilization of dietary starch and glucose tolerance in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) of different strains in seawater. *Fish Physiol. Biochem.*, 10, 303-313.
- McKenna, M.C., Hopkins, I.B., Lindauer, S.L. & Bamford, P. (2006). Aspartate aminotransferase in synaptic and nonsynaptic mitochondria: Differential effect of compounds that influence transient hetero-enzyme complex (metabolon) formation. *Neurochemistry International*, 48: 629-636.
- McMillan, H. J., Gregas, M., Darras, B. T. & Kang, P. B. (2011). Serum Transaminase Levels in Boys With Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *Pediatrics*, 127, e132-136.
- McNair, A., Cereghini, S., Brand, H., Smith, T., Breillat, C. & Gannon, F. (2000). Synergistic activation of the Atlantic salmon hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 promoter by the orphan nuclear receptors HNF4 and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI). *Biochem. J.*, 352, 557-564.
- McPherson, M. J., Quirke, P. & Taylor, G. R. (1991). *PCR: A practical approach*, vol 1. Oxford University Press, Oxford.

- Melo, J., Lundstedt, L., Metón, I., Baanante, I. V. & Moraes, G. (2006). Dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of jundia (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol*, *A145*, 181-187.
- Mendes-Mourao, J., Halestrap, A. P., Crisp, D. M. & Pogson, C. I. (1975). The involvement of mitochondrial pyruvate transport in the pathways of gluconeogenesis from serine and alanine in isolated rat and mouse liver cells. *FEBS Lett*, *53*, 29-32.
- Méndez, E., Smith, A., Figueiredo-Garutti, M. L., Planas, J. V., Navarro, I. & Gutiérrez, J. (2001). Receptors for insulin-like growth factor-I (IGF-I) predominate over insulin receptors in skeletal muscle throughout the life cycle of brown trout, *Salmo trutta*. *Gen Comp Endocrinol*, *122*, 148-157.
- Metón, I., Caseras, A., Mediavilla, D., Fernández, F. & Baanante, I. V. (1999a). Molecular cloning of a cDNA encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from liver of *Sparus aurata*: nutritional regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta*, *1444*, 153-165.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Canto, E., Fernández, F. & Baanante, I. V. (1999b). Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr*, *82*, 223-232.
- Metón, I., Caseras, A., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2000). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1491*: 220-228.
- Metón, I., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2003a). Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 99-107.
- Metón, I., Egea, M. & Baanante, I. V. (2003b). New insights into the regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Recent Research Developments in Biochemistry (Pandalay SG)*.
- Metón, I., Caseras, A., Fernandez, F. & Baanante, I. (2004a). Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, *138*, 145-153.
- Metón, I., Egea, M., Fernández, F., Eraso, M. C. & Baanante, I. V. (2004b). The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Letters*, *566*, 251-254.
- Metón, I., Egea, M., Anemaet, I.G., Fernández, F. & Baanante, I. V. (2006). Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology*, *147*(7), 3446-3456.
- Mietus-Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladias, J. A., Darnell, J. E., Jr. & Karathanasis, S. K. (1992). Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Mol. Cell. Biol.*, *12*, 1708-1718.
- Milgram, S. L., MacDonald, J. K. & Noe, B. D. (1994). Perfusion of pancreatic islets. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol 3. Elsevier Science, Amsterdam, 169-178.
- Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M. & Kahn, A. (1994). Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, *269*, 8944-8951.
- Miura, A., Yamagata, K., Kakei, M., Hatakeyama, H., Takasashi, N., Fukui, K., Nammo, T., Yoneda, K., Inoue, Y., Sladek, F. M., Magnuson, M. A., Kasai, H., Miyagawa, J., Gonzalez, F. J. & Shimomura, I. (2006). Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.*, *281*, 5246-5257.
- Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismond, K. P. & Good, A. G. (2007). Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *49*, 1108-1121.
- Miyazaki, M., Rosenblum, J. S., Kasahara, Y., Nakagawa, I. & Patricelli, M. P. (2009). Determination of enzymatic source of alanine aminotransferase activity in serum from dogs with liver injury. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *60*, 307-315.
- Moller, A. M., Dalgaard, L. T., Ambye, L., Hansen, L., Schmitz, O., Hansen, T. & Pedersen, O. (1999). A Novel Phe75fsdelT Mutation in the Hepatocyte Nuclear Factor-4 α Gene in a Danish Pedigree with Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *84*, 367-369.
- Mommsen, T., French, C. & Honochachka, P. (1980). Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Can J Zool*, *58*, 1785-1799.

- Mommsen, T., Walsh, P. J. & Moon, T. W. (1985). Gluconeogenesis in hepatocytes and kidney of Atlantic salmon. *Mol Physiol*, 8, 89:100.
- Mommsen, T.P. & Hochachka, P.W. (1988). The purine nucleotide cycle as two temporally separated metabolic units: A study on trout muscle. *Metabolism*, 37: 552-556.
- Mommsen, T. P. & Plisetskaya, E. (1991). Insulin in fish and agnathans: History, structure and metabolic regulation. *Rev Aquat Sci*, 4, 225-259.
- Mommsen, T.P. & Walsh, P.J. (1992). Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 48: 583-593.
- Mommsen, T.P., Busby, E.R., Von Schalburg, K.R., Evans, J.C., Osachoff, H.L. & Elliott, M.E. (2003). Glutamine synthetase in tilapia gastrointestinal tract: zonation, cDNA and induction by cortisol. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 173: 419-427.
- Monaci, P., Nicosia, A. & Cortese, R. (1988). Two different liver-specific factors stimulate in vitro transcription from the human alpha 1-antitrypsin promoter. *EMBO J.*, 7, 2075-2087.
- Moon, T. W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 129, 243-249.
- Moraes, G. & Polez, V. L. (2004). Ureotelism is inducible in the neotropical freshwater *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae). *Braz J Biol*, 64, 265-271.
- Morata, P., Vargas, A. M., Sánchez-Medina, F., García, M., Cardenete, G. & Zamora, S. (1982). Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B*, 71, 65-70.
- Moreira, I. S., Péres, H., Couto, A., Enes, P. & Oliva-Teles, A. (2008). Temperature and dietary carbohydrate levels affects on performance and metabolic utilisation of diets in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 274, 153-160.
- Morrison, T. B., Weis, J. J. & Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 6, 954-8, 960, 962.
- Mouchard, M.-L., Bes, S., Mignon, M. & Meynial-Denis, D. (2008). Fasting up-regulates muscle glutamine synthetase while it down-regulates liver glutamine synthetase in male rats during aging. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 3, e309-e315.
- Mukorah, F., Razunguzwa, B. & Masola, B. (1998). Stabilization of Rat Liver Mitochondrial Alanine Aminotransferase with Ethanol and Trehalose. *Cryobiology*, 37, 300-308.
- Murai, T. & Ogata, H. (1990). Changes in free amino acid levels in various tissues of common carp in responses to insulin injection followed by force-feeding an amino acid diet. *J. Nutr.*, 120, 711-718.
- Murray, B.W., Busby, E.R., Mommsen, T.P. & Wright, P.A. (2003). Evolution of glutamine synthetase in vertebrates: multiple glutamine synthetase genes expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 206: 1511-1521.
- Murrow, B. A. & Hoehn, K. L. (2010). Mitochondrial regulation of insulin action. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, 1936-1939.

N.

- Nagai, M. & Ikeda, S. (1971). Carbohydrate metabolism in fish. I. Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glycogen and lipid contents in carp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 373, 404-409.
- Nagayama, F. & Ohshima, H. (1974). Studies on the enzyme system of carbohydrates metabolism in fish. Properties of liver hexokinase. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 40, 285-290.
- Nammo, T., Yamagata, K., Tanaka, T., Kodama, T., Sladek, F. M., Fukui, K., Katsube, F., Sato, Y., Miyagawa, J. & Shimomura, I. (2008). Expression of HNF-4alpha (MODY1), HNF-1beta (MODY 5), and HNF-1alpha (MODY 3) proteins in the developing mouse pancreas. *Gene Expr. Patterns*, 8, 96-106.
- Nathwani, R. A., Pais, S., Reynolds, T. B. & Kaplowitz, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41, 380-382.
- Navarro, I., Gutierrez, J. & Planas, J. (1992). Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 102, 401-407.
- Navarro, I. & Gutiérrez, J. (1995). Fasting and starvation. In: Hochachka PW, Mommsen, TP (eds) *Metabolic biochemistry Elsevier Science, Amsterdam*, 393-434.
- Navarro, I., Rojas, P., Cpailla, E., Albalat, A., Castillo, J., Montserrat, N., Codina, M. & Gutierrez, J. (2002). Insights into insulin and glucagons responses in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 27, 205-216.

- Navas, M. A., Munoz-Elias, E. J., Kim, J., Shih, D. & Stoffel, M. (1999). Functional characterization of the MODY1 gene mutations HNF4(R127W), HNF4(V255M), and HNF4(E276Q). *Diabetes*, *48*, 1459-1465.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H. & Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, *405*: 1017-1024.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldburg, R.J., Hua, K. & Nichols, P.D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*: 15103-15110.
- Newsholme, E. & Leech, A. (1983). *Biochemistry for the Medical Science*. Ed. Wiley
- Niehof, M. & Borlak, J. (2008). HNF4A and the Ca-Channel TRPC1 Are Novel Disease Candidate Genes in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, *57*, 1069-1077.
- Nishiyama, C., Hi, R., Osada, S. & Osumi, T. (1998). Functional Interactions between Nuclear Receptors Recognizing a Common Sequence Element, the Direct Repeat Motif Spaced by One Nucleotide (DR-1). *Journal of Biochemistry*, *123*, 1174-1179.
- Nitsh, D., Boshart, M. & Schutz, G. (1993). Activation of the tyrosine aminotransferase gene is dependent on synergy between liver-specific and hormone-responsive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *90*, 5479-5483.
- Novoa, M., Capilla, E., Rojas, P., Baró, J., Gutiérrez, J. & Navarro, I. (2004). Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, *139*: 48-54.

O.

- O'Brien, R. M. & Granner, D. K. (1996). Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev*, *76*, 1109-1161.
- O'Brien, P. J., Slaughter, M. R., Polley, S. R. & Kramer, K. (2002). Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim*, *36*, 313-321.
- Ohkubo, N. & Matsubara, T. (2002). Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*. *Marine Biology*, *140*, 187-196.
- Okada, M., Sogo, A. & Ohnishi, N. (1994). Glycation reaction of aspartate aminotransferase by various carbohydrates in an *in vitro* system. *J Nutr Biochem*, *5*, 485-489.
- Okada, M., Murakami, Y. & Miyamoto, E. (1997). Glycation and inactivation of aspartate aminotransferase in diabetic rat tissues. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, *43*, 463-469.
- Oshima, T., Kawasaki, T., Ohashi, R., Hasegawa, G., Jiang, S., Umezū, H., Aoyagi, Y., Iwanari, H., Tanaka, T., Hamakubo, T., Kodama, T. & Naito, M. (2007). Downregulated P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. *Pathology International*, *57*, 82-90.
- Oxombre, B., Kouach, M., Moerman, E., Formstecher, P. & Laine, B. (2004). The G115S mutation associated with maturity-onset diabetes of the young impairs hepatocyte nuclear factor 4 α activities and introduces a PKA phosphorylation site in its DNA-binding domain. *Biochem J.*, *383*, 573-80.

P.

- Pabo, C.O. & Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem*, *61*, 1053-1095.
- Palaiologos, G., Hertz, L. & Schousboe, A. (1989). Role of aspartate aminotransferase and mitochondrial dicarboxylate transport for release of endogenously and exogenously supplied neurotransmitter in glutamatergic neurons. *Neurochem Res.*, *14*(4), 359-66.
- Palmer, T. & Ryman, B. (1972). Studies on glucose intolerance in fish. *J Fish Biol*, *4*, 311-319.
- Panja, S., Saha, S., Jana, B., Basu, T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *J. Biotechnol.*, *127*, 14-20.
- Panserat, S., Blin, C., Médale, F., Plagnes-Juan, E., Bréque, J., Krishnamoorthy, J. & Kaushik, S. (2000a). Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1474*, 61-69.

- Panserat, S., Medale, F., Blin, C., Breque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R. & Kaushik, S. (2000b). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278, R1164-1170.
- Panserat, S., Medale, F., Breque, J., Plagnes-Juan, E. & Kaushik, S. (2000c). Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr Biochem*, 11, 22-29.
- Panserat, S., Capilla, E., Gutiérrez, J., Frappart, P. O., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Aguirre, P., Breque, J. & Kaushik, S. (2001a). Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 128, 275-283.
- Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Breque, J. & Kaushik, S. (2001b). Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*, 204, 359-365.
- Panserat, S., Plagnes-Juan, E. & Kaushik, S. (2001c). Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*, 204, 2351-2360.
- Párrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E. M. & Gutiérrez, J. (1994). Insulin receptors and its tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am. J. Physiol.*, 266, R1944-R1950.
- Párrizas, M., Plisetskaya, E. M., Planas, J. & Gutierrez, J. (1995). Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen Comp Endocrinol*, 98, 16-25.
- Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S. & Duncan, S. A. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.*, 34, 292-296.
- Patent, G. J. & Foà, P. P. (1971). Radioimmunoassay of insulin in fishes, experiments in Vivo and in Vitro. *General and Comparative Endocrinology*, 16, 41-46.
- Peh, W.Y.X., Chew, S.F., Ching, B.Y., Loong, A.M. & Ip, Y.K. (2010). Roles of intestinal glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in environmental ammonia detoxification in the euryhaline four-eyed sleeper, *Bostrychus sinensis*. *Aquatic Toxicology*, 98: 91-98.
- Peng, L. A., Schousboe, A. & Hertz, L. (1991). Utilization of α -ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Res*, 16, 29-34.
- Peng, K.W., Chew, S.F., Lim, C.B., Kuah, S.S.L., Kok, W.K. & Ip, Y.K. (1998). The mudskippers *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti* can tolerate environmental NH₃; concentrations of 446 and 36 μ M, respectively. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19: 59-69.
- Pequin, L. & Serfaty, A. (1963). L'excrétion ammoniacale chez un Téléostéen dulcicole: *Cyprinus carpio* L. *Comp. Biochem Physiol*, 10, 315-324.
- Péres, H., Gonçalves, P. & Oliva-Teles, A. (1999). Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 179, 415-423.
- Péres, H. & Oliva-Teles, A. (2002). Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 205, 287-299.
- Péres, H. & Oliva Teles, A. (2006). Proteins and energy metabolism of european Seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles and estimation of maintenance requirements. *Fish Physiol Biochem*, 31, 23-31.
- Pérez-Jiménez, A., Guedes, M. J., Morales, A. E. & Oliva-Teles, A. (2007). Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture*, 265.
- Pilkis, S. J. & Granner, D. K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.*, 54, 885-909.
- Plisetskaya, E. M., Buchelli-Narvaez, L. I., Hardy, R. W. & Dickhoff, W. W. (1991). Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of pacific salmon and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 98, 165-170.
- Plisetskaya, E. M. (1998). Some of my not so favourite things about insulin and insulin-like growth factors in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 121, 3-11.
- Pol, S., Bousquet-Lemerrier, B., Pave-Preux, M., Pawlak, A., Nalpas, B., Berthelot, P., Hanoune, J. & Barouki, R. (1988). Nucleotide sequence and tissue distribution of the human mitochondrial aspartate aminotransferase mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157, 1309-1315.
- Polakof, S., Arjona, F. J., Sangiao-Alvarellos, S., Martín del Río, M. P., Mancera, J. M. & Soengas, J. L. (2006). Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *J. Comp. Physiol.*, 176.

- Polakof, S., Míguez, J. M. & Soengas, J. L. (2007). Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: Dependence on feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147, 363-374.
- Polez, V. L., Moraes, G. & Santos Neto, C. (2003). Different biochemical strategies of two neotropical fish to cope with the impairment of nitrogen excretion during air exposure. *Braz J Med Biol Res*, 36, 279-285.
- Prakasam, A., Sethupathy, S. & Pugalendi, K. V. (2004). Influence of *Casearia esculenta* root extract on protein metabolism and marker enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Polish J. Pharmacol.*, 56, 587-593.
- Price, J. A., Fossey, S. C., Sale, M. M., Brewer, C. S., Freedman, B.I., Wuerth, J. P. & Bowden, D. W. (2000) Analysis of the HNF4 alpha gene in Caucasian type II diabetic nephropathic patients. *Diabetologia*, 43, 364-372.
- Pruhova, S., Ek, J., Lebl, J., Sumnik, Z., Saudek, F., Andel, M., Pedersen, O. & Hansen, T. (2003). Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF- α ; GCK and HNF-1 α . *Diabetologia*, 46, 291-295.

Q.

- Quistorff, B. & Grunnet, N. (1987). Dual-digitonin-pulse perfusion. Concurrent sampling of periportal and perivenous cytosol of rat liver for determination of metabolites and enzyme activities. *Biochem J*, 243, 87-95.

R.

- Raffin, J.P., Izem, L. & Thebault, M.T. (1993). Amplification of myoadenylate deaminase during evolution. II. Purification and properties of the enzyme from two Elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* and *Raja clavata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 106: 999-1007.
- Rajamohan, F., Nelms, L., Joslin, D. L., Lu, B., Reagan, W. J. & Lawton, M. (2006). cDNA cloning, expression, purification, distribution, and characterization of biologically active canine alanine aminotransferase-1. *Protein Expr Purif*, 48, 81-89.
- Rasschaert, J., Giroix, M. H., Conget, I., Mercan, D., Leclercq-Meyer, V., Sener, A., Portha, B. & Malaisse, W. J. (1994). Pancreatic islet response to dicarboxylic acid esters in rats with type 2 diabetes: enzymatic, metabolic and secretory aspects. *Journal of Molecular Endocrinology*, 13, 209-217.
- Reijnen, M. J., Sladek, F. M., Bertina, R. M. & Reitsma, P. H. (1992). Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6300-6303.
- Remesy, C., Demigne, C. & Aufrere, J. (1978). Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets. *Biochem J*, 91A.
- Rodríguez, J. C., Ortiz, J. A., Hegardt, F. G. & Haro, D. (1998). The Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF-4) Represses the Mitochondrial HMG-CoA Synthase Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242, 692-696.
- Ronner, P. & Scarpa, A. (1987). Secretagogues for pancreatic hormone release in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 65, 354-362.
- Ronnestad, I. & Fyhn, H. J. (1993). Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Reviews in Fisheries Science*, 1, 239 - 259.
- Rosen, F., Roberts, N. R., Budnick, L. E. & Nichol, C. A. (1959). Corticosteroids and transaminase activity: the specificity of the glutamic-pyruvic transaminase response. *Endocrinology*, 65, 256-264.
- Rosen, F., Harding, H. R., Milholland, R. J. & Nichol, C. A. (1963). Glucocorticoids and Transaminase Activity. Vi. Comparison of the Adaptive Increases of Alanine- and Tyrosine-Alpha-Ketoglutarate Transaminases. *J Biol Chem*, 238, 3725-3729.
- Roth, U., Curth, K., Unterman, T. G. & Kietzmann, T. (2004). The Transcription Factors HIF-1 and HNF-4 and the Coactivator p300 Are Involved in Insulin-regulated Glucokinase Gene Expression via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2623-2631.
- Ruse, M. D., Jr., Privalsky, M. L. & Sladek, F. M. (2002). Competitive Cofactor Recruitment by Orphan Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 α 1: Modulation by the F Domain. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 1626-1638.

S.

- Saha, N. & Ratha, B. (1998). Ureogenesis in Indian air-breathing teleost: adaptation to environmental constraints. *Comp Biochem Physiol*, 195-208.
- Saha, N., Dutta, S. & Häussinger, D. (2000). Changes in free amino acid synthesis in the perfused liver of an air-breathing walking catfish, *Clarias batrachus* infused with ammonium chloride: A strategy to adapt under hyperammonia stress. *Journal of Experimental Zoology*, 286: 13-23.
- Saier, M. H. Jr. & Jenkins, W. T. (1967a). Alanine aminotransferase. I. Purification and properties. *J Biol Chem*, 242, 91-100.
- Saier, H.M. Jr. & Jenkins, W.T. (1967b). Alanine aminotransferase II. The basis for substrate specificity. *J Biol Chem*, 242: 301.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Ehlich, H.A. (1998). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 680-685.
- Salgado, M. C., Metón, I., Egea, M. & Baanante, I. V. (2004). Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *J Mol Endocrinol*, 33, 783-795.
- Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Sánchez-Muros, M. J., García-Rejón, L., García-Salguero, L., de la Higuera, M. & Lupiáñez, J. A. (1998). Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int J Biochem Cell Biol*, 30, 55-63.
- Sanderson, L.A., Wright, P.A., Robinson, J.W., Ballantyne, J.S. & Bernier, N.J. (2010). Inhibition of glutamine synthetase during ammonia exposure in rainbow trout indicates a high reserve capacity to prevent brain ammonia toxicity. *Journal of Experimental Biology*, 213: 2343-2353.
- Sattar, N., McConnachie, A., Ford, I., Gaw, A., Cleland, S. J., Forouhi, N. G., McFarlane, P., Shepherd, J., Cobbe, S. & Packard, C. (2007). Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes*, 56, 984-991.
- Schiestl, R. & Gietz, R. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.*, 16, 339-346
- Schulze, M., Manson, J., Willett, W. & Hu, F. (2003). Processed meat intake and incidence of Type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *Diabetologia*, 46, 1465-1473.
- Schulze, M. B., Schulz, M., Heidemann, C., Schienkiewitz, A., Hoffmann, K. & Boeing, H. (2008). Carbohydrate intake and incidence of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *British Journal of Nutrition*, 99:1107-1116
- Segel, I. H. (1993). Enzyme kinetics: Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. *Ed. Willey, Hoboken, N. Y.*
- Seiichi, O., Fumihiko, M., Shoaib, C., Tatsuya, K., Katsuro, I., Eiichi, A., Motoaki, S., Masataka, M. & Masaki, T. (2000). The gene for hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 alpha is activated by glucocorticoids and glucagon, and repressed by insulin in rat liver. *FEBS letters*, 478, 141-146.
- Seiliez, I., Panserat, S.P., Lansard, M., Polakof, S., Plagnes-Juan, E., Surget, A., Dias, K., Larquier, M.L., Kaushik, S. & Skiba-Cassy, S. (2011) Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300: R733-R743.
- Sel, S., Ebert, T., Ryffel, G. U. & Drewes, T. (1996). Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4[alpha] and HNF1[alpha]. *Cancer Letters*, 101, 205-210.
- Seoane, J., Trinh, K., O'Doherty, R. M., Gomez-Foix, A. M., Lange, A. J., Newgard, C. B. & Guinovart, J. J. (1997). Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. *J Biol Chem*, 272, 26972-26977.
- Sherman, K. E. (1991). Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. *Arch Intern Med*, 151, 260-265.
- Shiau, S. (1997). Utilization of carbohydrates in warmwater fish - with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 151, 79-96.

- Singh, S. N., Vats, P., Suri, S., Shyam, R., Kumria, M. M. L., Ranganathan, S. & Sridharan, K. (2001). Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 269-277
- Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E. & Darnell, J. E. J. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.*, 4, 2353-2365.
- Sladek, F. M. (1993). Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. *Receptor*, 3, 223-232.
- Sladek, F. M., Dallas-Yang, Q. & Nepomuceno, L. (1998). MODY1 mutation Q268X in hepatocyte nuclear factor 4 α allows for dimerization in solution but causes abnormal subcellular localization. *Diabetes*, 47, 985-990.
- Sladek, F. M. & Seidel, S. (2001). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α . *Nuclear Receptors and Genetic Disease*. Eds. T. P. Burris & E. McCabe. Academic Press. London.
- Sluijjs, I., Beulens, J. W. J., van der A, D. L., Spijkerman, A. M. W., Grobbee, D. E. & van der Schouw, Y. T. (2010). Dietary Intake of Total, Animal, and Vegetable Protein and Risk of Type 2 Diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-NL Study. *Diabetes Care*, 33, 43-48.
- Smith, D. D. J., Ritter, N. M. & Campbell, J. W. (1983). Glutamine synthetase isoenzymes in elasmobranch brain and liver tissues. *J Biol Chem*, 262: 198-202.
- Snell, E. E. (1990). Vitamine B6 and decarboxylation of histidine. *Ann N Y Acad Sci*, 585, 1-12.
- Soengas, J. L., Strong, E. F., Fuentes, J., Veira, J. A. R. & Andres, M. D. (1996). Food deprivation and refeeding in Atlantic Salmon, *Salmo Salar* - effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol. Biochem.*, 15.
- Soengas, J. L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S. & Moon, T. W. (2006). Glucokinase and hexoinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291, R810-821.
- Sohocki, M. M., Sullivan, L. S., Harrison, W. R., Sodergren, E. J., Elder, F. F. B., Weinstock, G., Tanase, S. & Daiger, S. P. (1997). Human Glutamate Pyruvate Transaminase (GPT): Localization to 8q24.3, cDNA and Genomic Sequences, and Polymorphic Sites. *Genomics*, 40, 247-252.
- Song, Y., Manson, J. E., Buring, J. E. & Liu, S. (2004). A Prospective Study of Red Meat Consumption and Type 2 Diabetes in Middle-Aged and Elderly Women. *Diabetes Care*, 27, 2108-2115.
- Song, K.-H. & Chiang, J. Y. L. (2006). Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a1) gene expression in human hepatocytes: Discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatology*, 43, 117-125.
- Soutoglou, E., Katrakili, N. & Talianidis, I. (2000). Acetylation Regulates Transcription Factor Activity at Multiple Levels. *Molecular cell*, 5, 745-751.
- Srivastava, A. S., Oohara, I., Suzuki, T., Shenouda, S., Singh, S. N., Chauhan, D. P. & Carrier, E. (2004). Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 197-207.
- Stanulović, V. S., Kyrmizi, I., Kruithof-de Julio, M., Hoogenkamp, M., Vermeulen, J. L. M., Ruijter, J. M., Talianidis, I., Hakvoort, T. B. M. & Lamers, W. H. (2007). Hepatic HNF4 α deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes. *Hepatology*, 45, 433-444.
- Steffens, W. (1989). Principles of fish nutrition. Ed. Halsted Press.
- Steffens (1996). Protein sparing effect and nutritive significance of lipid supplementation in carp diets. *Arch Tierernahr*, 49: 93-98.
- Stein, G.S., Van Wijnen, A.J., Montecino, M., Stein, J.L. & Lian, J.B. (1999). Nuclear structure/gene expression interrelationships. *Journal of Cellular Physiology*, 181: 240-250.
- Steinke, D., Salzburger, W., Braasch, I. & Meyer, A. (2006). Many genes in fish have species-specific asymmetric rates of molecular evolution. *BMC Genomics*, 7, 20.
- Stone, D.A.J. (2003). Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev Fish Sci*, 11: 337-369.
- Stone, D., Allan, G. & Anderson, A. (2003). Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Michell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquac Res*, 34, 123-134.
- Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García Gallego, M., Sanz, A. & De La Higuera, M. (1995). Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 111: 421-428.

- Suaud, L., Hemimou, Y., Formstecher, P. & Laine, B. (1999). Functional study of the E276Q mutant hepatocyte nuclear factor-4 α found in type 1 maturity-onset diabetes of the young: impaired synergy with chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II on the hepatocyte nuclear factor-1 promoter. *Diabetes*, *48*, 1162-1167.
- Sugai, M., Umezu, H., Yamamoto, T., Jiang, S., Iwanari, H., Tanaka, T., Hamakubo, T., Kodama, T. & Naito, M. (2008). Expression of hepatocyte nuclear factor 4 α in primary ovarian mucinous tumors. *Pathology International*, *58*, 681-686.
- Sugita, Y., Shirakawa, H., Ritsuko, S., Furukawa, Y. & Komai, M. (2008). Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *72*, 1290-1298.
- Sun, K., Montana, V., Chellappa, K., Brelivet, Y., Moras, D., Maeda, Y., Parpura, V., Paschal, B. M. & Sladek, F. M. (2007). Phosphorylation of a Conserved Serine in the Deoxyribonucleic Acid Binding Domain of Nuclear Receptors Alters Intracellular Localization. *Mol Endocrinol*, *21*, 1297-1311.
- Sundby, A., Hemre, G. I., Borrebaek, B., Christophersen, B. & Blom, A. K. (1991). Insulin and glucagon family peptides in relation to activities of hepatic hexokinase and other enzymes in fed and starved Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol B*, *100*, 467-470.
- Swick, R. W., Barnstein, P.L., Stange, J.L. (1965). The metabolism of mitochondrial proteins. I. Distribution and characterization of the isozymes of alanine aminotransferase in rat liver. *J Biol Chem*, *240*, 3334-3340.

T.

- Tacon, A.G. & Metian, M. (2009). Fishing for feed or fishing for foos: increasing global competition for small pelagic forage fish. *Ambio*, *38*: 294-302.
- Takashima, M., Ogawa, W., Hayashi, K., Inoue, H., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Sakaue, H., Wataoka, Y., Emi, A., Senga, Y., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R. & Kasuga, M. (2010). Role of KLF15 in Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Metformin Action. *Diabetes*, *59*, 1608-1615.
- Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. & Inoue, H. (1964). The biochemistry of animal cell, I. The effect of corticosteroids on leakage of enzymes from dispersed rat liver cells. *J Biol Chem*, *239*, 3590-3596.
- Takeuchi, T., M., H. & Watanabe, T. (1994). Nutritive value of gelatinized corn meal as a carbohydrate source to grass carp and hybrid tilapia *Oreochromis x O. aureus*. *Fish sci*, *60*, 573-577.
- Tan, K., Atabani, G. & Marks, V. (1985). Divergent effect of glucagon antibodies on arginine and glucose-stimulated insulin secretion in the rat. *Diabetologia*, *28*, 441-444.
- Tanaka, T., Jiang, S., Hotta, H., Takano, K., Iwanari, H., Sumi, K., Daigo, K., Ohashi, R., Sugai, M., Ikegame, C., Umezu, H., Hirayama, Y., Midorikawa, Y., Hippo, Y., Watanabe, A., Uchiyama, Y., Hasegawa, G., Reid, P. C., Aburatani, H., Hamakubo, T., Sakai, J., Naito, M. & Kodama, T. (2006). Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer. *The Journal of Pathology*, *208*, 662-672.
- Tanase, S., Kojima, H. & Morino, Y. (1979). Pyridoxal 5'-phosphate binding site of pig heart alanine aminotransferase. *Biochemistry*, *18*, 3002-3007.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, C. R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*:85-96
- Taraviras, S., Monaghan, A. P., Schütz, G. & Kelsey, G. (1994). Characterization of the mouse HNF-4 gene its expression during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.*, *48*, 67-79.
- Taraviras, S., Mantamadiotis, T., Dong-Si, T., Mincheva, A., Lichter, P., Drewes, T., Ryffel, G. U., Monaghan, A. P. & Schütz, G. (2000). Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4 γ . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1490*, 21-32.
- Teerijoki, H., Krasnov, A., Pitkanen, T. I. & Molsa, H. (2000). Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim Biophys Acta*, *1494*, 290-294.
- Teerijoki, H., Krasnov, A., Gorodilov, Y., Krishna, S. & Molsa, H. (2001). Rainbow trout glucose transporter (OnmyGLUT1): functional assessment in *Xenopus laevis* oocytes and expression in fish embryos. *J Exp Biol*, *204*, 2667-2673.
- Teshigawara, K., Ogawa, W., Mori, T., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Inoue, H., Miyake, K., Sakaue, H. & Kasuga, M. (2005). Role of Krüppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *327*, 920-926.

- Thakran, S., Salimuddin & Baquer, N. Z. (2003). Oral administration of orthovanadate and *Trigonella foenum graecum* seed powder restore the activities of mitochondrial enzymes in tissues of alloxan-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 247, 45-53.
- Thomas, Y., Courties, C., El Helwe, Y., Herbrand, A. & Lemonnier, H. (2010). Spatial and temporal extension of eutrophication associated with shrimp farm wastewater discharges in the New Caledonia lagoon. *Marine Pollution Bulletin*, 61, 387-398.
- Thorens, B. (1993). Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Annu. Rev. Physiol. Review*, 55, 591-608.
- Thulin, P., Rafter, I., Stockling, K., Tomkiewicz, C., Norjavaara, E., Aggerbeck, M., Hellmold, H., Ehrenborg, E., Andersson, U., Cotgreave, I. & Glinghammar, B. (2008). PPAR α regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231, 1-9.
- Tischler, M. E., Friedrichs, D., Coll, K. & Williamson, J. R. (1977). Pyridine nucleotide distributions and enzyme mass action ratios in hepatocytes from fed and starved rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 184, 222-236.
- Tng, Y.Y.M., Wee, N.L.J., Ip, Y.K. & Chew, S.F. (2008). Postprandial nitrogen metabolism and excretion in juvenile marble goby, *Oxyeleotris marmorata* (Bleeker, 1852). *Aquaculture*, 284: 260-267.
- Tng, Y.Y.M., Chew, S.F., Wee, N.L.J., Wong, F.K., Wong, W.P., Tok, C.Y. & Ip, Y.K. (2009). Acute ammonia toxicity and the protective effects of methionine sulfoximine on the swamp eel, *Monopterus albus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 311A: 676-688.
- Tomkiewicz, C., Muzeau, F., Edgar, A. D., Barouki, R. & Aggerbeck, M. (2004). Opposite regulation of the rat and human cytosolic aspartate aminotransferase genes by fibrates. *Biochemical Pharmacology*, 67, 213-225.
- Torres-Padilla, M. E., Fougère-Deschatrette, C. & Weiss, M. C. (2001). Expression of HNF4 α isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mechanisms of Development*, 109, 183-193.
- Tranulis, M. A., Christophersen, B., Blom, A. K. & Borrebaek, B. (1991). Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations. *Comp. Biochem Physiol B*, 99, 687-691.
- Tranulis, M. A., Dregni, O., Christophersen, B., Krogdahl, A. & Borrebaek, B. (1996). A glucokinase-like-enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 114, 35-39.
- Tranulis, M. A., Christophersen, B. & Borrebaek, B. (1997). Glucokinase in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) brockmann bodies. *Comp Biochem Physiol*, 367-370.
- Tremblay, F. D. R. & Marette, A. (2001). Amino Acid and Insulin Signaling via the mTOR/p70 S6 Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 38052-38060.
- Tremblay, F. D. R., Krebs, M., Dombrowski, L., Brehm, A., Bernroider, E., Roth, E., Nowotny, P., Waldhäusl, W., Marette, A. & Roden, M. (2005). Overactivation of S6 Kinase 1 as a Cause of Human Insulin Resistance During Increased Amino Acid Availability. *Diabetes*, 54, 2674-2684.
- Trinh, K. Y., O'Doherty, R. M., Anderson, P., Lange, A. J. & Newgard, C. B. (1998). Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J. Biol. Chem.*, 273, 31615-31620.
- Twisk, J., Hoekman, M. F., Mager, W. H., Moorman, A. F., de Boer, P. A., Scheja, L., Princen, H. M. & Gebhardt, R. (1995). Heterogeneous expression of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase genes in the rat liver lobulus. *The Journal of Clinical Investigation*, 95, 1235-1243.
- U.**
- Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P. R., Kozma, S. C., Auwerx, J. & Thomas, G. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431:200-5
- V.**
- Van den Thillart, G. & Van Raaij, M. (1995). Endogenous fuels; noninvasive versus invasive. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Metabolic Biochemistry* (Hochachka PW, Mommsen TP eds). 4, Elsevier, Amsterdam
- Van Waarde, A. (1981). Nitrogen metabolism in goldfish *Carassius auratus* (L.). Activities of transamination reactions, purine nucleotide cycle and glutamate dehydrogenase in goldfish tissues.

- Comp. Biochem. Physiol.* 68B, 407–413.
- Van Waarde, A. & Kesbeke, F. (1982). Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.) activities of amidases and amide synthetases in goldfish tissues. *Comp Biochem Physiol B*, 71, 599-603.
- Van Waarde, A. (1983). Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp Biochem Physiol*, 74B: 675-684.
- Van Waarde, A. (1988). Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. *Comp Biochem Physiol*, 91B: 207-228.
- Vang, A., Singh, P. N., Lee, J. W., Haddad, E. H. & Brinegar, C. H. (2008). Meats, Processed Meats, Obesity, Weight Gain and Occurrence of Diabetes among Adults: *Findings from Adventist Health Studies. Annals of Nutrition and Metabolism*, 52, 96-104.
- Valentine, B. A., Blue, J. T., Shelley, S. M. & Cooper, B. J. (1990). Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. *J Vet Intern Med*, 4, 140-143.
- Veauvy, C.M., McDonald, M.D., Audekerke, J.V., Vanhoutte, G., Camp, N.V., Linden, A.V.D. & Walsh, P.J. (2005). Ammonia affects brain nitrogen metabolism but not hydration status in the Gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Aquatic Toxicology*, 74: 32-46.
- Vedavathi, M., Girish, K. S. & Kumar, M. K. (2004). Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. *Mol Cell Biochem*, 267, 13-23.
- Venou, B., Alexis, M., Fountoulaki, E., Nengas, I., Apostolopoulou, M. & Castritsi-Cathariou, I. (2003). Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 225, 207-223.
- Viollet, B., Kahn, A. & Raymondjean, M. (1997). Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 4208-4219.
- Vojarova, B., Stefan, N., Lindsay, R. S., Saremi, A., Pratley, R. E., Bogardus, C. & Tataranni, P. A. (2002). High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51, 1889-1895.

W.

- Walker, J. & Barrett, J. (1991). Studies on alanine aminotransferase in nematodes. *International Journal for Parasitology*, 21, 377-380.
- Walsh, P.J., Mayer, G.D., Medina, M.N., Bernstein, M.L., Barimo, J.F. & Mommsen, T.P. (2003). A second glutamine synthetase gene with expression in the gills of the gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Journal of Experimental Biology*, 206: 1523-1533.
- Walton, M. & Cowey, C. (1977). Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol*, 62B, 497-499.
- Walton, M. J. & Cowey, C. B. (1979). Gluconeogenesis from serine by rainbow trout *Salmo gairdneri* liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 497-499.
- Walton, M. J. (1986). Metabolic effects of feeding a high protein/ low carbohydrate diet as compared to a low protein/ high carbohydrate diet to rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol. Biochem.*, 1, 7-15.
- Waner, T., Nysca, A., Bogin, E., Levy, R. & Galiano, A. (1990). Drug-induced decrease of serum alanine and aspartate aminotransferase activity in the rat, as a result of treatment with oxodipine, a new calcium channel blocker. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 28, 25-30.
- Wang, J.-C., Stafford, J. M. & Granner, D. K. (1998). SRC-1 and GRIP1 Coactivate Transcription with Hepatocyte Nuclear Factor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30847-30850.
- Wang, H., Maechler, P., Antinozzi, P. A., Hagenfeldt, K. A. & Wollheim, C. B. (2000). Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha Regulates the Expression of Pancreatic beta-Cell Genes Implicated in Glucose Metabolism and Nutrient-induced Insulin Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 35953-35959.
- Wang, Y. & Walsh, P. J. (2000). High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquat Toxicol.*, 50(3), 205-219.
- Wang, Y.S., Gonzalez, R.J., Patrick, M.L., Grosell, M., Zhang, C., Feng, Q., Du, J., Walsh, P.J. & Wood, C.M. (2003). Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: A high altitude alkaline saline lake. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 134: 409-421.
- Wannamethee, S. G., Shaper, A. G., Lennon, L. & Whincup, P. H. (2005). Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care*, 28, 2913-2918.

- Watt, A. J., Garrison, W. D. & Duncan, S. A. (2003). HNF4: A central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology*, 37, 1249-1253.
- Webb, J.T. & Brown, G.W.J. (1976). Some properties and occurrence of glutamine synthetase in fish. *Comp Biochem Physiol*, 54B: 171-175.
- Webb, J.T. & Brown, G.W.J. (1980). Glutamine synthetase: assimilatory role in liver as related to urea retention in marine Chondrichthyes. *Science*, 208: 293-295.
- Wee, N.L.J., Tng, Y.Y.M., Cheng, H.T., Lee, S.M.L., Chew, S.F. & Ip, Y.K. (2007). Ammonia toxicity and tolerance in the brain of the African sharp-tooth catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquatic Toxicology*, 82: 204-213.
- Weihrauch, D., Wilkie, M.P. & Walsh, P.J. (2009). Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. *Journal of Experimental Biology*, 212: 1716-1730.
- Weissglas-Volkov, D., Huertas-Vazquez, A., Suviolahti, E., Lee, J., Plaisier, C., Canizales-Quinteros, S., Tusie-Luna, T., Aguilar-Salinas, C., Taskinen, M.-R. & Pajukanta, P. i. (2006). Common Hepatic Nuclear Factor-4 alpha Variants Are Associated With High Serum Lipid Levels and the Metabolic Syndrome. *Diabetes*, 55, 1970-1977.
- Welch, S. G. (1972). Quantitative Differences Between the Human Red Cell Glutamate-Pyruvate Transaminase Phenotypes. *Human Heredity*, 22, 190-197.
- Wendy, D. G., Michele, A. B., Chuhu, Y., Klaus, H. K., Frances, M. S. & Stephen, A. D. (2006). Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha Is Essential for Embryonic Development of the Mouse Colon. *Gastroenterology*, 130, 19.e11-19.e.
- West, J., Brousil, J., Gazis, A., Jackson, L., Mansell, P., Bennett, A. & Aithal, G. P. (2006). Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *QJM*, 99, 871-876.
- Wicks, B.J. & Randall, D.J. (2002a). The effect of feeding and fasting on ammonia toxicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 59, 71-82.
- Wicks, B.J. & Randall, D.J. (2002b). The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132: 275-285.
- Wilkie, M.P. (1997). Mechanisms of Ammonia Excretion Across Fish Gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118: 39-50.
- Wilkie, M.P. (2002). Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 284-301.
- Wilson, G. L. & Leiter, E. H. (1990). Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 156, 27-54.
- Wilson, R. (1994). Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124, 67-80.
- Wisely, G. B., Miller, A. B., Davis, R. G., Thornquest, A. D., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, J. T., Miller, A. B., Willson, T. M. & Williams, S. P. (2002). Hepatocyte Nuclear Factor 4 Is a Transcription Factor that Constitutively Binds Fatty Acids. *Structure (London, England : 1993)*, 10, 1225-1234.
- Wolberger, C. (1999). Multiprotein-DNA complexes in transcriptional regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28: 29-56.
- Wood, C. (1993). Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Ewans, DH (Ed). *Physiology of Fishes*. CRC Press Boca Raton, 379-425.
- Wood, C., Au, P. & Wright, P. (1995). Ammonia and urea metabolism in relation to gill function and acid-base balance in a marine elasmobranch, the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *J Exp Biol*, 198, 1545-1558.
- Wortham, M., Czerwinski, M., He, L., Parkinson, A. & Wan, Y.-J. Y. (2007). Expression of Constitutive Androstane Receptor, Hepatic Nuclear Factor 4 α , and P450 Oxidoreductase Genes Determines Interindividual Variability in Basal Expression and Activity of a Broad Scope of Xenobiotic Metabolism Genes in the Human Liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 35, 1700-1710.
- Wright, J. R., Jr., O'Hali, W., Yang, H., Han, X. X. & Bonen, A. (1998). GLUT-4 Deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *Gen Comp Endocrinol*, 111, 20-27.
- Wright, P.A., Steele, S.L., Huitema, A. & Bernier, N.J. (2007). Induction of four glutamine synthetase genes in brain of rainbow trout in response to elevated environmental ammonia. *Journal of Experimental Biology*, 210, 2905-2911.
- Wullschlegel, S., Loewith, R. & Hall, M. N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, 124, 471-484.

X.

- Xie, X., Liao, H., Dang, H., Pang, W., Guan, Y., Wang, X., Shyy, J.Y.J., Zhu, Y. & Sladek, F.M. (2009). Down-Regulation of Hepatic HNF4 α Gene Expression during Hyperinsulinemia via SREBPs. *Molecular Endocrinology*, 23, 434-443.
- Xu, J., Christian, B. & Jump, D. B. (2006). Regulation of Rat Hepatic L-Pyruvate Kinase Promoter Composition and Activity by Glucose, n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, and Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α Agonist. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 18351-18362.

Y.

- Yamada, R. H., Wakabayashi, Y. & Iwashima, A. (1984). Inhibition of serum aspartate aminotransferase induced by isoniazid administration in mice. *Acta Vitaminol. Enzymol.*, 6, 289-293.
- Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M. & Bell, G. I. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*, 384, 458-460.
- Yamamoto, H., Aikawa, T., Matsutaka, H., Okuda, T. & Ishikawa, E. (1974). Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats. *Am J Physiol*, 226, 1428-1433.
- Yamamoto, T., Shimano, H., Nakagawa, Y., Ide, T., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., Toyoshima, H., Sato, R. & Yamada, N. (2004). SREBP-1 Interacts with Hepatocyte Nuclear Factor-4 α and Interferes with PGC-1 Recruitment to Suppress Hepatic Gluconeogenic Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 12027-12035.
- Yang, R.-Z., Blaileanu, G., Hansen, B. C., Shuldiner, A. R. & Gong, D.-W. (2002). cDNA Cloning, Genomic Structure, Chromosomal Mapping, and Functional Expression of a Novel Human Alanine Aminotransferase. *Genomics*, 79, 445-450.
- Yang, R.-Z., Park, S., Reagan, W. J., Goldstein, R., Zhong, S., Lawton, M., Rajamohan, F., Qian, K., Liu, L. & Gong, D.-W. (2009). Alanine aminotransferase isoenzymes: Molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*, 49, 598-607.
- Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C. R., Granner, D. K., Newgard, C. B. & Spiegelman, B. M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413, 131-138.
- Yoshida, E., Aratani, S., Itou, H., Miyagishi, M., Takiguchi, M., Osumu, T., Murakami, K. & Fukamizu, A. (1997). Functional Association between CBP and HNF4 in Trans-activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241, 664-669.
- You, M., Fischer, M., Cho, W. K. & Crabb, D. (2002). Transcriptional Control of the Human Aldehyde Dehydrogenase 2 Promoter by Hepatocyte Nuclear Factor 4: Inhibition by Cyclic AMP and COUP Transcription Factors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 398, 79-86.
- Yuan, X., Ta, T. C., Lin, M., Evans, J. R., Dong, Y., Bolotin, E., Sherman, M. A., Forman, B. M. & Sladek, F. M. (2009). Identification of an Endogenous Ligand Bound to a Native Orphan Nuclear Receptor. *PLoS ONE*, 4, e5609.

Z.

- Zhang, Z., Wu, R. S., Mok, H. O., Wang, Y., Poon, W. W., Cheng, S. H. & Kong, R. Y. (2003). Isolation, characterization and expression analysis of a hypoxia-responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Eur J Biochem*, 270, 3010-3017.
- Zhang, S., Liu, J., Wei, S., Gao, J., Wang, D. & Zhang, K. (2006). Impact of aquaculture on eutrophication in Changshou Reservoir. *Chinese Journal of Geochemistry*, 25: 90-96.
- Zhang, Y., Lu, X., Hong, J., Chao, M., Gu, W., Wang, W. & Ning, G. (2010). Positive correlations of liver enzymes with metabolic syndrome including insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*, 38, 181-187.
- Zhong, W., Sladek, F. M. & Darnell, J. E. J. (1993). The expression pattern of a *Drosophila* homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. *EMBO J.*, 12, 537-544.
- Zhou, S.-L., Gordon, R. E., Bradbury, M., Stump, D., Kiang, C.-L. & Berk, P. D. (1998). Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in HepG2 cells. *Hepatology*, 27, 1064-1074.
- Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R., Siebert, P. D. (2001). Reverse transcriptase template switching, a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*. 30, 892-897.

- Zhu, Q., Yamagata, K., Miura, A., Shihara, N., Horikawa, Y., Takeda, J., Miyagawa, J. & Matsuzawa, Y. (2003). T130I mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia*, 46, 567-573.
- Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., Marçais, G., Roberts, M., Subramanian, P., Yorke, J. A. & Salzberg, S. L. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.*;10(4):R42.

8. ANNEXOS

8. ANNEXOS

Seqüència parcial de cDNA per a GlnS d'orada:

```

1   tacctgattcctgctgccatggtccgcgatccattccgcaaagaccccaacaaactggtc
   Y L I P A A M F R D P F R K D P N K L V   20
61  ctgtgtgaggtgcagaagtacaacgggaaacctgcagaaaccaaccttcgcatcacatgt
   L C E V Q K Y N G K P A E T N L R I T C   40
121 aaaaaaattatggaaatggtggaggaccagcatccttggttcggcatggagcaggagtac
   K K I M E M V E D Q H P W F G M E Q E Y   60
181 accatcctggggcacagacggacaccctttcggctggcctctaattggtttccctggacca
   T I L G T D G H P F G W P S N G F P G P   80
241 cag
   Q                                           81

```

Seqüència parcial de cDNA per a AST2 d'orada:

```

1   aggtccacggtatggctaaccgcatcattaagatgagagaacagctggttgccggctctgc
   V H G M A N R I I K M R E Q L V A G L   19
61  agaaggagggctccactcacaactggcagcatgtcatcgaccagatcgggat
   Q K E G S T H N W Q H V I D Q I G       36

```

Seqüència parcial de cDNA per a GDH d'orada:

```

1   gaaagcccatcagccagggaggtatccacggtcgtatctcagccactggtcgcggtctct
   K P I S Q G G I H G R I S A T G R G V   18
61  tccatggcatcgagaacttcattaacgagggcgtcctacatgagcatgggtgggctgacac
   F H G I E N F I N E A S Y M S M V G L T   38
121 caggcttccaggacaagaccttcattatccagggccttggtaatgtgggtctccactcca
   P G F Q D K T F I I Q G F G N V G L H S   58
181 tgaggatctgcacaggtttggggccaagtgtgtgggaatcgctgagattgatggagcca
   M R Y L H R F G A K C V G I A E I D G A   78
241 tccacaaccagatggcatcgaccccaaacagctggaggactacaaactgaacaatggca
   I H N P D G I D P K Q L E D Y K L N N G   98
301 ccattggttgcttcccgaggccaagccctacgaggggaacatthtggagccgactgtc
   T I V G F P G A K P Y E G N I L E A D C  118
361 acatcctgatccctgctgccggagagaagcagctcacacgtaacaacgcctccaggatca
   H I L I P A A G E K Q L T R N N A S R I  138
421 aggccaagatcattgctgagggtgccaatgggcccaccacccagatgctgacaagatct
   K A K I I A E G A N G P T T P D A D K I  158
481 tcctggagaacaacgtcatggttattcctgacatgtacttgaatgctgggtgtgacag
   F L E N N V M V I P D M Y L N A G G V T  178
521 tgtcttatttgcagtggtgaagaatctcaaccatgtcagctatggaagactgaccttca
   V S Y F E W L K N L N H V S Y G R L T F  198
561 aatat
   K Y                                           200

```


Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Transactivates the Mitochondrial Alanine Aminotransferase Gene in the Kidney of *Sparus aurata*

María C. Salgado · Isidoro Metón · Ida G. Anemaet ·
J. Diego González · Felipe Fernández ·
Isabel V. Baanante

Received: 14 October 2010 / Accepted: 3 May 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Alanine aminotransferase (ALT) plays an important role in amino acid metabolism and gluconeogenesis. The preference of carnivorous fish for protein amino acids instead of carbohydrates as a source of energy lead us to study the transcriptional regulation of the mitochondrial ALT (mALT) gene and to characterize the enzyme kinetics and modulation of mALT expression in the kidney of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under different nutritional and hormonal conditions. 5'-Deletion analysis of mALT promoter in transiently transfected HEK293 cells, site-directed mutagenesis and electrophoretic mobility shift assays allowed us to identify HNF4 α as a new factor involved in the transcriptional regulation of mALT expression. Quantitative RT-PCR assays showed that starvation and the administration of streptozotocin (STZ) decreased HNF4 α levels in the kidney of *S. aurata*, leading to the downregulation of mALT transcription. Analysis of the tissue distribution showed that kidney, liver, and intestine were the tissues with higher mALT and HNF4 α expression.

Kinetic analysis indicates that mALT enzyme is more efficient in catalyzing the conversion of L-alanine to pyruvate than the reverse reaction. From these results, we conclude that HNF4 α transactivates the mALT promoter and that the low levels of mALT expression found in the kidney of starved and STZ-treated fish result from a decreased expression of HNF4 α . Our findings suggest that the mALT isoenzyme plays a major role in oxidizing dietary amino acids, and points to ALT as a target for a biotechnological action to spare protein and optimize the use of dietary nutrients for fish culture.

Keywords Hepatocyte nuclear factor 4 α · Kidney · Mitochondrial alanine aminotransferase · *Sparus aurata* · Starvation · Streptozotocin

Introduction

Carnivorous fish have little capacity to utilize dietary carbohydrates; instead, they efficiently use the protein amino acids for growth and to obtain energy. In fact, amino acids appear to be a more important energy source than carbohydrates in these animals. The limited capacity to metabolize dietary carbohydrates and a metabolic profile that mimics non-insulin-dependent diabetes mellitus in mammals after a glucose load, led to consider these animals as glucose intolerant (Cowey and Walton 1989; Moon 2001; Hemre et al. 2002).

Alanine aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) links carbohydrate and amino acid metabolism through catalyzing the reversible transamination between L-alanine

M. C. Salgado · I. Metón · I. G. Anemaet · J. D. González ·
I. V. Baanante (✉)
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona,
Joan XXIII s/n,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: baanantevazquez@ub.edu

F. Fernández
Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona,
Diagonal 645,
08028 Barcelona, Spain

and 2-oxoglutarate to form pyruvate and L-glutamate. The presence of ALT isoforms in the cytosol and mitochondria has been proposed on the basis of biochemical studies (De Rosa and Swick 1975). In humans and mice, two ALT isoforms, ALT1 and ALT2, each encoded by a different gene, have been cloned (Sohocki et al. 1997; Yang et al. 2002; Jadhao et al. 2004). In fish, levels of ALT activity in the liver are used as an indicator of protein utilization (Fynn-Aikins et al. 1995; Sánchez-Muros et al. 1998; Metón et al. 1999; Fernández et al. 2007). We reported the presence of three ALT isoforms in *Sparus aurata*. The two first cloned isoforms were the cytosolic cALT1 and the first reported animal amino acid sequence for a mitochondrial ALT, mALT (Metón et al. 2004). Recent studies indicated that alternative splicing of *S. aurata* cytosolic ALT gene generates a second cALT isoform, cALT2. In fish liver, expression of cALT2 is associated with enhanced gluconeogenesis while cALT1 is predominant during the postprandial utilization of dietary nutrients (Anemaet et al. 2008).

Knowledge of the transcriptional control of ALT genes is scarce. Gray et al. (2007) showed that the transcription factor Krüppel-like factor 15, induces expression of the ALT1 gene; however, direct transactivation of the promoter remains to be determined. Peroxisome proliferator-activated receptor α has recently been shown to activate the human ALT1 promoter but not ALT2 promoter activity (Thulin et al. 2008). More recently, Anemaet et al. (2010), showed that the transcription factors p300 and cMyb transactivate the cALT promoter and that p300 could be involved in the upregulation of cALT2 expression observed in streptozotocin (STZ)-treated fishes.

Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) is a member of the nuclear receptor superfamily (NRS) and binds to DNA as a homodimer (Sladek et al. 1990). The HNF4 α protein contains a constitutive autonomous activator of transcription (activation function-1 (AF-1)), two zinc finger motifs that specifically bind to DR1 elements found in promoters of target genes (DNA binding domain), a ligand binding domain (LBD) responsible for dimerization, a hydrophobic AF-2 transactivation domain, and a negative regulatory activity domain (Hadzopoulou-Cladaras et al. 1997; Jiang and Sladek 1997; Duda et al. 2004). In humans, at least nine HNF4 α isoforms have been cloned and characterized (Sladek and Seidel 2001). These isoforms result from both alternative splicing and alternative usage of promoters P1 and P2 (Eeckhoute et al. 2003a). In vertebrates, HNF4 α is mainly expressed in the liver, intestine, kidney, and pancreas (Sladek and Seidel 2001).

HNF4 α plays a critical role in the transcriptional regulation of genes involved in different processes, such

as carbohydrate, amino acid, and lipid metabolism, among others (Stoffel and Duncan 1997; Hayhurst et al. 2001; Sladek and Seidel 2001; Kardassis et al. 2002; Schrem et al. 2002; Salgado et al. 2004). In various experiments with HNF4 α deficient mice, HNF4 α has been shown to establish the liver phenotype (Li et al. 2000; Hayhurst et al. 2001; Inoue et al. 2002; Parviz et al. 2003), regulate epithelial differentiation in the colon (Garrison et al. 2006), and control insulin secretion (Gupta et al. 2005; Miura et al. 2006), as well as to respond to increased metabolic demand in pancreatic β cells (Gupta et al. 2007). In contrast, the physiological role of HNF4 α in other organs, especially in the kidney, remains largely unknown.

Molecular studies devoted to unravel the bases that govern the regulation of ALT gene expression in carnivorous fish are scarce. The aim of this study is to increase the current knowledge of fish intermediary metabolism to allow future biotechnological actions to improve metabolic utilization of dietary nutrients. In the present study, we characterized for the first time the mALT promoter and addressed the role of HNF4 α in the transcriptional control of mALT in kidney of *S. aurata*, one of the most extensively culture marine fish in the Mediterranean. We determined the kinetics of the mALT enzyme and studied the regulation of the expression of HNF4 α and mALT in kidney after starvation and in insulin- and STZ-treated *S. aurata*.

Material and Methods

Experimental Animals

Gilthead sea bream (*S. aurata*) obtained from Tinamenor (Cantabria, Spain) were maintained, at 20°C, in 260-L aquaria as previously described (Fernández et al. 2007). The diet supplied to the animals contained 46% protein, 9.3% carbohydrates, 22% lipids, 10.6% ash, 12.1% moisture, and 21.1 kJ/g gross energy. Unless stated otherwise, fish were fed 25 g/kg body weight (BW) once a day (10 a.m.). The effect of starvation on the expression of mALT and HNF4 α was analyzed in the kidney of fish deprived of food for 19 days and in fed fish. To study regulation of mALT and HNF4 α expression by insulin and STZ, the animals were divided into three groups. At 30 h before sampling, two groups of fish received an intraperitoneal injection with saline and another group was intraperitoneally injected with STZ (600 mg/kg fish; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). At 6 h before sampling, one group of fish previously treated with saline received an intraperitoneal dose of bovine insulin (10 units/kg fish;

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). To prevent stress, fish were anesthetized with MS-222 (1:12,500) before handling (9:30 a.m.). After the fish were killed by cervical section, blood was collected and tissue samples were dissected out, immediately frozen in liquid N₂, and kept at -80°C until use. The experimental procedures complied with the guidelines of the Animal Use Committee of the Universitat de Barcelona.

Cloning of the 5'-Flanking Region of mALT Gene from *S. aurata*

The 5'-flanking region of mALT was isolated by PCR with the Universal Genome Walker Kit (Clontech). Four libraries obtained by blunt-end digestion of *S. aurata* genomic DNA with *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, and *StuI* are ligated to the GenomeWalker adaptor from the kit as previously described elsewhere (Metón et al. 2006). Primary PCR was performed on each library using the gene-specific primer MC01 and the AP-1 primer provided in the kit. Nested PCR was performed on the primary PCR product with the gene-specific primer MC02 and the AP2 primer from the kit. The longest amplification product, a single 912 bp band, obtained with the *StuI* library was ligated into pGEM-T Easy plasmid (Promega) to generate pGEM-mALT820. A second round of chromosome walking was performed using gene-specific primers MC03 and MC04 for the primary and nested PCR, respectively. The 846 bp fragment obtained from the *DraI* library was ligated into the pGEM-T Easy plasmid (Promega) to generate pGEM-mALT846. Two independent clones were fully sequenced on both strands according to the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Construction of Reporter Gene Plasmids

The *S. aurata* mALT-luciferase reporter fusion construct, which harbors promoter sequences located between positions -820 and +92 relative to the transcription start site (pGmALT820) was generated by PCR. To this end, the gene-specific primers MC05 and MC06 were used together with pGEM-mALT820 as a template. The PCR product was restricted with *MluI/HindIII* and ligated into the pGL3-Basic promoterless luciferase reporter plasmid (Promega) previously digested with *MluI/HindIII*. To obtain the pGmALT1540 reporter construct (-1540 to +92 bp), the *MluI/PstI* fragment (-1540 to -519) from pGEM-mALT846 was cloned into the pGmALT820 plasmid previously digested by the same restriction enzymes. Reporter constructs pGmALT519 (-519 to +92 bp) and

pGmALT+62 (+62 to +92 bp) were obtained by self-ligation of filled-in ends of pGmALT820 after digestion with *PmaCI/MluI* and *BstI/MluI*, respectively. The construct pGmALT325 (-325 to +92 bp) was obtained by digesting pGmALT820 with *BstEII/MluI* followed by chew-back and filled-in reactions with Klenow enzyme and self-ligation. The pGmALT103 (-103 to +92 bp) and pGmALT49 (-49 to +92 bp) plasmids were obtained by PCR using primer pairs MC07/MC05 and MC08/MC05, respectively, and pGmALT820 as a template. Construct pGmALT1540Δ103-49 (-1540 to +92 bp relative to the transcription start site, and including the deletion of nucleotides from -103 to -49) was obtained by PCR using MC09 and MC05 as primers. The PCR product was digested with *PmaCI* and *HindIII* and ligated to the pGmALT1540 construct, previously digested with the same enzymes. Construct pGmALT1540mutHNF4 (-1540 to +92 bp), which harbors a mutated HNF4α binding site, was obtained by PCR using oligonucleotides MC10 and MC05. The PCR product was digested with *Esp3I* and *HindIII* and ligated to the pGmALT1540 construct, previously digested with the same enzymes. All constructs were verified by cycle sequencing.

Molecular Cloning of HNF4α cDNA from *S. aurata*

RT-PCR experiments were carried out with total RNA from *S. aurata* tissues. The synthesized cDNA was used as a template for PCR using primers MC19 and MC20, designed from data bank sequences for HNF4α. The PCR was conducted through 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 40 s, and DNA synthesis at 72°C for 2 min, followed by a final extension step of 5 min. A single 1,080 bp band was isolated and ligated into pGEM-T Easy (Promega). Sequence analysis of the resulting construct was thereafter used to design oligonucleotides to perform RACE experiments with the SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech).

To conduct the 5'-RACE experiments, a cDNA strand was synthesized, using *S. aurata* total RNA, the 5'-CDS primer and the SMART II A oligonucleotide (provided in the kit). A primary PCR was performed with MC23 and the Universal Primer Mix A (UPM) provided in the kit. A secondary touchdown PCR assay was carried out on the primary PCR product using the nested MC24 and the nested universal primer mix A (NUPM) from the kit. A second round of 5'-RACE was performed using MC25 and UPM for the primary PCR and MC26 and NUPM as primers for nested PCR.

3'-RACE was performed on cDNA generated from *S. aurata* total RNA and the 3'-CDS primer. An initial PCR round was performed using MC27 and UPM primer pair. A

secondary touchdown PCR was carried out on the primary PCR product using the nested MC28 and the anchor primer from the kit. DNA fragments generated by RACE PCR were ligated into pGEM-T Easy plasmid (Promega). Two independent clones were fully sequenced on both strands in each case.

The full-coding sequence of *S. aurata* kidney HNF4 α was amplified by RT-PCR using MC21 and MC22 as primers. The resulting product was restricted with *Bam*HI and *Hind*III and ligated into pcDNA3, previously digested with the same enzymes, to generate pcDNA3-saHNF4 α . Two independent clones were fully sequenced on both strands.

Cell Transfection and Luciferase Assay

The human embryonic kidney cell line HEK293 (ATCC and CRL-1573) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/l penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM glutamine, and 110 mg/L sodium pyruvate. The cells were grown in six-well plates at 37°C in 5% CO₂. The calcium phosphate coprecipitation method was used for the transient transfection of HEK293 cells at 45–55% confluence. Cells were transfected with 2 μ g of reporter construct, and when necessary, with 200 ng of expression vector encoding rat or *S. aurata* HNF4 α . To correct for variations in transfection efficiency, 250 ng of CMV- β (*lacZ*) plasmid were included in each transfection.

The cells were harvested 16 h later, washed in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 15 min with 300 μ l of Cell Culture Lysis Reagent (Promega). Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 \times *g* for 30 s, and luciferase activity was measured in the supernatant after the addition of the Luciferase Assay Reagent (Promega) in a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs). The activity of β -galactosidase in 20–50 μ l of the clear lysate was measured as previously described (Metón et al. 2006). The expression plasmid encoding rat HNF4 α (pcDNA3.HNF4 α ; (Bartoov-Shifman et al. 2002) was kindly provided by Dr. M. D. Walker (Weizmann Institute of Science, Israel).

Nuclear Extracts

Nuclear extracts were prepared from *S. aurata* as described by Andrews and Faller (1991) with minor modifications, all the steps were performed at 4°C. One hundred milligrams of frozen liver were homogenized in 400 μ l of cold PBS. The cells were pelleted by centrifugation for 10 s at 1,000 \times *g*, washed twice in 400 μ l of cold PBS, and resuspended in 400 μ l of buffer A [10 mM HEPES-KOH

(pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. After 10 min of incubation, cells were vortexed for 10 s. Samples were pelleted and resuspended in 20 μ l of cold buffer C (20 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 M DTT, and 0.2 mM PMSF), and then incubated 20 min for high-salt extraction. After removing cellular debris, the supernatant fraction was aliquoted and stored at –80°C.

Electrophoretic Mobility Shift Assay

One hundred picomoles of double-stranded oligonucleotides (HNF4 α -cons, mALT-66/–37, and mALT-66/–37mutHNF4) were 3'-end-labeled with digoxigenin-11-ddUTP using terminal transferase (Roche) for 30 min, at 37°C. Binding reactions were carried out in a total volume of 20 μ l containing: 100 mM HEPES, pH 7.6, 5 mM EDTA, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM DTT, 1% Tween 20, 150 mM KCl, 1 μ g of nonspecific competitor poly [d(I-C)] (Roche), *S. aurata* nuclear extracts, and the labeled probe. The DNA-protein complexes were electrophoresed, at 4°C, on 5% polyacrylamide gel using 0.5 \times TBE as buffer. Thereafter, DNA was transferred by contact blotting (2 h at room temperature) to Nytran membranes (Schleicher & Schuell), and cross-linked to membranes by UV irradiation for 3 min. Labeled probes were immunodetected with anti-digoxigenin conjugated to alkaline phosphatase (Roche) and with CDP-StarTM (Roche) as chemiluminescent substrate. Membranes were finally exposed to HyperfilmTM ECL (Amersham). For competition experiments, liver *S. aurata* nuclear extracts were preincubated for 30 min with a 10- to 100-fold molar excess of unlabeled double-stranded HNF4 α -cons oligonucleotide. For supershift assays, 20 μ g of HNF4 α antibody (sc-8987 X, Santa Cruz Biotechnology) were incubated with nuclear proteins from *S. aurata* extracts, for 30 min at room temperature, before the addition of the probe to the binding reaction mixture.

Quantitative Real-time PCR

The reverse transcriptase reaction was performed on 5 μ g total RNA isolated from kidney tissue of *S. aurata* by incubation with Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) RT (Invitrogen) for 60 min at 37°C in the presence of random hexamer primers. The cDNA product was used for subsequent quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis.

HNF4 α and mALT mRNA levels were determined in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 0.4 μ M of each primer (MC15/MC16

Table 1 Primers used in the present study

Primer	Sequence (5' to 3')	Maps to
MC01	GACAGCAGCTGCATCCTTGTAGCCGAC	mALT, +101/+126
MC02	CACGGCGAGTTGGGTGACTTTTAAAGCCTC	mALT, +63/+92
MC03	CTAGTAGTCTGTTCGATGGTTGGGGTCAG	mALT, -724/-697
MC04	GGGGTCAGACCTGAATACACTACAGGAC	mALT, -744/-717
MC05	GG<u>AAGCTT</u> CACGGCGAGTTGGGTGAC	mALT, +75/+92
MC06	GG<u>ACGCGT</u> AAAAGTCTTTCAAATATCTG	mALT, -820/-801
MC07	GG<u>ACGCGT</u> CCCACCTTTTATTTCGGAG	mALT, -103/-96
MC08	GG<u>ACGCGT</u> GGTCTGAGTCATTTTAG	mALT, -49/-29
MC09	GG<u>ACGCTG</u> CGTGTGTGGATGCGAGCAGGGTC TGAAGAGACGCTCTGAGAATTTGTGGTCTGA GTCAGTATTTTAG	mALT, -150/-104 and -49/-29
MC10	GGTCTGA <u>AGAGACG</u> CTCTGAGAATTTGTCCCACTTTTAA TTCGGAGCCCCGTAGCTCTCCCCCGCTCTGAGCGGT CCACACGCTCTGAGTCAGTATTTTAGG	mALT, -131/-27
MC15	TTCTGAGCTGGAGGCAGTAGGC	HNF4 α , +1289/+1310
MC16	GCCGATTCATAATGGTCAAATC	HNF4 α , +1238/+1259
MC19	AACCACATGTACTCCTGCAGGTT	HNF4 α rat, +282/+304 in <i>Sparus aurata</i>
MC20	GCTTGGCTGTTTGGGCACTG	HNF4 α zebrafish, +1342/+1361 in <i>S. aurata</i>
MC21	GA<u>AAGCTT</u> GCCGCCATGGACATGGCAGACTACAGCG	HNF4 α , +39/+60
MC22	GGGATCC TTAGATGGCCTCTGTCTTGTAAATAG	HNF4 α , +1378/+1403
HNF4 α -cons	GGAGCTGGTCAAAGGTCACCTGCAGCT	ApoCIII rat
mALT-66/-37	GCTCTGAGCGGTCCAAAGGTCTGAGTCAGC	mALT, -66/-37
mALT-66/-37 mutHNF4 α	GCTCTGAGCGGTCCACACGTCTGAGTCAGC	mALT, -66/-37
MC23	CTGGACCTCCTGGTGTGATTCTGTCTC	HNF4 α , +439/+412
MC24	CTGCACGGCTTCTTTCTTCATGCC	HNF4 α , +404/+381
MC25	CAGCCGGTGAGGAGTCTGTGCCAGTG	HNF4 α , +141/+115
MC26	GGGTCCAGAGCCTCGCTGTAGTCTGCC	HNF4 α , +73/+47
MC27	GTGTCCAACAACATGCCAACGCCG	HNF4 α , +1218/+1241
MC28	CCCGATCCCGTCTCCGCCACTGACC	HNF4 α , +1274/+1298
IMAL 24	GAGGATCC ATTTAAGAATACTGTGAGTGAAC	mALT, +1766/+1742
YM1	GG<u>AAGCTT</u> AAAAATGTCTGTCTACAAGGATGCAGCTGCTG	mALT, +95/+125
JDRT18S	TTACGCCCATGTTGTCTCTGAG	Ribosomal 18s
JDRT18AS	AGGATTCTGCATGATGGTCACC	Ribosomal 18s
JDRTm1S	CCAGGGTCCGCTCACTGAT	mALT, +195/+214
JDRTm1AS	GTCGCGCTCACACTCGATAA	mALT, +271/+291

Primers used in the present study. The following primers contain restriction sites indicated in bold and underlined: MC05, MC21, and YM1 *Hind*III; MC022 and IMAL24 *Bam*HI; MC06, MC07, and MC08 *Mlu*I; MC09 *Pma*I; and MC10 *Esp*3I. For double-stranded oligonucleotides HNF4 α cons, mALT-66/-37 and mALT-66/-37 mutHNF4 α , used in gel shift experiments, only the forward oligonucleotide is shown

and JDRTm1S/JDRTm1AS for HNF4 α and ALTm, respectively), 10 μ l of SYBR Green (Applied biosystems) and 1.6 μ l of the diluted cDNA mixture in a final volume of 20 μ l. The amount of mRNA to be used for the gene of interest in each of the samples was normalized with *S. aurata* ribosomal-18s using the primers JDRT18S and JDRT18AS (Table 1). Variations in gene expression were calculated by the standard $\Delta\Delta$ Ct method. Each experiment was performed at least three times.

Yeast Growth and Transformation

S. cerevisiae putative mitochondrial ALT deletion strain YLR089c (Euroscarf, Frankfurt, Germany; genotype BY4743; MAT a/ α , his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YLR089c::kanMX4/YLR089c::kanMX4) was transformed using the lithium acetate procedure (Schiestl and Gietz 1989). Transformed yeasts were grown in complete

minimal medium (5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.7 g/L yeast nitrogen base and 0.77 g/L yeast dropout powder) lacking uracil (CMUra^-) with 2% glucose as carbon source until $\text{OD}_{600}=1$. Thereafter, the mitochondria were induced by adding CMUra^- supplemented with 2% lactic acid so that $\text{OD}_{600}=0.1$ and then it was incubated at 30°C since $\text{OD}_{600}=1$. Finally, GAL1-promoter activity of pYmALT was induced by adding a 2% galactose to the culture allowing it to grow for 20 h or more at 30°C . To recover protein extracts, cells were sedimented at $3,000\times g$ for 5 min at 4°C , washed twice, and resuspended in mitochondria isolation buffer (MIB) containing 210 mM manitol, 70 mM sucrose, 5 mM HEPES-KOH, pH 7.35, 1 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail for yeast (Sigma-Aldrich). After adding one volume of cold acid-washed glass beads (Sigma-Aldrich), the cells were disrupted by vigorous vortexing and homogenates were centrifuged at $800\times g$ for 5 min at 4°C . The resulting supernatants were centrifuged at $10,000\times g$ for 15 min at 4°C . The pellet was washed twice in MIB and then resuspended in lysis buffer containing Tris-HCl 50 mM pH 7.5 and protease inhibitor cocktail for yeast (Sigma-Aldrich). The mitochondrial fraction after desalted through a Sephadex G-25 column was immediately frozen with a 10% glycerol and stored at -40°C .

pYmALT construct was generated by PCR using primer pairs YH1/IMAL24 (Table 1) and pGEMmALT as template. The PCR product was digested with *Bam*HI and *Hind*III and ligated into the GAL-inducible pYES2 vector (Invitrogen, Paisley, UK), previously digested with the same enzymes. The construct was verified by sequencing.

Enzyme Activity Assays

The reaction in the direction of L-glutamate formation (forward reaction) was measured at 30°C in a Cobas Mira S spectrophotometric analyser (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) by monitoring oxidation of NADH at 340 nm in a mix containing 0.1 M phosphate buffer at pH 7.12, L-alanine, and 2-oxoglutarate at different concentrations, 0.18 mM NADH, 1.4 U/mL lactate dehydrogenase, and desalted yeast protein extract. In order to study the reaction in the direction of alanine formation (reverse reaction), a two-step assay was performed: pyruvate and glutamate at various concentrations were incubated in 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.82 at 30°C for 3 min with the desalted yeast protein extract. After inactivation of the enzyme with trichloroacetic acid and later neutralization of the mixture by adding NaOH 3 M, the 2-oxoglutarate formed was measured by oxidation of NADH at 30°C in a Cobas Mira S spectrophotometric analyser in the presence of 0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 0.18 mM, NADH,

10.04 U/mL glutamate dehydrogenase, and 33 mM ammonium sulfate.

For both forward and reverse reactions, measured in conditions of maximal activity, a unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme consuming 1 μmol of NADH per minute. Protein content in yeast extracts was determined by the Bradford method at 30°C using bovine serum albumin as a standard (Bradford 1976). Fifteen micrograms of mitochondrial protein were used for the kinetic assays.

Lineweaver–Burk (double-reciprocal) plots were used to calculate the kinetic parameters of two independent enzyme preparations. The optimum pH value for the enzyme activity was determined at various pH values between 4.0 and 9.3 in protein extracts from yeast expressing mALT.

Western Blot Analysis

Fifty micrograms of mitochondrial protein was loaded per lane at a 10% polyacrylamide gel and electrophoresed in the presence of sodium dodecyl sulfate. After electrophoresis, the gel was equilibrated in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, and pH 8.3) and electroeluted onto NytranN nylon membranes (Whatman, Kent, UK) for 3 h at 60 V and 4°C . Following the Immun-Star™ Substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) procedure, a rabbit polyclonal antibody raised against a common domain of *S. aurata* ALT isozymes was used as primary antibody (1:1,000) to detect mALT expression in transformed yeast.

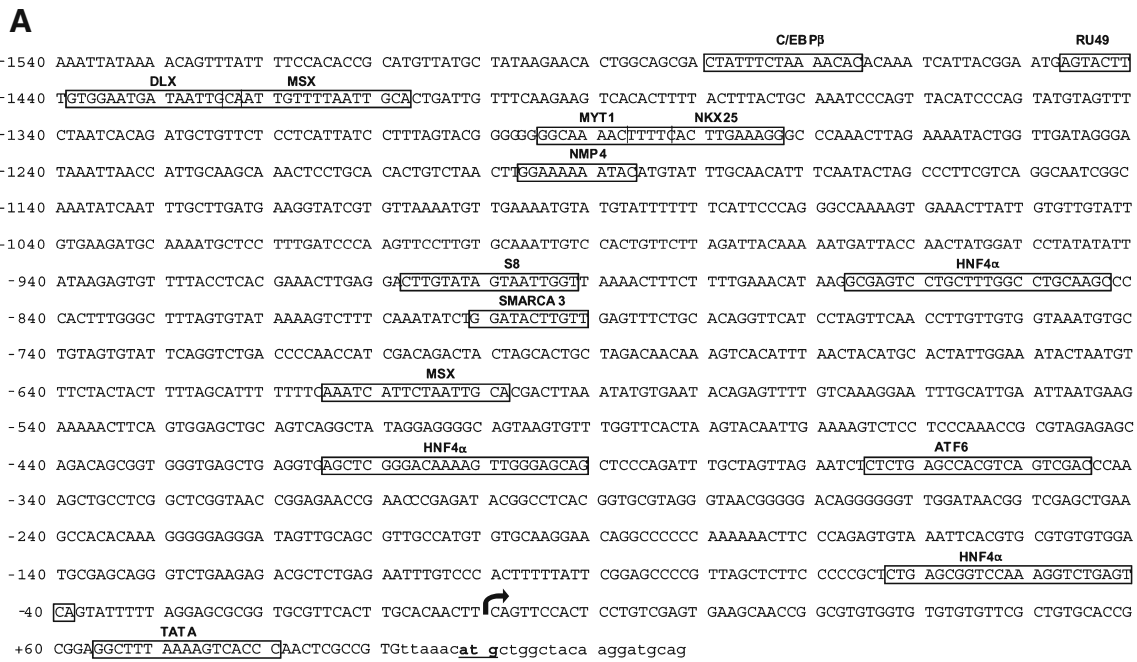
Statistics

Data were analyzed by one-factor analysis of variance using a computer program (StatView, Cary, NC, USA). Differences were determined by Fisher's PLSD multiple range test.

Results

Cloning of the 5'-Flanking Region of the *S. aurata* mALT Gene

A 1,540-bp fragment located upstream of the transcription start site of mALT was isolated by chromosome walking on *S. aurata* genomic DNA, using oligonucleotides designed from hepatic mALT cDNA isolated from this species (Metón et al. 2004) (Fig. 1a). Sequence analysis of the 1,632-bp 5'-flanking region ($-1,540$ to $+92$ bp relative to the transcription start site) carried out using the MatInspector program (Cartharius et al. 2005) revealed several putative transcription factor binding sites in the proximal promoter



B

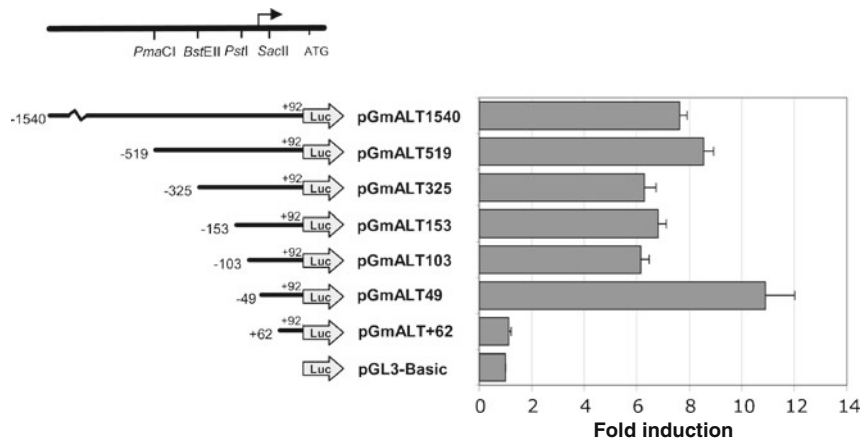


Fig. 1 Sequence analysis of the 5' flanking region of mALT gene and deletion analysis and promoter activity of the 5'-flanking region of *S. aurata* mALT gene in HEK293 cells. **a** Sequence analysis of the 5'-flanking region of the *S. aurata* mALT gene. The upstream sequence isolated by chromosome walking is shown in *capitals*. The *arrow* indicates the transcription start site. The translation start codon ATG is in *boldface* and *underlined*. Several putative binding sites for transcription factors are *boxed*. **b** The top left part represents genomic organization of the 5'-flanking region of *S. aurata* mALT gene.

Relevant restriction sites are indicated. Nucleotide numbering starts with +1, corresponding to the transcription initiation site. The *S. aurata* mALT promoter fragments having varying 5' ends and an identical 3'-end (+92) were fused to the luciferase reporter gene in pGL3-basic vector. The constructs were transfected into HEK293 cells along with CMV- β to normalize for transfection efficiency. Luciferase activity is expressed as a fold increase over promoterless reporter plasmid pGL3-basic. Results presented are the mean \pm SD from four independent experiments performed in duplicate

region (Fig. 1a). The nucleotide sequence of the *S. aurata* mALT gene promoter was submitted to the DDBJ/ EMBL/ GeneBank databases under accession number DQ114990.

Identification of *S. aurata* mALT Promoter

To determine whether the 5'-flanking region of the mALT gene contains promoter activity, the isolated 1,632-bp

fragment was subcloned into the promoterless plasmid pGL3-Basic, upstream of the luciferase reporter gene. HEK293 cells were transiently cotransfected with pGmALT1540 and a lacZ-containing plasmid, which was used as an internal control for transfection efficiency. The cell lysate was assayed for luciferase and β -galactosidase activity 16 h after transfection. The pGmALT1540 construct exhibited an 8-fold increase in luciferase activity

relative to the promoterless vector, pGL3-Basic (Fig. 1b). This result indicates that the region comprised within 1,540 nucleotides upstream from the transcription start site of *S. aurata* mALT contains the core promoter for the basal transcription of mALT.

To further examine the functional regions involved in modulation of basal mALT expression in *S. aurata*, a sequential 5'-deletion analysis of the promoter fragment was carried out. The deleted fragments, with 5' ends ranging from -1540 to +62 and 3' ends at +92, were fused to the luciferase reporter gene and transfected into HEK293 cells. The expression induction of pGmALT519, pGmALT325, pGmALT153, pGmALT103, and pGmALT49 was between 6- and 11-fold compared with the empty vector. However, no induction of activity was found using the smallest construct (pGmALT+62). These findings indicate that the minimal core promoter of the *S. aurata* mALT gene is located within 49 bp upstream from the transcriptional start, which suggests that *cis*-acting elements may be located in this region. Due to the fact that the promoter sequence of piscine mALT has several putative HNF4 α boxes and that HNF4 α is involved in transcriptional regulation of several amino acid metabolism regulatory enzymes (Monaci et al. 1988; Nitsch et al. 1993; Inoue et al. 2002), this study was focused on the effect of HNF4 α on the promoter activity of *S. aurata* mALT.

Molecular Cloning of *S. aurata* cDNA Encoding HNF4 α

A 2,341-bp cDNA encoding HNF4 α transcription factor from the kidney of *S. aurata* was isolated using RT-PCR and RACE PCR techniques. The nucleotide sequence reported for HNF4 α has been deposited in the DDBJ, EMBL and GenBank Nucleotide Sequence Databases under the accession number FJ360721. The 2,341-bp HNF4 α cDNA contains a 1,365-bp open reading frame (ORF). The initial ATG of the ORF is surrounded by a consensus sequence for initiation of transcription in vertebrates (Kozak 1996). A consensus polyadenylation-like signal (AATAAA) was found 20 bp upstream of the HNF4 α poly(A⁺) tail. The deduced amino acid sequence of the cloned HNF4 α predicts a polypeptide of 454 amino acids with a calculated molecular mass of 50.68 kDa. To investigate the evolutionary relationships of HNF4 α in vertebrates, the inferred amino acid sequence of *S. aurata* HNF4 α was compared with those reported for other vertebrates using pair-wise alignments to further generate a phylogenetic tree (Fig. 2a, b). Amongst fish, *S. aurata* HNF4 α showed higher similarity to *Tetraodon nigroviridis* (97% of identity) than to its ortholog from *Danio rerio* (93%). Compared with the peptide sequences from other vertebrates, *S. aurata* HNF4 α shared 83% amino acid identity with mammals, 84% with *Gallus gallus*, and 85% with *Xenopus laevis*.

Tissue Distribution of mALT and HNF4 α in *S. aurata*

qRT-PCR performed on total RNA isolated from several tissues of fed *S. aurata* showed that although mALT is ubiquitously expressed, the higher expression is found in kidney, followed by liver, and intestine. The mALT expression in the kidney, liver, and intestine was ten, five, and four times higher, respectively, than in the spleen (Fig. 3a). The tissue expression profile of HNF4 α shows that is highly expressed in the liver, kidney, and intestine, as described for other species (Sladek et al. 1990; Taraviras et al. 1994) (Fig. 3b).

HNF4 α Transactivates the *S. aurata* mALT Promoter

In silico analysis indicated the presence of several putative HNF4 response elements in the *S. aurata* mALT promoter at nucleotide positions -865 to -845, -411 to -391, and -59 to -39 upstream of the transcription start site (Fig. 1a). To analyze the effect of HNF4 α on the transcriptional activity of mALT gene, transient transfection experiments were performed in HEK293 cells. Reporter constructs containing sequential 5'-deletions on pGmALT1540 were introduced into HEK293 cells together with an expression plasmid encoding rat or *S. aurata* HNF4 α . No difference between rat or *S. aurata* HNF4 α was found in the transcriptional activation of the mALT promoter. Cotransfection of HNF4 α with reporter constructs equal to or longer than pGmALT103 resulted in a 3- to 5-fold induction of the promoter activity relative to the basal activity of the corresponding promoter construct. The shorter reporter construct that exhibited HNF4 α -mediated transactivation (pGmALT103) contained an HNF4 response element at positions -59 to -39, relative to the transcription start site (Fig. 4). No significant enhancement of promoter activity was detected when pGmALT49, pGmALT+62 or the promoterless vector (pGL3-basic) was used. The transfection of HEK293 cells with a reporter construct containing a deletion within the region -103 to -49, (pGmALT1540 Δ 103-49) together with HNF4 α expression vectors, abolished the HNF4 α transactivating effect (Fig. 4).

HNF4 α Binds to the Putative HNF4 Response Element Located at Positions -63 to -39 of the *S. aurata* mALT Promoter

Band shift experiments were carried out to assess whether HNF4 α binds to the putative HNF4 response element at position -63 to -39. Using a probe designed to harbor the putative HNF4 response element (HNF4 α -66/-37) and nuclear extracts from *S. aurata*, one major shifted band was observed. A DNA-protein complex with the same mobility was observed when a consensus HNF4 α probe was used

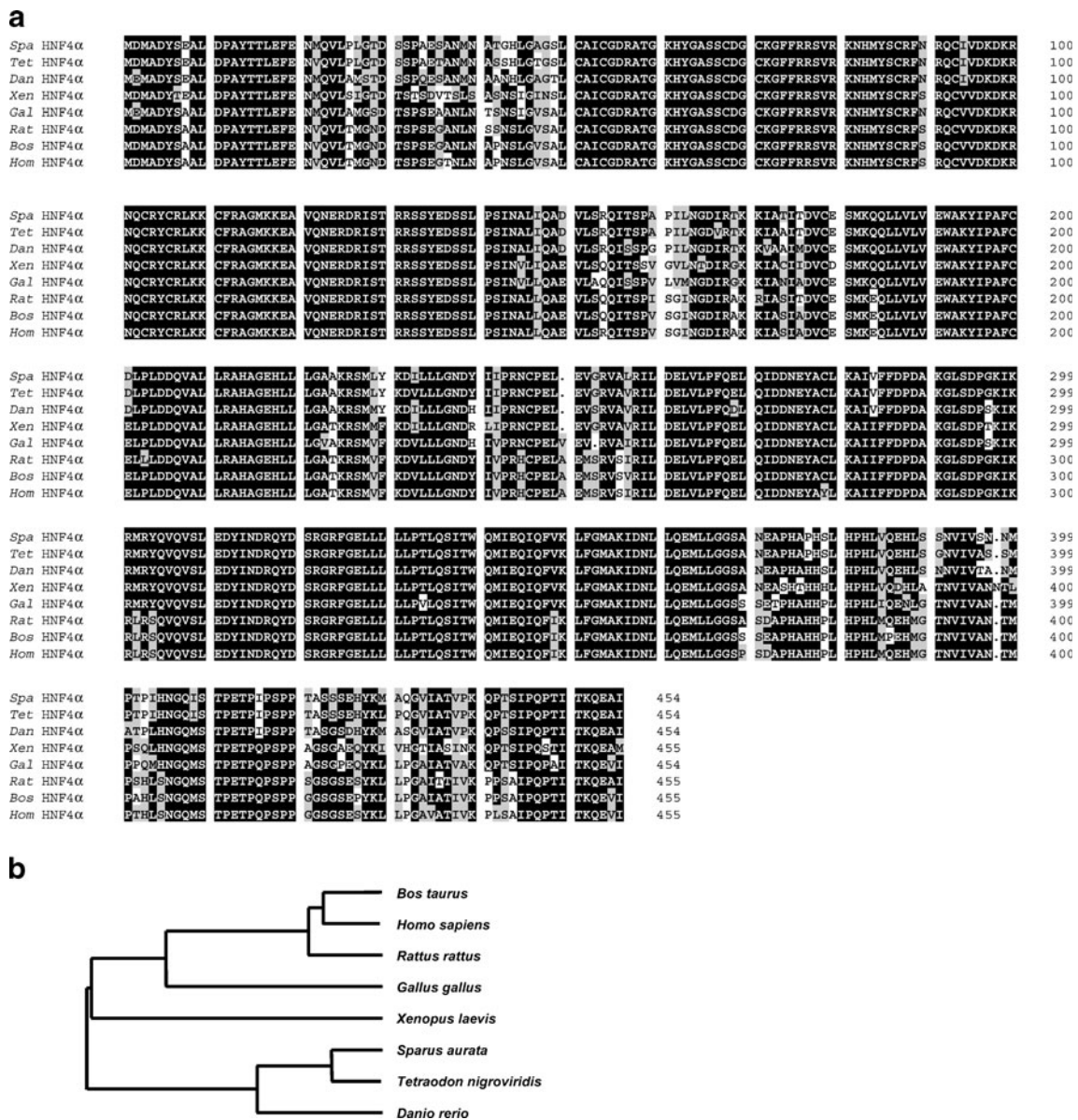


Fig. 2 Multiple alignment and phylogenetic tree of HNF4 α sequences. **a** Multiple alignment of the predicted amino acid sequences for *S. aurata* HNF4 α and those reported for other animals. Alignment was made using ClustalW program. *Black*, identical amino acid residues; *gray*, conservative amino acid substitutions. GenBank entries shown are: *Spa* HNF4 α *Sparus aurata* HNF4 α (FJ360721), *Tet* HNF4 α *Tetraodon nigroviridis* HNF4 α (CAG03838), *Dan* HNF4 α *Danio rerio* HNF4 α (NP 919349), *Xen* HNF4 α *Xenopus laevis* HNF4 α

(CAA85763), *Gal* HNF4 α *Gallus gallus* HNF4 α (NP 001026026), *Rat* HNF4 α *Rattus rattus* HNF4 α (CAA40412), *Bos* HNF4 α *Bos taurus* HNF4 α (NP 001015557), and *Hum* HNF4 α *Homo sapiens* HNF4 α (CAA61133). **b** Phylogenetic tree for HNF4 α . The phylogenetic tree was constructed using the TreeTop phylogenetic tree prediction system (<http://www.genebee.msu.su/services/phtreereduced.html>) based in the multiple alignment

(HNF4 α -cons). Specificity of HNF4 α binding to the HNF4 response element located at position -63 to -39 of the *S. aurata* mALT gene was validated by competition experiments and by using an HNF4 α antibody. The observed shifted band disappeared in competition experiments performed with a 10- to 100-fold molar excess of unlabeled HNF4 α -cons. In addition, the HNF4 α antibody abolished the binding of HNF4 α to the probe (Fig. 5a). These data confirmed that

HNF4 α binds to the HNF4 α box at position -63 to -39 of the *S. aurata* mALT gene.

Additionally, band shift assays were performed to test whether site-directed mutations in the putative HNF4 response element could prevent the formation of the DNA-protein complex. These assays were carried out using nuclear extracts from *S. aurata* and a labeled probe encompassing nucleotide positions -66 to -37 of *S. aurata* mALT but containing a

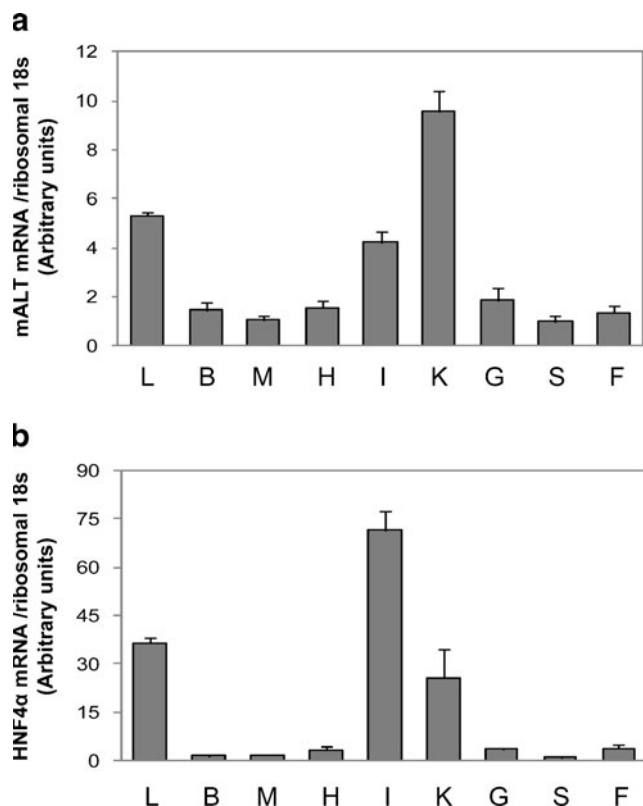


Fig. 3 Tissue distribution of *S. aurata* mALT and HNF4 α . Total RNA obtained from liver (L), brain (B), skeletal muscle (M), heart (H), intestine (I), kidney (K), spleen (S), gill (G), and fat (F) of fed fish was reversely transcribed and submitted to qRT-PCR using specific primer pairs for mALT, HNF4 α , or ribosomal 18s genes. The graph represents mALT (a) or HNF4 α (b) mRNA levels relative to ribosomal 18s mRNA in the same sample \pm SD. Two different samples were analyzed; each sample was a pool of four to five different fish tissue samples. The spleen mALT or HNF4 α mRNA levels relative to ribosomal 18s mRNA were set as 1

mutated HNF4 α box (mALT-66/-37mutHNF4 α). As shown in Fig. 5a, the DNA-protein complex shifted when HNF4 α -cons and HNF4 α -66/-37 probes were used, disappeared when the mALT-66/-37mutHNF4 α probe was used.

Mutating the HNF4 Response Element Abolishes the HNF4 α -Dependent Transactivation of the *S. aurata* mALT Gene

The mutations described for the double-stranded oligonucleotide mALT-66/-37mutHNF4 α used in the band shift assays, were introduced into the promoter construct pGm1540, to generate a reporter construct encompassing a mutated HNF4 response element (pGmALT1540mut). Cotransfection experiments of this construct and the expression vector encoding *S. aurata* HNF4 α were performed in HEK293 cells to assess whether this transcription factor could transactivate mALT gene. As shown in Fig. 5b, introduction of two point mutations in the HNF4 response element located at position -63 to -39 prevented the enhancement of transcriptional activity by *S. aurata* HNF4 α in transient transfection experiments. These results demonstrated that the HNF4 response element, found at position -63 to -39 upstream of the transcriptional start of the *S. aurata* mALT promoter, is responsible for mALT gene transactivation by HNF4 α .

Kinetic Properties of *S. aurata* mALT

S. cerevisiae strain YDR089c was chosen as expression system because it presents a deletion involving the putative

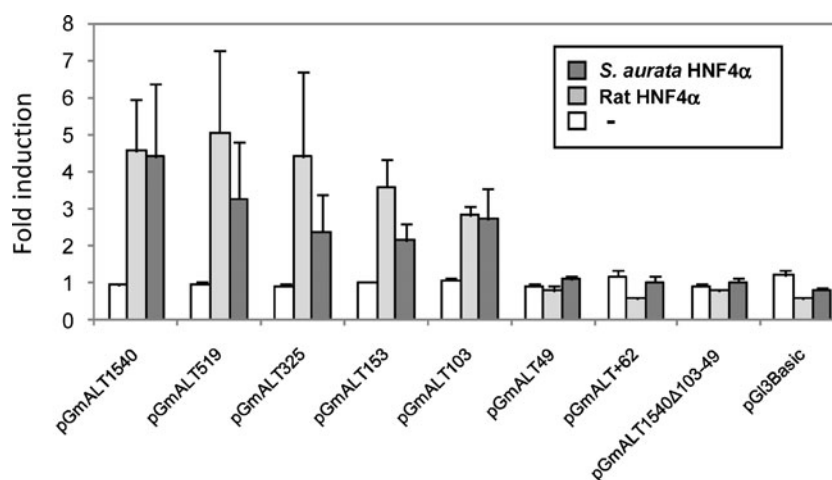


Fig. 4 HNF4 α transactivates *S. aurata* mALT promoter in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with the promoter constructs pGmALT1540, pGmALT1519, pGmALT325, pGmALT153, pGmALT103, pGmALT49, pGmALT+62, pGmALT1540 Δ 103-49, or

pGL3-basic, with or without an expression plasmid encoding either *S. aurata* or rat HNF4 α . The promoter activity for cells transfected with the constructs alone was set as 1. The results presented are mean \pm SD from two independent duplicate experiments

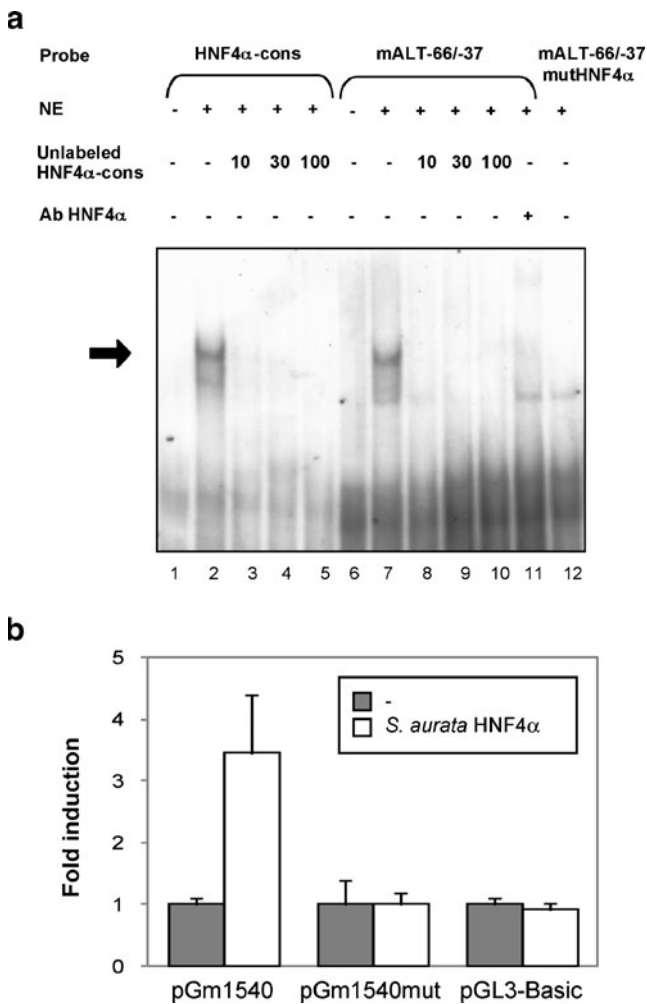


Fig. 5 HNF4 α binds to *S. aurata* mALT promoter. **a** The figure shows an electrophoretic mobility shift assay using nuclear extracts from *S. aurata* (NE) incubated with labeled oligonucleotides HNF4 α -cons (lanes 1–5), mALT-66/-37 (lanes 6–11), or mALT-66/-37mutHNF4 α (lane 12). Lanes 1–6 contained no extract. Lanes 2–7 show binding of nuclear proteins to the labeled probes in the absence of competitor. Lanes 3, 8, 4, 9, 5, and 10 show competition effect with 10-, 30-, and 100-fold molar excess, respectively, of unlabeled double-stranded HNF4 α -cons. Lane 11 shows a supershift assay using nuclear extracts incubated with labeled oligonucleotide mALT-66/-37 in the presence of antibody against HNF4 α (Ab HNF4 α). Lane 12 shows a shift analysis performed with labeled oligonucleotide mALT-66/-37mutHNF4 α incubated in the presence of *S. aurata* nuclear extracts. DNA-protein complexes are indicated by an arrow. **b** Mutations in the HNF4 α box abolish transactivation of mALT promoter by HNF4 α . HEK293 cells were transfected with the promoter constructs pGmALT103, pGmALTmut103, or pGL3-basic, with or without an expression plasmid encoding *S. aurata* HNF4 α . The promoter activity displayed by the constructs alone was set at 1. Results presented are mean \pm SD from two independent duplicate experiments

yeast mitochondrial ALT gene. Enzyme activity and immunodetectable levels of *S. aurata* mALT were analyzed in protein extracts isolated from yeast transformed with pYmALT

expression construct. The production of *S. aurata* protein in yeast transformants was checked by Western blot using a polyclonal antibody against *S. aurata* ALT enzymes. Yeast transformants with pYmALT expressed protein with estimated molecular mass of 54 kDa (Fig. 6a). In yeast expressing mALT, maximal activity was observed at pH 7.22 and 7.65 for the forward and reverse ALT reaction, respectively.

In yeast expressing mALT, ALT specific activity increased in both forward and reverse reaction compared with cells transformed with pYES2, indicating proper overexpression of the mALT enzyme. The ALT activity was 7-fold higher for the forward reaction than that for the reverse reaction (Fig. 6b).

The kinetic plots for mALT activity as a function of L-alanine or 2-oxoglutarate concentration were hyperbolic. As described for ALTs enzymes from other organisms, double-reciprocal plots indicated that the enzymatic reaction follows a ping-pong mechanism (Fig. 7a, b). K_m values estimated for L-alanine was 2.22 and 0.21 mM for 2-oxoglutarate (Table 2).

Considering the reverse reaction, the kinetic plots for mALT were hyperbolic when the activity was represented as a function of L-glutamate or pyruvate. K_m values for L-glutamate and pyruvate were 11.30 and 0.32 mM, respectively (Fig. 7c, d) (Table 2).

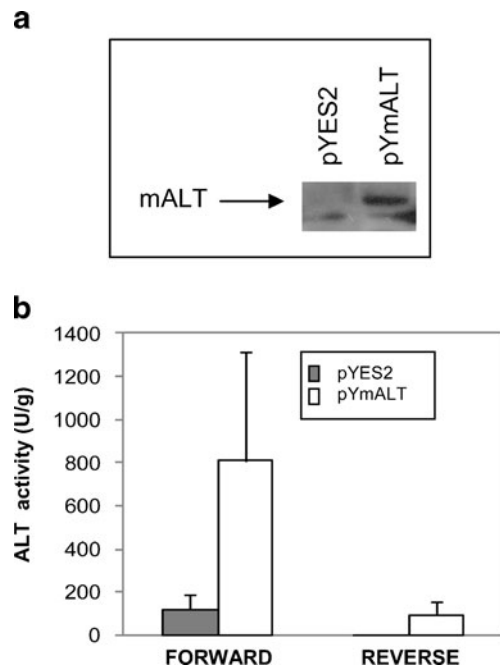


Fig. 6 Expression of mALT in yeast. **a** Immunodetectable level of mALT in protein extracts obtained from yeast grown 24 h at 30 $^{\circ}$ C after transformation with the empty vector (pYES2) or pYmALT. **b** Forward and reverse ALT enzyme activities were determined with the desalted protein extracts from yeast expressing the empty vector (pYES2) or pYmALT. Data are expressed as mean \pm SD of values corresponding to four to six desalted yeast protein extracts

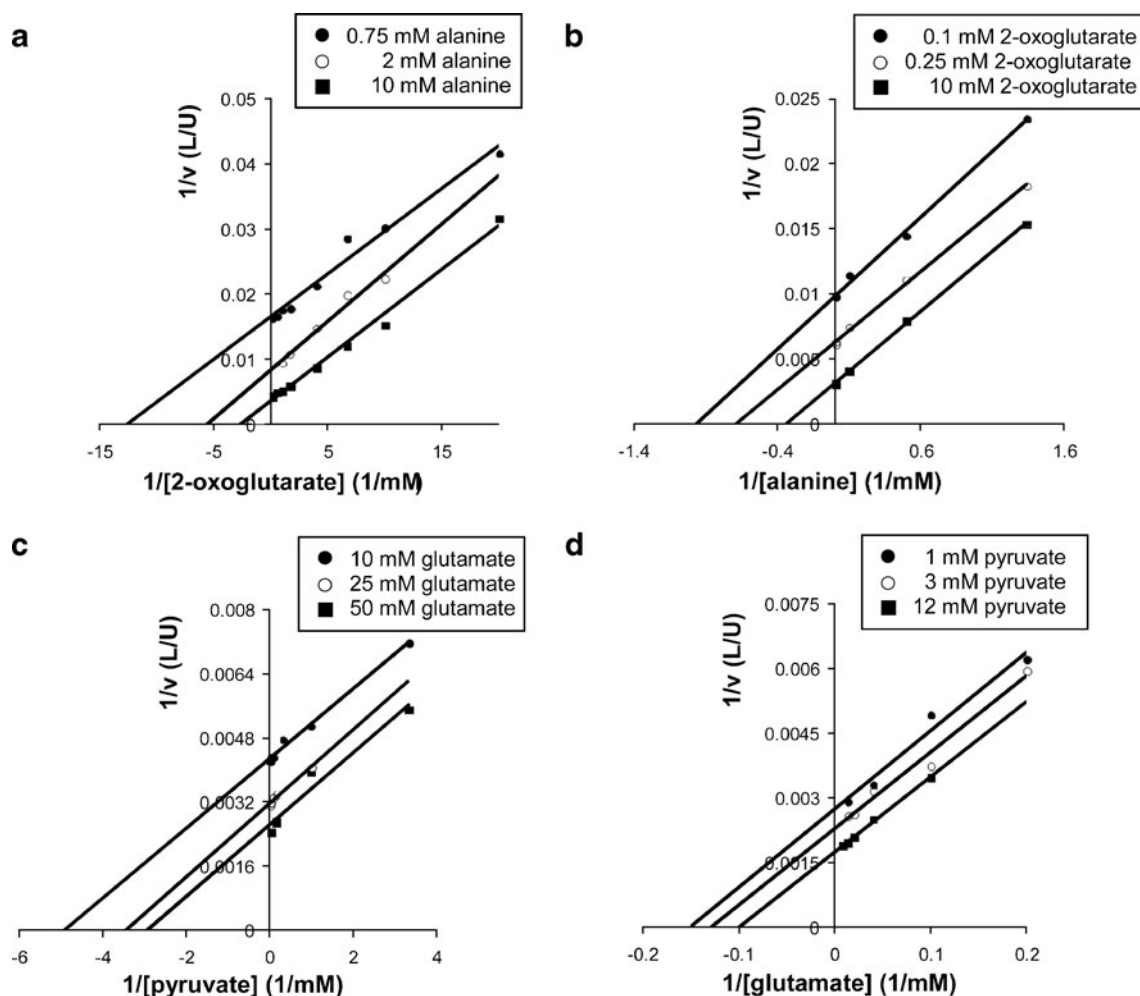


Fig. 7 Kinetics for 2-oxoglutarate, L-alanine, pyruvate and L-glutamate of *S. aurata* mALT. **a** Saturation kinetics for 2-oxoglutarate of mALT. ALT activity was assayed (forward reaction) by varying 2-oxoglutarate levels in the presence of 0.75 mM (filled circles), 2 mM (empty circles), or 10 mM (filled squares) L-alanine. **b** Saturation kinetics for L-alanine of mALT. ALT activity was assayed (forward reaction) by varying L-alanine levels in the presence of 0.1 mM (filled circles), 0.25 mM (empty circles), or 10 mM (filled squares) 2-oxoglutarate. **c** Saturation kinetics for pyruvate of mALT.

ALT activity was assayed (reverse reaction) by varying pyruvate levels in the presence of 10 mM (filled circles), 25 mM (empty circles), or 50 mM (filled squares) L-glutamate. **d** Saturation kinetics for L-glutamate of mALT. ALT activity was assayed (reverse reaction) by varying L-glutamate levels in the presence of 1 mM (filled circles), 3 mM (empty circles), or 12 mM (filled squares) pyruvate. Double-reciprocal plots are representative of experiments performed with two different protein extracts isolated from yeast expressing mALT

Nutritional and Hormonal Regulation of mALT and HNF4 α Gene Expression in the Kidney of *S. aurata*

Having concluded that HNF4 α binds to and transactivates the mALT promoter, we studied its role in the transcriptional expression of mALT in kidney under different nutritional and hormonal conditions. In 18-day-starved fish, qRT-PCR assays revealed that the mALT mRNA levels significantly decreased up to 44% of the values found in control fish (Fig. 8a). Consistent with these results, the HNF4 α mRNA levels showed also a tendency to decrease in starved animals (Fig. 8b).

Streptozotocin (STZ), a glucosamine-nitrosourea derivative that causes β -cell necrosis, is widely used to generate diabetic animal models (Junod et al. 1969; Wilson and Leiter 1990). As previously showed, 30 h after intraperitoneal administration of STZ to *S. aurata*, glycaemia increased 2-fold compared with fish administered saline, meanwhile treatment with insulin reduced the glycaemia levels (Anemaet et al. 2008). In the present study, qRT-PCR analysis performed on kidney of STZ-treated fish, indicated that mALT and HNF4 α mRNA levels were 3.4- and 5.8-fold lower, respectively, compared with control fish (Fig. 8c, d). However, both mALT and HNF4 α mRNA remained unchanged in insulin-treated fish (Fig. 8c, d).

Table 2 Kinetic parameters of *Sparus aurata* mALT

Forward reaction	
K_m Ala (mM)	2.22±0.221
K_m 2-Oxo (mM)	0.21±0.036
V_{max} (μmol/(min/g))	402.54±67.56
V_{max}/K_m Ala	0.182
V_{max}/K_m 2-Oxo	1.890
Reverse reaction	
K_m Glu (mM)	11.30±2.651
K_m Pyr (mM)	0.32±0.169
V_{max} (μmol/(min/g))	533.76±21.5
V_{max}/K_m Glu	0.047
V_{max}/K_m Pyr	1.678

Protein extracts from *S. cerevisiae* strain YDR089c expressing *S. aurata* mALT were assayed for ALT activity at various substrate and cosubstrate concentrations to calculate K_m and V_{max} values. The results presented are the mean±standard deviation of experiments performed at least with two different enzyme preparations

Discussion

HNF4α plays a key role for the accurate expression of genes involved in amino acid and protein metabolism (Monaci et al. 1988; Kimura et al. 1993; Inoue et al. 2002). There is evidence that HNF4α gene expression is reduced in the kidney of patients with diabetic nephropathy (Niehof and Borlak 2008) and abnormal mitochondrial metabolism and HNF4α dysfunction lead to insulin-resistant states (Mohlke and Boehnke 2005; MacDonald et al. 2009). Mitochondria are becoming increasingly important because of their central role in cell energy balance. In this regard, ALT plays an important function as a molecular link between carbohydrate and amino acid metabolism. Our previous studies reported the first animal amino acid sequence of a mitochondrial ALT (Metón et al. 2004). In humans and mice, two ALT isoforms, ALT1 and ALT2, each encoded by a different gene, have been cloned (Sohocki et al. 1997; Yang et al. 2002; Jadhao et al. 2004). The human ALT1 gene was cloned from the amino acid sequence of liver cytosolic ALT. The subcellular localization of ALT2 was

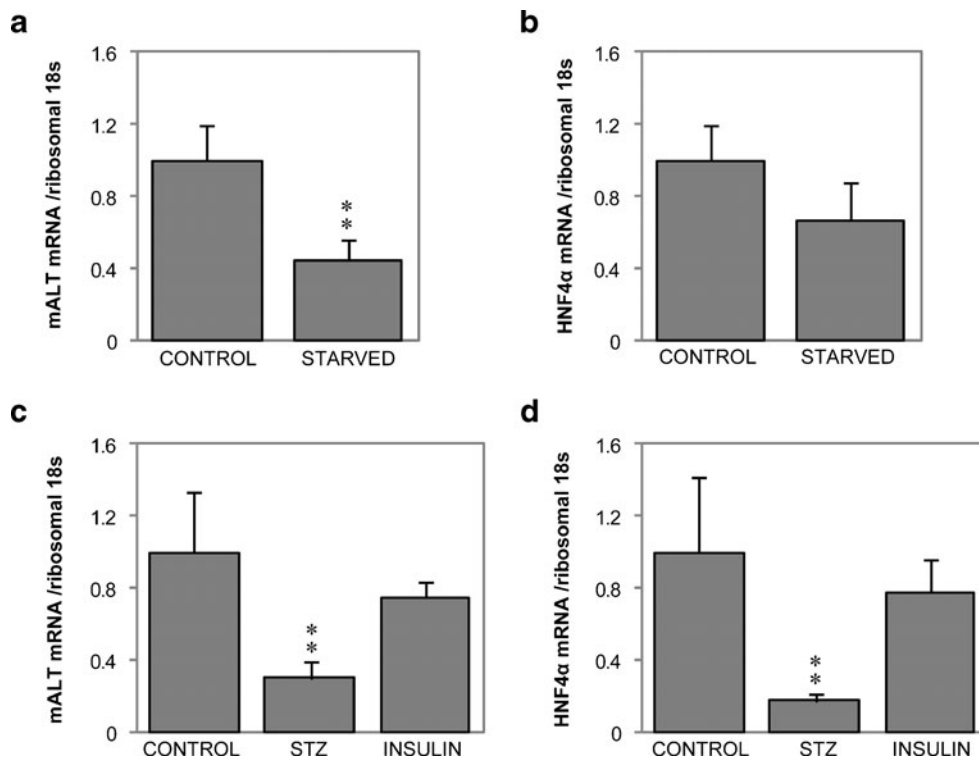


Fig. 8 Effect of different nutritional and hormonal conditions on mALT and HNF4α mRNA expression in kidney of *S. aurata*. Effect of starvation on mALT (a) and HNF4α (b) mRNA levels in kidney of *S. aurata*. The average of three independent qRT-PCR assays performed on total RNA isolated from kidney of fed and 19-day-starved fish is shown. mALT and HNF4α mRNA levels relative to ribosomal 18s mRNA are expressed as mean±SD of four pools of two to three kidney samples. Effect of insulin and streptozotocin on mALT (c) and HNF4α

(d) mRNA levels in kidney of *S. aurata*. Average value of three independent real-time PCR assays performed on total RNA isolated from kidney of fish 6 h after treatment with saline (control), insulin (10 U/kg fish) or 30 h after treatment with streptozotocin (600 mg/kg fish) is shown. mALT and HNF4α mRNA levels relative to ribosomal 18s mRNA are expressed as mean±SD of four pools of two to three kidney samples. Statistical significance related to control animals is indicated as follows: ** $p < 0.01$

reported to have mitochondrial localization (Glinghammar et al. 2009). In the present study, we have characterized the expression of HNF4 α and analyzed its effect on the transcriptional control of mALT gene in the kidney of *S. aurata*. We report for the first time the characterization of the promoter region of a mitochondrial ALT gene and the involvement of HNF4 α in the transcription of this gene. In addition, we report kinetic data for mALT enzyme and studied the influence of different hormonal and nutritional conditions on mALT and HNF4 α expression in the kidney of *S. aurata*.

To study the transcriptional regulation of mALT, we isolated and characterized the promoter region of mALT from *S. aurata*. The functionality of the putative promoter region of fish mALT was tested by transient transfection of human kidney-derived HEK293 cells. Cells were transfected with fusion constructs containing sequential 5'-deletions of the 1,632-bp fragment promoter isolated by chromosome walking. We found that the promoter region within 49 bp upstream from the transcription start site was essential for transcriptional basal activity of mALT and therefore constitutes the core promoter of this gene. Due to the presence of several putative HNF4 binding sites and the fact that there is increasing evidence for the involvement of HNF4 α in the transcriptional control of several regulatory enzymes of protein metabolism (Nitsch et al. 1993; Nishiyori et al. 1994), we considered that HNF4 α could play a role in the transcriptional control of mALT gene.

A cDNA encoding the HNF4 α transcription factor protein was isolated from kidney of *S. aurata*. The 454-amino acid deduced protein is homologous to the human HNF4 α 1 isoform. A comparison of the HNF4 α sequence from *S. aurata* to that reported for other vertebrates revealed a high degree of conservation among fish, amphibians, birds, and mammals. All residues reported as being important for the structure and function of AF-1, AF-2, and LBD domains were fully conserved in *S. aurata* HNF4 α (Green et al. 1998; Kistanova et al. 2001; Eeckhoutte et al. 2003b; Aggelidou et al. 2004; Iordanidou et al. 2005). The results of the phylogenetic tree analysis are consistent with the taxonomic hierarchy. Regarding teleost fish, *S. aurata* and *T. nigroviridis* belong to the same superorder (Acanthopterygii), while *D. rerio* belongs to the superorder Ostariophysi. Moreover, our finding that, in *S. aurata* HNF4 α is mainly expressed in the kidney, liver, and intestine is consistent with the tissue distribution found in humans and rats (Sladek et al. 1990; Taraviras et al. 1994). The *S. aurata* tissue distribution of HNF4 α correlated with that observed for mALT.

In this study, we demonstrated that HNF4 α interacts specifically with the HNF4 response element located between -63 and -39 bp upstream from the transcription start site of the *S. aurata* mALT gene promoter. Transient

transfection studies carried out in HEK293 cells allowed us to demonstrate that HNF4 α confers an activating signal by binding to an HNF4 response element in the *S. aurata* mALT promoter. Mutations in the HNF4 α box abolished binding of HNF4 α to the mutated site, and as a result, HNF4 α did not longer enhance the transcription of mALT gene. Furthermore, introduction of the same mutations into the pGm1540 construct, abolished the transcriptional activation induced by HNF4 α . These findings confirm that HNF4 α transactivates the mALT promoter. Similarly, HNF4 α has been reported to transactivate other genes involved in amino acid and protein metabolism such as tyrosine aminotransferase, ornithine aminotransferase, and alpha 1-antitrypsin (Monaci et al. 1988; Kimura et al. 1993; Inoue et al. 2002). Interestingly, HNF4 α did not enhance the transcriptional activity of the previously cloned *S. aurata* cALT promoter (Anemaet et al. 2010) in HEK293 cells (data not shown), which suggest that HNF4 α exerts a specific effect on the mALT gene.

Kinetic characterization of *S. aurata* mALT indicates that this enzyme follows a ping-pong mechanism, as previously described for other ALT isoenzymes. The K_m values for L-alanine, 2-oxoglutarate, L-glutamate, and pyruvate of *S. aurata* mALT are in the range of those described for mitochondrial ALT in other animals (Swick et al. 1965; Hayashi (1993); Glinghammar et al. 2009). Possibly mALT would preferably catalyze the forward reaction as the V_{max}/K_m ratio for L-alanine was higher than that for L-glutamate. Moreover, values of ALT activity for the forward reaction were 7-fold higher than for the reverse reaction. Similar as in *S. aurata*, the kinetics studies of mALT in gill of the brackish-water bivalve *Corbicula japonica* lead Hayashi (1993) to the observation that mALT activity preferentially catalyzes the reaction in the pyruvate-forming direction. The same relationships were obtained for rat liver (Swick et al. 1965; Walker and Barrett 1991). The main difference between kinetics for cytosolic and mitochondrial *S. aurata* ALT isoforms was found in the K_m value for 2-oxoglutarate which was 4-fold higher for mALT. However, if this kinetic feature has a consequence in the direction of the reaction or if it results from a putative difference in the 2-oxoglutarate concentration between cytosol and mitochondria remains unknown.

Amino acids are important substrates in the fish kidney for both oxidation and gluconeogenesis (Jürss and Bastrop 1995). The rate of oxidation of alanine was reported to be more than 10-fold higher than the rate of incorporation into glucose in Atlantic salmon kidney (Mommsen et al. 1985). To understand the role of mALT and HNF4 α gene in the kidney of *S. aurata*, we addressed the nutritional and hormonal regulation of both proteins at the mRNA level. Our results revealed that starvation resulted in decreased levels of mALT and HNF4 α in kidney of *S. aurata*.

Recently, Anemaet et al. (2008) have shown that the mRNA levels of cALT1 also decreased in liver of *S. aurata* submitted to starvation. In liver, decreased ALT activity was reported in starved fish (Metón et al. 1999). Viollet et al. (1997), in studies carried out with L-type pyruvate kinase, showed that HNF4 DNA binding activity in nuclear extracts of fasted rat liver was markedly reduced in comparison with that of refeed rat liver. Consistent with downregulation of mALT expression in starvation, STZ-treatment, a nutritional condition associated with gluconeogenesis, caused a decrease in mALT and HNF4 α mRNA levels. Similarly, Niehof and Borlak (2008) also reported a decrease of HNF4 α expression in kidney of STZ-treated rats. Since downregulation of HNF4 α expression correlated with low mRNA levels of mALT in the kidney of starved and STZ-treated *S. aurata*, our findings point to an important role of HNF4 α in the transcriptional regulation of mALT gene. Moreover, these observations suggest that the expression of mALT in the kidney might be mainly involved in the oxidation of amino acids for energetic purposes instead of gluconeogenesis.

In conclusion, besides reporting the first mALT promoter, our results indicate that HNF4 α plays an important role in the transcriptional regulation of mALT gene in kidney of starved and STZ-treated *S. aurata*. We hypothesize that mALT exerts a major role in oxidizing dietary amino acids. With the aim of increasing the protein sparing effect and the use of alternative nutrients in the diet supplied to carnivorous fish in culture, future studies will be addressed to analyze the metabolic effects after overexpression or downregulation of ALT isoforms.

Acknowledgments This work was supported by the MCYT (Spain) BIO2006-01857 and MICINN (Spain) BIO2009-07589 grants.

References

- Aggelidou E, Iordanidou P, Tsantili P, Papadopoulos G, Hadzopoulou-Cladaras M (2004) Critical role of residues defining the ligand binding pocket in hepatocyte nuclear factor-4 α . *J Biol Chem* 279:30680–30688
- Andrews NC, Faller DV (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19:2499
- Anemaet IG, Metón I, Salgado MC, Fernández F, Baanante IV (2008) A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2833–2844
- Anemaet IG, González JD, Salgado MC, Giral M, Fernández F, Baanante IV, Metón I (2010) Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol* 45:119–132
- Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bar-Tana J, Walker MD (2002) Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 α . *J Biol Chem* 277:25914–25919
- Bradford MM (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
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21:2933–2942
- Cowey CB, Walton MJ (1989) Intermediary metabolism. In: Halver JE (ed) *Fish Nutrition*. Academic, San Diego
- De Rosa G, Swick RW (1975) Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem* 250:7961–7967
- Duda K, Chi YI, Shoelson SE (2004) Structural basis for HNF-4 α activation by ligand and coactivator binding. *J Biol Chem* 279:23311–23316
- Eeckhoutte J, Moerman E, Bouckennooghe T, Lukoviak B, Pattou F, Formstecher P, Kerr-Conte J, Vandewalle B, Laine B (2003a) Hepatocyte nuclear factor 4 α isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology* 144:1686–1694
- Eeckhoutte J, Oxombre B, Formstecher P, Lefebvre P, Laine B (2003b) Critical role of charged residues in helix 7 of the ligand binding domain in hepatocyte nuclear factor 4 α dimerisation and transcriptional activity. *Nucleic Acids Res* 31:6640–6650
- Fernández F, Miquel AG, Córdoba M, Varas M, Metón I, Caseras A, Baanante IV (2007) Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J Exp Mar Biol Ecol* 343:1–10
- Fynn-Aikins K, Hughes SG, Vandenberg GW (1995) Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 111:163–170
- Garrison WD, Battle MA, Yang C, Kaestner KH, Sladek FM, Duncan SA (2006) Hepatocyte nuclear factor 4 α is essential for embryonic development of the mouse colon. *Gastroenterology* 130:1207–1220
- Glinghammar B, Rafter I, Lindström AK, Hedberg JJ, Andersson HB, Lindblom P, Berg AL, Cotgreave I (2009) Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med* 23:621–631
- Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong EG, Fisch S, Haldar S, Cline GW, Kim JK, Peroni OD, Kahn BB, Jain MK (2007) Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. *Cell Metab* 5:305–312
- Green VJ, Kokkotou E, Ladas JA (1998) Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem* 273:29950–29957
- Gupta RK, Vatamaniuk MZ, Lee CS, Flaschen RC, Fulmer JT, Matschinsky FM, Duncan SA, Kaestner KH (2005) The MODY1 gene HNF-4 α regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest* 115:1006–1015
- Gupta RK, Gao N, Gorski RK, White P, Hardy OT, Rafiq K, Brestelli JE, Chen G, Stoekert CJ Jr, Kaestner KH (2007) Expansion of adult beta-cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4 α . *Genes Dev* 21:756–769
- Hadzopoulou-Cladaras M, Kistanova E, Evagelopoulou C, Zeng S, Cladaras C, Ladas JA (1997) Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem* 272:539–550
- Hayashi YS (1993) Alanine aminotransferase from gill tissue of the brackish-water bivalve *Corbicula japonica* (Prime): subcellular

- localization and some enzymatic properties. *J Exp Mar Biol Ecol* 170:45–54
- Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ (2001) Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21:1393–1403
- Hemre GI, Mommsen T, Krogdahl Å (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac Nutr* 8:175–194
- Inoue Y, Hayhurst GP, Inoue J, Mori M, Gonzalez FJ (2002) Defective ureagenesis in mice carrying a liver-specific disruption of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). HNF4alpha regulates ornithine transcarbamylase in vivo. *J Biol Chem* 277:25257–25265
- Iordanidou P, Aggelidou E, Demetriades C, Hadzopoulou-Cladaras M (2005) Distinct amino acid residues may be involved in coactivator and ligand interactions in hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Biol Chem* 280:21810–21819
- Jadhao SB, Yang RZ, Lin Q, Hu H, Anania FA, Shuldiner AR, Gong DW (2004) Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology* 39:1297–1302
- Jiang G, Sladek FM (1997) The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha. *J Biol Chem* 272:1218–1225
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48:2129–2139
- Jürss K, Bastrop R (1995) Amino acid metabolism in fish. *Biochem Mol Biol Fishes* 4:159–189
- Kardassis D, Falvey E, Tsantili P, Hadzopoulou-Cladaras M, Zannis V (2002) Direct physical interactions between HNF-4 and Sp1 mediate synergistic transactivation of the apolipoprotein CIII promoter. *Biochemistry* 41:1217–1228
- Kimura A, Nishiyori A, Murakami T, Tsukamoto T, Hata S, Osumi T, Okamura R, Mori M, Takiguchi M (1993) Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4). *J Biol Chem* 268:11125–11133
- Kistanova E, Dell H, Tsantili P, Falvey E, Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M (2001) The activation function-1 of hepatocyte nuclear factor-4 is an acidic activator that mediates interactions through bulky hydrophobic residues. *Biochem J* 356:635–642
- Kozak M (1996) Interpreting cDNA sequences: Some insights from studies on translation. *Mammalian Genome* 7:563–574
- Li J, Ning G, Duncan SA (2000) Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* 14:464–474
- Macdonald M, Longacre M, Langberg EC, Tibell A, Kendrick M, Fukao T, Ostenson CG (2009) Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 52:1087–1091
- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F, Baanante IV (1999) Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 82:223–232
- Metón I, Egea M, Fernández F, Eraso MC, Baanante IV (2004) The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Lett* 566:251–254
- Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F, Baanante IV (2006) Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* 147:3446–3456
- Miura A, Yamagata K, Kakei M, Hatakeyama H, Takahashi N, Fukui K, Nammo T, Yoneda K, Inoue Y, Sladek FM, Magnuson MA, Kasai H, Miyagawa J, Gonzalez FJ, Shimomura I (2006) Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 281:5246–5257
- Mohlke KL, Boehnke M (2005) The role of HNF4A variants in the risk of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 5:149–156
- Mommsen TP, Walsh PJ, Moon TW (1985) Gluconeogenesis in hepatocytes and kidney of Atlantic salmon. *Mol Physiol* 8:89–100
- Monaci P, Nicosia A, Cortese R (1988) Two different liver-specific factors stimulate in vitro transcription from the human alpha 1-antitrypsin promoter. *EMBO J* 7:2075–2087
- Moon TW (2001) Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129:243–249
- Niehof M, Borlak J (2008) HNF4 α and the Ca-channel TRPC1 are novel disease candidate genes in diabetic nephropathy. *Diabetes* 57:1069–1077
- Nishiyori A, Tashiro H, Kimura A, Akagi K, Yamamura K, Mori M, Takiguchi M (1994) Determination of tissue specificity of the enhancer by combinatorial operation of tissue-enriched transcription factors. Both HNF-4 and C/EBP beta are required for liver-specific activity of the ornithine transcarbamylase enhancer. *J Biol Chem* 269:1323–1331
- Nitsch D, Boshart M, Schutz G (1993) Activation of the tyrosine aminotransferase gene is dependent on synergy between liver-specific and hormone-responsive elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5479–5483
- Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA (2003) Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 34:292–296
- Salgado MC, Metón I, Egea M, Baanante IV (2004) Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *J Mol Endocrinol* 33:783–795
- Sánchez-Muros MJ, García-Rejón L, García-Salguero L, De La Higuera M, Lupiáñez JA (1998) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int J Biochem Cell Biol* 30:55–63
- Schiestl R, Gietz R (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16:339–346
- Schrem H, Klempnauer J, Borlak J (2002) Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev* 54:129–158
- Sladek FM, Seidel SD (2001) Hepatocyte nuclear factor 4 alpha. In: Burris T, McCabe ERB (eds) *Nuclear receptors and disease*. Academic, London
- Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE Jr (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4:2353–2365
- Sohocki MM, Sullivan LS, Harrison WR, Sodergren EJ, Elder FFB, Weinstock G, Tanase S, Daiger SP (1997) Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites. *Genomics* 40:247–252
- Stoffel M, Duncan SA (1997) The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13209–13214

- Swick RW, Barnstein PL, Stange JL (1965) The metabolism of mitochondrial proteins. I. Distribution and characterization of the isozymes of alanine aminotransferase in rat liver. *J Biol Chem* 240:3334–3340
- Taraviras S, Monaghan AP, Schutz G, Kelsey G (1994) Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 48:67–79
- Thulin P, Rafter I, Stockling K, Tomkiewicz C, Norjavaara E, Aggerbeck M, Hellmold H, Ehrenborg E, Andersson U, Cotgreave I, Glinghammar B (2008) PPARalpha regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 231:1–9
- Viollet B, Kahn A, Raymondjean M (1997) Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol* 17:4208–4219
- Walker J, Barrett J (1991) Studies on alanine aminotransferase in nematodes. *Int J Parasitol* 21:377–380
- Wilson GL, Leiter EH (1990) Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* 156:27–54
- Yang R-Z, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR, Gong D-W (2002) cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* 79:445–450

Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb

Ida G Anemaet, Juan Diego González, María C Salgado, Marina Giral, Felipe Fernández¹, Isabel V Baanante and Isidoro Metón

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

¹Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

(Correspondence should be addressed to I Metón; Email: imeton@ub.edu)

Abstract

Alanine aminotransferase (Alt) provides a molecular link between carbohydrate and amino acid metabolism. In the cell context, the predominant Alt isozyme is located in the cytosol. To gain insight into the transcriptional regulation of the cytosolic *alt* gene (*calt*), we cloned and characterized the *calt* promoter from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Transient transfection of sea bass larvae cells with deleted *calt* promoter constructs and electrophoretic mobility shift assays allowed us to identify p300 and c-Myb as new factors in the transcriptional regulation of *calt* expression. Transfection studies carried out with an acetylase-deficient mutant p300 (p300DY) revealed that the acetyltransferase activity of p300 is essential for the p300-mediated transcriptional activation of *S. aurata calt*. We had previously found up-regulation of liver cAlt2, an alternatively spliced isoform of *calt*, under gluconeogenic conditions and in streptozotocin (STZ)-treated *S. aurata*. Quantitative RT-PCR assays showed that increased p300 and c-Myb mRNA levels in the liver of starved *S. aurata* contribute to enhancing the transcription of cAlt2. Consistently, the administration of insulin decreased both p300 and c-Myb expression. The mRNA levels of p300 and c-Myb were also analyzed in the liver of STZ-induced diabetic *S. aurata*. Treatment with STZ increased the expression of p300, whereas it decreased c-Myb. Our findings suggest an involvement of p300 and c-Myb in up-regulation of cAlt2 in the liver of *S. aurata* under starvation. In addition, these results provide evidence for a role of p300 in diabetes.

Journal of Molecular Endocrinology (2010) **45**, 119–132

Introduction

Alanine aminotransferase (Alt, glutamate pyruvate transaminase, EC 2.6.1.2) is a pyridoxal enzyme that catalyzes the reversible transamination between α -L-alanine and α -ketoglutarate to form pyruvate and L-glutamate. By mediating the conversion of these four major intermediate metabolites, Alt provides a molecular link between carbohydrate and amino acid metabolism.

Alt activity in serum is clinically used as a marker of liver integrity or hepatocellular damage; Alt activity is significantly raised in a variety of hepatic injury conditions, including hepatitis, cirrhosis, and drug hepatotoxicity (Dufour *et al.* 2000, Glinghammar *et al.* 2009). Increased Alt activity is observed in rat liver after high protein intake, fasting, and administration of cortisol, and it is also observed in diabetic animals (Rosen *et al.* 1959). Furthermore, β -adrenergic agonists, such as epinephrine, glucagon, and norepinephrine, induce hepatic Alt activity in rats (Begum & Datta 1992).

Recent studies have associated high levels of Alt activity with pathologies such as obesity, muscle diseases, type 1 diabetes, coronary atherosclerotic

disease, and metabolic syndrome (Nathwani *et al.* 2005, Wannamethee *et al.* 2005, West *et al.* 2006, Iacobellis *et al.* 2007, Schindhelm *et al.* 2007). In addition, a rise of serum Alt activity within the reference values in healthy populations is considered a marker for the development of insulin resistance and type 2 diabetes (Vozarova *et al.* 2002, Hanley *et al.* 2004, West *et al.* 2006, Sattar *et al.* 2007).

Two Alt isoforms, ALT1 and ALT2, each encoded by a different gene, have been cloned from humans and mice (Sohocki *et al.* 1997, Yang *et al.* 2002, Jadhao *et al.* 2004). Human *ALT1* gene was cloned based on the amino acid sequence of liver cytosolic ALT (cAlt; Ishiguro *et al.* 1991), and mapped to human chromosome 8q24.3 (Sohocki *et al.* 1997). Yang *et al.* (2002) cloned another human ALT isozyme, ALT2, and mapped this gene to chromosome 16q12.1. Mouse *Alt1* and *Alt2* genes were mapped to chromosomes 15 and 8 respectively (Jadhao *et al.* 2004). Western blotting indicates that human ALT1 is mainly expressed in liver, skeletal muscle, kidney, and, to a lesser extent, in heart, whereas ALT2 is mainly expressed in heart and skeletal muscle. Immunoprecipitation assays demonstrate that ALT1 is the

major isoform expressed in human liver and quantitatively the most important Alt isozyme contributing to basal circulating levels of Alt activity in humans (Lindblom *et al.* 2007).

The hepatic activity of Alt is considered a good indicator of protein utilization in fish (Fynn-Aikins *et al.* 1995, Sanchez-Muros *et al.* 1998, Metón *et al.* 1999). In the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), Alt activity decreases following starvation, and is more sensitive than aspartate aminotransferase to changes in diet composition and ration size (Metón *et al.* 1999, Fernández *et al.* 2007). We cloned and reported the subcellular localization of *S. aurata* liver cytosolic (cAlt, homologous to mammalian ALT1) and mitochondrial (mAlt, homologous to mammalian ALT2) Alt isoforms. Expression of mAlt as a C- or N-terminal fusion with the enhanced green fluorescent protein in CHO cells allowed us to demonstrate that the mAlt N-terminus contains a mitochondrial targeting signal that directs the protein into the mitochondria. The primary structure of mAlt was the first amino acid sequence reported for a mitochondrial Alt in animals (Metón *et al.* 2004). A recent study by Yang *et al.* (2009) has indicated that the rat liver ALT2 isoform is likely to contain an N-terminal mitochondrial targeting signal, and has showed by western blotting that ALT2 is present in mitochondrial fractions. In a recent report, we showed that the *S. aurata calt* gene generates two cytosolic transcripts by alternative splicing: cAlt1 and cAlt2. The kinetic characterization and *in vivo* analysis of cAlt1 and cAlt2 expression under various metabolic conditions indicate that the proteins exert distinct roles in the liver of *S. aurata*: cAlt2 expression occurs in liver under gluconeogenic conditions, while cAlt1 is predominant during postprandial utilization of dietary nutrients (Anemaet *et al.* 2008).

Present understanding of control of Alt expression at the transcriptional level is limited. Gray *et al.* (2007) reported a reduction of ALT1 mRNA levels in the liver of Krüppel-like factor 15-deficient mice. Transfection experiments showed that peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonist and fenofibric acid induce specifically the human *ALT1* promoter in Huh-7 cells, whereas the human *ALT2* promoter is unaffected. ChIP analyses confirmed the binding of PPAR α and PPAR γ to the -574 site in the proximal human *ALT1* promoter (Thulin *et al.* 2008).

Since up-regulation of cAlt2 actually occurs in the liver of streptozotocin (STZ)-induced diabetic *S. aurata* (Anemaet *et al.* 2008), and in order to unravel the basis that governs *calt* transcription, in the present study, we isolated and characterized the *S. aurata calt* promoter. We show that p300 and c-Myb transactivate the *calt* promoter, and provide evidence that p300 may be involved in the pathogenesis of diabetes.

Materials and methods

Experimental animals

Gilthead sea bream (*S. aurata*) fingerlings were obtained from Tinamenor SA (Cantabria, Spain). Fish were maintained in 260-L aquaria supplied with recirculating seawater at 20 °C as described (Fernández *et al.* 2007). Fish were weighed every week to adjust for the quantity of diet supplied for each experiment. Fish were fed daily (1000 h) at 2.5% body weight with a diet containing 46% protein, 9.3% carbohydrates, 22% lipids, 10.6% ash, 12.1% moisture, and 21.1 kJ/g gross energy. The effect of starvation on the expression of p300 and c-Myb was analyzed in the liver of fish deprived of food for 20 days and in fed fish. To study regulation of p300 and c-Myb expression by insulin and STZ, the animals were divided into three groups. Twenty-two hours before sampling, two groups of fish received an i.p. injection with vehicle (0.01 M sodium citrate, pH 4.5), and another group was i.p. injected with STZ (600 mg/kg fish; Sigma–Aldrich). Six hours before sampling, one group of fish previously treated with vehicle received an i.p. dose of bovine insulin (10 units/kg fish; Sigma–Aldrich). Fish were killed by cervical section. Tissue samples were dissected out, immediately frozen in liquid nitrogen, and kept at -80 °C till use. To avoid stress, fish were anesthetized with MS-222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester; 1:12 500) before handling. The experimental procedures met the guidelines of the Animal Use Committee of the Universitat de Barcelona.

Cloning of the 5'-flanking region of cALT promoter from *S. aurata* by chromosome walking

To isolate the 5'-flanking region of *calt* gene from *S. aurata*, two rounds of genome walking were performed with the Universal GenomeWalker Kit (Clontech). Four genomic libraries were obtained by blunt-end digestion of *S. aurata* genomic DNA with DraI, EcoRV, PvuII, and StuI (Metón *et al.* 2006). A primary PCR was performed on each library with the gene-specific primer IGAL0502 (Table 1) and the adaptor primer AP-1 provided by the kit. A nested PCR was performed on the primary PCR product, using the gene-specific primer IGAL0501 (Table 1) and the adaptor primer AP-2 provided by the kit. The longer amplification product, a single band of ~ 600 bp (named s496), was obtained from the StuI library, and purified using the High Pure PCR Purification Kit (Hoffmann-La Roche). According to the DNA sequence obtained by the first round of genome walking, we designed the gene-specific primers IGAL0405 and IGAL0305 (Table 1) to further isolate the 5'-flanking region of *calt* by PCR, following the same amplification conditions. The nested PCR carried out

Table 1 *Sparus aurata calt*-specific primers used in the present study

	Sequence 5'–3'	Maps to
Primers		
IGAL0305	CAGCTTTTGAGAAATTAGATATTA ACTGC	–417 to –445
IGAL0405	TTGGCCACATAAAGGATAGTTCAGC	–396 to –420
IGAL0501	GTTGTTTTCCGCCGCTGTCACCTCTGGACTG	172 to 141
IGAL0502	GTTCCGCCGCTGGTGGGACATGTTG	217 to 193
IGAL0505	CCTTAAAAAATGTAATTACCTGACAGG	–496 to –523
IGAL0605	CCGGTACCATCAATGTCTTTCCCAAGCCC	–2096 to –2075
IGAL1007	GGAAGCTTGTTGTTTTGTTGTTGTTGTTGTTG	196 to 172
IGAL1101	GGGGTACCAGGCGTGGCGTGGCGGTTGGGTGGG	–57 to –33
IGAL1102	GGGGTACCAGGCGTGGCGTGGCGCGCGGGTGGGAATATGAGCAGC- ACGAG	–57 to –16
IGAL1103	GGGAATTCCAGCCGCGCGGAGCAGGAGTGC GCGGAAGG	–91 to –55
IGAL12F	CTTTCAGATATCAGTCCAGAGGGTGACAGCGGCGGAAAACAACA- ACAACAACAACAACAAAAACAACA	130 to 195
IGAL13R	AGCTTGTTGTTTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTTCCGCCGCTGTC- ACCTCTGGACTGATATCTGAAAGGTAC	195 to 130
IGAL3001	GGGAATTCCAGCCAACCGCGAGCAAAAAGCGCGGAAGGCGTGGC- GTGG	–90 to –45
IGALHND	GGAAGCTTGAAGGAGAGGTTGAGGAGTG	+126 to +107
IGALSAC	GGGAGCTCCTGCCTATCACTTGCACTT	–495 to –477
<i>calt</i> –91/–51	GAATTCAGCCAACCGCGAGCAGGAGTGC GCGGAAGGCGTG	–91 to –51
<i>calt</i> –66/–27	GTGCGCGGAAGGCGTGGCGTGGCGGTTGGGTGGGAATATGT	–66 to –27
<i>calt</i> –57/–27	AGGCGTGGCGTGGCGGTTGGGTGGGAATATGG	–57 to –27
<i>calt</i> –41/+6	TTGGGTGGGAATATGAGCAGCACGAGAGGCGCGGAGAGGCACAAC	–41 to +5
<i>calt</i> –91/–51mutp300	GAATTCAGCCAACCGCGAGCAAAAAGCGCGGAAGGCGTG	–91 to –51
<i>calt</i> –91/–59mutMyb1	GAATTCAGCCGCGCGGAGCAGGAGTGC GCGGG	–91 to –59
<i>calt</i> –57/–27mutMyb2	AGGCGTGGCGTGGCGCGCGGGTGGGAATATGG	–57 to –27

The following primers contain restriction sites (underlined): IGAL0605 (KpnI), IGAL1007 (HindIII), IGAL1101 (KpnI), IGAL1102 (KpnI), IGAL1103 (EcoRI), IGAL3001 (EcoRI), IGALHND (HindIII), and IGALSAC (SacI). IGAL12F and IGAL13R contain protruding ends resulting from restriction with HindIII and KpnI respectively (underlined). Bold and double underlined letters indicate site-directed mutations in primers IGAL1102, IGAL1103, IGAL3001, *calt* –91/–51mutp300, *calt* –91/–59mutMyb1, and *calt* –57/–27mutMyb2. For double-stranded oligonucleotides *calt* –91/–51, *calt* –66/–27, *calt* –57/–27, *calt* –41/+6 and *calt* –91/–51mutp300, *calt* –91/–59mutMyb1, and *calt* –57/–27mutMyb2 used in gel shift experiments, only the forward primers are shown. Mapping positions for IGAL0501, IGAL0502, IGAL1007, IGAL12F, and IGAL13R are calculated from *S. aurata calt* 2 cDNA. For other primers, mapping positions are calculated from *S. aurata calt* gene relative to the transcription start site.

on the EcoRV library gave rise to a band of ~1600 bp (s1603). The DNA fragments s496 and s1603 were ligated into pGEM-T Easy (Promega) to generate pGEM496 and pGEM1603 respectively. Two independent clones were fully sequenced on both strands, following the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Construction of reporter gene plasmids

The reporter construct pGalt496 was generated by PCR using pGEM496 as a template and oligonucleotides IGALSAC (with a 5'-anchor sequence containing a SacI site; Table 1) and IGALHND (with a 5'-anchor sequence containing a HindIII site; Table 1). The PCR product was digested with SacI/HindIII and ligated into the promoterless luciferase reporter plasmid pGL3-Basic (Promega), previously restricted with the same enzymes. The pGalt2096 construct was originated by ligation of s1603 fragment into pGalt496. To this end, a PCR using pGEM1603 as a template and the

primer pair IGAL0505/IGAL0605 (Table 1) was performed to add a 5'-KpnI anchor to the s1603 fragment. The resulting product was filled-in with Klenow enzyme, digested with KpnI, and ligated into pGalt496, previously digested with SacI, filled-in with Klenow, and restricted with KpnI. The reporter constructs pGalt399, pGalt173, pGalt89, pGalt12, and pGalt2096Δ89–11 were produced by chewing back, fill-in, and self-ligation of pGalt2096 after digestion with MisI/KpnI, Pfl23II/KpnI, EcoRI/KpnI, PvuI/KpnI, and EcoRI/PvuI respectively. To obtain the pGalt57 reporter construct, a PCR was performed using oligonucleotides IGAL1101/IGALHND and pGalt2096 as a template. The PCR product was digested with KpnI/HindIII and ligated to the main fragment resulting from digestion of pGalt2096 with the same enzymes. The pGalt173mutp300 construct was generated by PCR with the primer pair IGAL3001/GLprimer2 (Promega) using pGalt173 as a template. The amplified product was digested with EcoRI/HindIII and ligated to the longer DNA fragment obtained after restriction of pGalt173 with the

same enzymes. The reporter construct pGalt173mut-Myb1 was obtained by PCR, using the primer pair IGAL1103/IGALHND and pGalt2096 as a template. The PCR product was digested with EcoRI/HindIII and ligated to the main fragment resulting from restriction of pGalt173 with the same enzymes. To generate pGalt57mutMyb2, a PCR was performed with the primer pair IGAL1102/IGALHND and pGalt2096 as a template. The PCR product was restricted with KpnI/HindIII and ligated to the main fragment resulting from digestion of pGalt2096 with the same enzymes. All constructs were verified by cycle sequencing.

Cell transfection and luciferase assay

Sea bass larvae (SBL) cells (Castric 1984) were grown at 20 °C in Modified Eagle's Medium (MEM), supplemented with 10% FCS, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml STZ. Transfection experiments on SBL cells grown at 50–60% confluence were performed with FuGENE6 Transfection Reagent (Hoffmann-La Roche) on 6-well plates. Cells were transfected with 0.8 µg of the reporter construct and, when necessary, 100 ng of expression plasmids encoding p300, p300DY, or c-Myb. To correct for variations in transfection efficiency, 200 ng pCMVβ was included in each transfection. To ensure equal DNA amounts, empty plasmids were added in each transfection. The cells were harvested 48 h later, washed in PBS, and incubated for 15 min in 300 µl of cell culture lysis reagent (Promega). After removal of cell debris by centrifugation at 10 000 g for 15 s, luciferase activity was measured in 5 µl of the supernatant after the addition of 25 µl of luciferase assay reagent (Promega). Peak light emission was recorded on a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). β-Galactosidase activity in the clear lysate was measured as previously described (Metón *et al.* 2006). Expression plasmids encoding rat p300 (pCMV-p300), a mutant form of p300 lacking endogenous acetyltransferase activity (pCMV-p300DY; Ito *et al.* 2001), and mouse c-Myb (pCMV-cMyb; Oelgeschläger *et al.* 1995) were kindly provided by Dr D Haro (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain), Dr Tso-Pang Yao (Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke University, USA), and Dr Bernard Lüscher (Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany) respectively.

Electrophoretic mobility shift assay

Double-stranded oligonucleotides used in gel shift experiments were (only the forward oligonucleotide is shown) p300-cons (5'-CGCACGCGGCAGGGAG-TGAGTGGTAGTGCC-3'), Myb-cons (5'-GGTAACGG-TTCCCAACGGCGGTTGGGGGTAACGGTTGGT-3'),

calt-91/-51, calt-66/-27, calt-57/-27, calt-41/+6, calt-91/-51mutp300, which contains a mutated p300 response element, and calt-91/-59mutMyb1 and calt-57/-27mutMyb2, both containing mutated c-Myb putative sites (Table 1). After 30 min of incubation at 37 °C in the presence of terminal transferase (Hoffmann-La Roche) in a 20 µl reaction, 200 pmol of the double-stranded oligonucleotides were 3' end labeled with digoxigenin-11-ddUTP. The reaction was stopped by adding 2 µl of 0.2 M EDTA. Binding reactions were carried out in a total volume of 20 µl containing 100 mM HEPES, pH 7.6, 5 mM EDTA, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM dithiothreitol (DTT), 1% Tween 20, 150 mM KCl, 1 µg of non-specific competitor poly [d(I-C)] (Hoffmann-La Roche), nuclear extracts of SBL cells overexpressing p300 or c-Myb, and the labeled probe. The DNA-protein complexes were electrophoresed at 4 °C on 5% polyacrylamide gel, with 0.5× Tris-borate-EDTA as buffer. DNA was then transferred by contact blotting (2 h at room temperature) to Nytran membranes (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA). DNA was cross-linked to membranes by u.v. irradiation for 3 min. Labeled probes were immunodetected with anti-digoxigenin conjugated with alkaline phosphatase (Hoffmann-La Roche), with CDP-Star (Hoffmann-La Roche) as a chemiluminescent substrate. Membranes were exposed to Hyperfilm ECL (Amersham). For competition experiments, SBL nuclear extracts were pre-incubated for 30 min with a 5- and 20-fold molar excess of unlabeled double-stranded p300-cons or Myb-cons oligonucleotides. For supershift assays, nuclear proteins extracted from p300- or c-Myb-overexpressing SBL cells were incubated in the presence of anti-p300 or anti-c-Myb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 30 min at room temperature before the addition of the probe.

Nuclear extracts

Nuclear extracts were prepared from SBL cells. Cells were grown to near confluence, washed, and scraped into 1.5 ml of cold PBS. All the following steps were performed at 4 °C. The cells were pelleted by centrifugation for 10 s at 1000 g and resuspended in 400 µl of buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). Following incubation for 10 min, cells were vortexed for 10 s. Samples were centrifuged for 10 s, and the pellet was resuspended in 20 µl of cold buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM PMSF) and incubated for 20 min for high salt extraction. Cell debris was removed by centrifugation for 2 min. The supernatant fraction was aliquoted and stored at -80 °C.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from *S. aurata* liver by the Total Quick RNA Cells and Tissues kit (Talent, Trieste, Italy). Five micrograms of total RNA were reverse transcribed by incubation with 5× First Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs, 6.25 ng/μl random hexamers, 40 U/μl rRNasin (Promega), and 200 U/μl M-MLV RT (Invitrogen) for 1 h at 37 °C. The cDNA product was used for subsequent real-time quantitative PCR. The mRNA levels of p300 and c-Myb were determined in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 0.4 μM of each primer, 10 μl of SYBR Green (Applied Biosystems), and 1.6 μl of the diluted cDNA mixture in a final volume of 20 μl. Primer pairs used were IMP303 (5'-GAAC-CAGGTGATGAATGGCTCC-3')/IMP304 (5'-CTTGGT-CATCGCTCCAGGTTGC-3') for p300; and MG0907 (5'-CGTTGGTCCGTGATTGCTAA-3')/MG0908 (5'-CT-CGTAGATGATTCCGGTCCCT-3') for c-Myb. Oligonucleotides MC17 (5'-CGTCCACCGCAAATGCTTC-3') and MC18 (5'-GTTGTTGGGCGTTGGTGG-3') were used to amplify β-actin from all the samples on each plate as a housekeeping gene to normalize expression levels of targets between different samples and to monitor assay reproducibility. Variations in gene expression were calculated by the standard $\Delta\Delta C_t$ method. Oligonucleotides IMP303, IMP304, MG0907, MG0908, MC17, and MC18 were designed from *S. aurata* p300, c-Myb, and β-actin cDNA fragments (GenBank accession numbers GU441458, FJ797059 and X89920).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-factor ANOVA using a computer program (StatView, SAS Institute, Cary, NC, USA). Differences were determined by Fisher's protected least significant difference multiple range test.

Results

Cloning of the 5'-flanking region of *S. aurata calt* gene

To clone and characterize the promoter region of *calt* gene from *S. aurata*, chromosome walking was performed on genomic DNA isolated from this species. To this end, *calt*-specific oligonucleotides were designed from the previously cloned *S. aurata calt2* cDNA (Anemaet *et al.* 2008). A first round of genome walking resulted in the specific amplification of a single fragment of ~600 bp (here named s496) from the StuI library, which corresponds to positions -496/+139 relative to the previously determined transcription start site (Metón *et al.* 2004). The s496 fragment was isolated and cloned into pGEM-T Easy to generate pGEM496. On sequencing, this fragment was completely homologous with the 139 bases at the 5' end of *S. aurata calt2* cDNA (Anemaet *et al.* 2008).

A second round of chromosome walking on *S. aurata* genomic DNA was performed, using primers designed from the s496 fragment, to further isolate the 5'-flanking *calt* region. The longer amplification product, an ~1600 bp single fragment (s1603), was obtained from the EcoRV library. This fragment was isolated and ligated into pGEM-T Easy to generate pGEM1603. After sequencing, this fragment showed complete homology with the 51 bases at the 5' end of the product obtained by the first round of chromosome walking. Altogether, two consecutive rounds of chromosome walking allowed us to isolate 2235 bp from the 5'-flanking region of *S. aurata calt*. This fragment comprises positions -2096 to +139 relative to the transcription start site: its nucleotide sequence was submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank Databases under the accession number DQ114991 (Fig. 1).

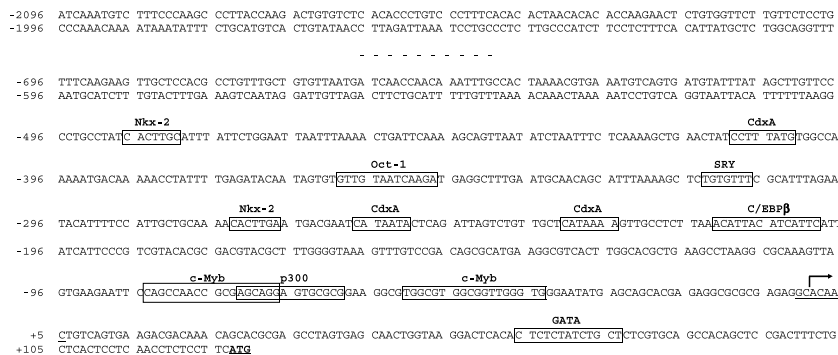


Figure 1 Sequence analysis of the 5'-flanking region of the *S. aurata calt* gene. The sequence upstream from the transcription start site, isolated by chromosome walking, is shown in capital letters. Putative binding sites for transcription factors in s496 fragment are boxed. The transcription start site is indicated by an arrow. The Inr-like element is underlined. The translation start codon for cAlt2 is in bold and double-underlined.

Identification of a functional *S. aurata calt* promoter

To determine whether the isolated genomic DNA-flanking region of *calt* gene contains a functional promoter, nucleotide positions -2096 to $+126$ relative to the transcription start site were subcloned in the promoterless pGL3-Basic plasmid, upstream from the luciferase reporter gene (pGalt2096). The recombinant plasmid pGalt2096 was transiently cotransfected into SBL cells together with a LacZ-containing plasmid (pCMV β) as an internal control for transfection efficiency. The cell lysate was assayed for luciferase and β -galactosidase activities 48 h after transfection. This construct yielded a more than 80-fold increase in luciferase activity over the promoterless vector, pGL3-Basic (Fig. 2). This result indicates that a core functional promoter for basal transcription is contained within the 2096 nucleotides upstream from the transcription start site.

To examine the promoter functional regions involved in modulation of basal *calt* expression in *S. aurata*, sequential 5'-deletion analysis of the promoter fragment was performed. Deletion fragments, with 5' ends ranging from -2096 to -89 and 3' ends at $+126$ (lacking the cAlt2 ATG start codon to prevent any false negative results due to the expression of a bicistronic message), were fused to the luciferase reporter gene and transfected into SBL cells. The longest 5' construct (pGalt2096) gave a more than 80-fold increase in luciferase activity over pGL3-Basic. Sequential 5'-deletion of pGalt2096 revealed reduced promoter activity. Decreased promoter activity was observed using the construct containing the promoter region spanning -89 to $+126$ (pGalt89), which showed induction

40 times greater than the promoterless pGL3-Basic did. No activity was found when the smallest construct (pGalt12; -12 to $+126$) was used. Moreover, when compared to pGalt2096, promoter activity decreased twofold due to deletion of the region encompassing the nucleotide positions -89 to -11 (pGalt2096 Δ 89–11). These results confirmed that the minimal core promoter of the *S. aurata calt* gene is located in the region within 89 bp upstream from the transcriptional start, and suggest that *cis*-acting elements may be located in this area.

Transactivation of *calt* promoter by p300 and c-Myb

In silico analysis of *calt* promoter with TFSEARCH (Heinemeyer *et al.* 1998) revealed several putative transcription factor-binding sites in the proximal promoter region (Fig. 1). Amongst the potential transcription factors were sites for p300 and c-Myb. Cotransfection of SBL cells with the pGalt2096 construct in the presence of a p300 expression plasmid resulted in a more than 23-fold increase in *calt* promoter activity. p300 is a nuclear phosphoprotein that acts as a transcriptional coactivator. p300 promotes gene transcription by bridging between DNA-binding transcription factors and the basal machinery, by providing a scaffold for integrating transcription factors, and by modifying transcription factors and chromatin through acetylation (Kalkhoven 2004, Ghosh & Varga 2007). Reporter constructs containing 5'-deletion of the promoter fragment up to 89 nucleotides upstream from the transcription start site displayed similar p300-mediated enhanced *calt*

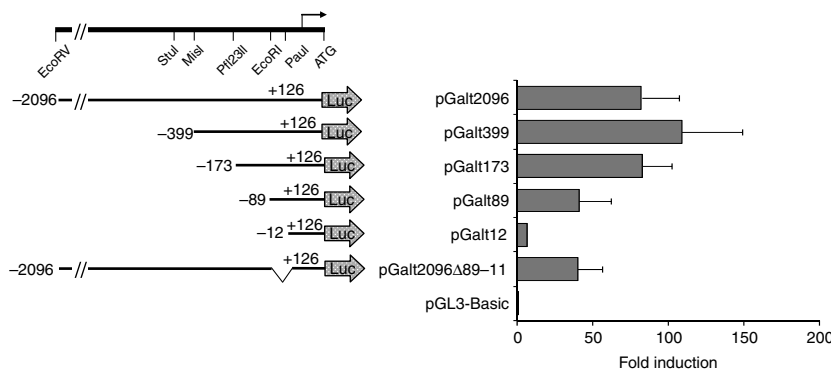


Figure 2 Deletion analysis of the 5'-flanking region of *S. aurata calt* in SBL cells. The top left part represents the genomic organization of the 5'-flanking region of *S. aurata calt*. Relevant restriction sites and the translation start codon for cAlt2 are indicated. Nucleotide numbering starts with $+1$ corresponding to the transcription start site, which is indicated by an arrow. Fragments of the *S. aurata calt* promoter with varying 5' ends and an identical 3' end ($+126$) were fused to the luciferase reporter gene in pGL3-Basic vector. SBL cells were transfected with the reporter constructs pGalt2096, pGalt399, pGalt173, pGalt89, pGalt12, pGalt2096 Δ 89–11, or pGL3-Basic, along with pCMV β (lacZ) to normalize for transfection efficiency. Luciferase activity is expressed as a fold increase over promoterless reporter plasmid pGL3-Basic. Results shown are the mean \pm s.d. from at least three independent experiments performed in duplicate.

promoter activity in SBL cells. In contrast, no enhancement of the promoter activity was detected when the shortest construct (pGalt12) was used. Since p300 can interact simultaneously with the basal transcription machinery and with one or more upstream transcription factors (Chan & La Thangue 2001, Kalkhoven 2004), our findings suggested that a *cis* element located within 89 bp upstream from the transcription start site, here named the p300 response element, may be responsible for the p300-mediated transactivation of *calt* promoter. Consistently, no transactivation by p300 was observed when cotransfected with the pGalt2096 Δ 89–11 reporter construct, which lacks the region within 89 bp upstream from the transcriptional start (Fig. 3A).

Putative c-Myb-binding sites were located within nucleotide positions –85 to –68 and –52 to –35 relative to the transcription start site of *S. aurata calt* and, therefore, close to the p300 response element (–73 to –60). Among other transcription factors, p300 is a well-established coactivator of c-Myb through acetylation of the latter (Tomita *et al.* 2000, Sandberg *et al.* 2005). To address the role of c-Myb in *calt* expression, we performed transfection experiments on SBL cells. Cotransfection of a plasmid encoding c-Myb together with the pGalt2096 construct resulted in a more than threefold increase in *calt* promoter activity (Fig. 3B). Reporter constructs pGalt173 and pGalt89 displayed similar *calt* promoter transactivation after cotransfection with c-Myb. No enhancement of the promoter activity was detected when the shortest construct (pGalt12) was used. Furthermore, no transactivation by c-Myb was observed when cotransfected with pGalt2096 Δ 89–11 reporter construct, which lacks the region within 89 bp upstream from the transcriptional start. These results suggest that c-Myb may transactivate the *S. aurata calt* promoter by acting via at least one response element located within 89 bp upstream from the transcriptional start. Cotransfection of SBL cells with expression plasmids encoding p300 and c-Myb caused additive effects on the reporter activity of pGalt89 or longer constructs (Fig. 3C).

Although the *S. aurata calt* and human *ALTI* promoter sequences share a low general homology, *in silico* analysis of human *ALTI* with TFSEARCH (Heinemeyer *et al.* 1998) revealed the presence of putative binding sites for p300 and c-Myb close to the transcription start site (data not presented), similarly as for the *S. aurata* gene.

p300 is part of a complex that binds to the *calt* promoter

The shortest reporter construct that showed p300-mediated transactivation (pGalt89) contains a putative p300 response element at positions –73 to –60

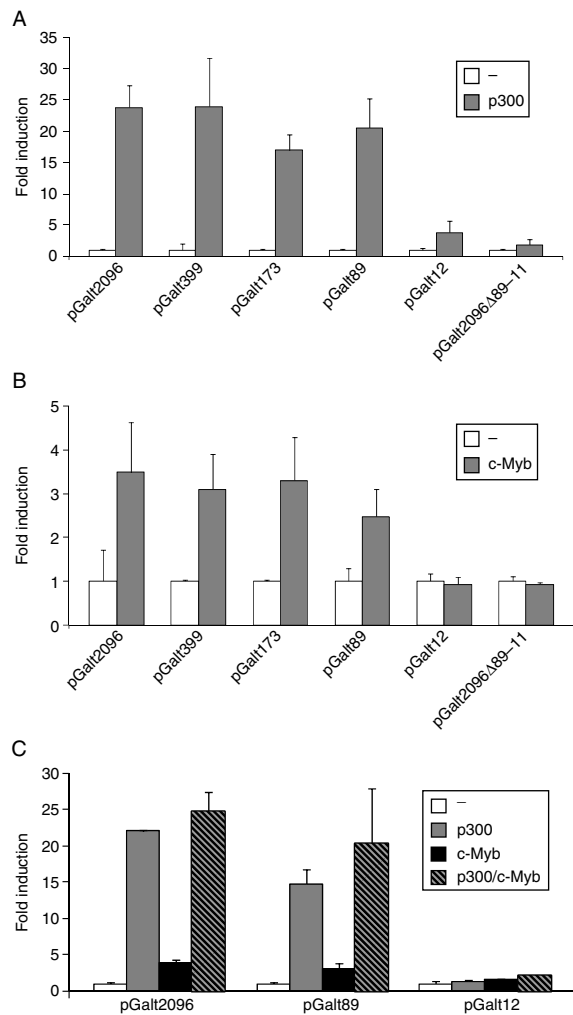


Figure 3 Effect of p300 and c-Myb on *S. aurata calt* promoter transcription in SBL cells. The cells were transfected with the promoter constructs pGalt2096, pGalt399, pGalt173, pGalt89, pGalt12, or pGalt2096 Δ 89–11, with or without expression plasmids encoding p300 (A) or c-Myb (B). (C) SBL cells were transfected with the promoter constructs pGalt2096, pGalt89, or pGalt12, with or without expression plasmids encoding p300 and c-Myb. The promoter activity of the constructs alone was set at 1. The data represent the mean \pm s.d. values of three independent duplicate experiments.

relative to the transcription start site. To analyze whether p300 is part of a protein complex that indeed binds to the putative p300 response element at positions –73 to –60, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments were performed. When *calt*–91/–51 (harboring the putative p300 response element) was used as a probe and nuclear extracts were prepared from SBL cells overexpressing p300, one major shifted band was observed. A DNA–protein complex with the same mobility was seen when a consensus p300 probe was used (p300-cons). The shifted band disappeared in competition assays

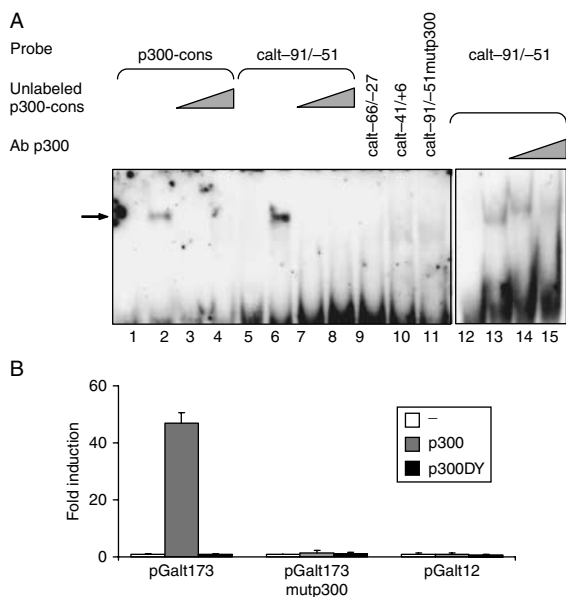


Figure 4 Effect of mutating the p300 response element on *S. aurata calt* promoter binding and transcription in SBL cells. (A) The left part of the figure shows an electrophoretic mobility shift assay of a competition analysis, using nuclear extracts of SBL cells overexpressing p300 incubated with labeled oligonucleotides p300-cons (lanes 1–4) or calt–91/–51 (lanes 5–8). Lanes 1 and 5 contained no nuclear extract. Lanes 2 and 6 correspond to binding of nuclear extracts to labeled probes without competitor. Lanes 3, 4, 7, and 8 represent competition with 5- and 20-fold molar excess of unlabeled double-stranded competitor (p300-cons). Lanes 9, 10, and 11 show nuclear extracts of p300-overexpressing SBL cells incubated with probes calt–66/–27, calt–41/+6, and calt–91/–51mutp300 respectively. The right part of the figure shows a supershift assay using nuclear extracts of p300-overexpressing SBL cells incubated with labeled oligonucleotide calt–91/–51 in the absence (lanes 12–13) or presence of 2 µg (lanes 14) and 8 µg (lanes 15) of antibody against p300. Lane 12 contained no nuclear extract. DNA–protein complexes are indicated by an arrow. (B) SBL cells were transfected with pGalt173, pGalt173mutp300, or pGalt12, with or without expression plasmids encoding p300 or p300DY. The promoter activity of the constructs alone was set at 1. The data represent the mean ± s.d. values of three independent duplicate experiments.

performed with 5- and 20-fold molar excess of unlabeled p300-cons (Fig. 4A). No shifted band could be detected when using calt–66/–27 (partial deletion of p300 consensus-like sequence) and calt–41/+6 (absence of p300 consensus-like sequence) probes.

To test whether mutations in the putative p300 site could abolish formation of the DNA–protein complex, we performed bandshift assays using nuclear extracts of SBL cells overexpressing p300 and a labeled probe harboring positions –91 to –52 of the *calt* gene in which the p300 box was mutated (calt–91/–51mutp300). As shown in Fig. 4A, the complex shifted using p300-cons and calt–91/–51 probes disappeared when the calt–91/–51mutp300 probe was used. In addition, a supershift assay was performed

with antibodies against p300. As shown in Fig. 4A, a supershift band was observed when 2 µg of the antibody were used. A higher concentration of antibody (8 µg) blocked the binding of p300 to the probe. Taken together, these data confirm that p300 is part of a complex that binds to the p300 response element at positions –73 to –60 of *calt* gene.

Mutating the p300 response element abolishes transactivation by p300

To generate a reporter construct with a mutated p300 response element (pGalt173mutp300), the same mutations described for the double-stranded oligonucleotide calt–91/–51mutp300 used in bandshift assays were introduced into the promoter construct pGalt173. Cotransfection experiments with pGalt173mutp300 and the p300 expression vector were performed in SBL cells to analyze the level of transactivation due to the wild-type or the mutant reporter construct. p300 did not enhance the transcription of the construct harboring the mutated p300 response element (Fig. 4B). This finding allowed us to hypothesize that the p300 response element at positions –73 to –60, relative to the transcriptional start of *S. aurata calt* promoter, is responsible for transactivation by p300.

Histone acetyltransferase activity of p300 is essential for transcriptional activation of *calt* gene

p300 couples transcription factor recognition to chromatin remodeling through acetylating histones and non-histone proteins, such as a number of transcription factors (Das *et al.* 2009, Marmorstein & Trievel 2009). This brought us to the question of whether p300-mediated acetylation plays a role in p300 transactivation of the *calt* promoter. A point mutant version of p300, p300DY (Ito *et al.* 2001), which lacks histone acetyltransferase (HAT) activity, was cotransfected with *calt* promoter constructs in SBL cells. p300DY did not activate any of the reporter constructs transactivated by wild-type p300, such as pGalt173 (Fig. 4B). These results indicate that the HAT domain of p300 is essential for p300-induced *calt* transactivation.

c-Myb binds to c-Myb consensus elements of *calt* promoter

Two putative c-Myb-binding-like sites are located in the proximal promoter region of *cALT*; one site partially overlaps the p300 response element (–85 to –68) and another element is located downstream (–52 to –35). To investigate whether c-Myb binds to either one or both putative c-Myb response elements, EMSA

experiments were performed. Competition analysis performed in the presence of 5- and 20-fold molar excess of unlabeled consensus c-Myb probe (Myb-cons), using probes *calt*-91/-51 (harboring the upstream response element for c-Myb), *calt*-57/-27 (harboring the downstream response element for c-Myb), and nuclear extracts obtained from SBL cells overexpressing c-Myb, resulted in the disappearance of one major shifted band (Fig. 5A). These data suggest that c-Myb can bind to both c-Myb boxes, located at nucleotides -85 to -68 (upstream site) and -52 to -35 (downstream site) relative to the transcriptional start in the *S. aurata calt* promoter.

Bandshift assays were performed to analyze whether introduction of mutations in the putative upstream and downstream c-Myb sites abolished formation of the

DNA-transcription factor complexes. To this end, nuclear extracts of SBL cells overexpressing c-Myb and labeled probes harboring mutated upstream (*calt*-91/-51mutMyb1) and downstream (*calt*-57/-27mutMub2) c-Myb boxes were used. As shown in Fig. 5A, the shifted complex disappeared when the *calt*-91/-51mutMyb1 and *calt*-57/-27mutMub2 probes were used. Supershift assays carried out with 2 μ g-specific antibodies against c-Myb blocked the binding of c-Myb to *calt*-91/-51 and *calt*-57/-27 probes. From these data, we hypothesized that c-Myb might bind to both the upstream and the downstream c-Myb sites located at positions -85 to -68 and -73 to -60 of *calt* gene.

Mutating the downstream c-Myb box abolishes transactivation by c-Myb

To further distinguish whether the upstream and downstream c-Myb boxes contribute equally to the c-Myb-dependent transactivation of the *calt* promoter, we generated the reporter construct pGalt57, which lacks the upstream c-Myb element, but retains the downstream box. Cotransfection of SBL cells with pGalt57 gave similar c-Myb-dependent transactivating rates as reporter constructs harboring both upstream and downstream sites, such as pGalt173 (Fig. 5B). These results suggest that the upstream c-Myb box (-85 to -68) is not functional. As expected, since pGalt57 lacks the p300 response element, p300 had no effect on the reporter activity of pGalt57. The fact that c-Myb was still able to activate the transcription of pGalt57 revealed that this effect was a separate event not related to the p300 response element located at positions -73 to -60.

Two reporter constructs were designed to carry mutated c-Myb upstream and downstream sites: pGalt173mutMyb1, which contains an upstream c-Myb site with the mutations that were introduced in the double-stranded oligonucleotide *calt*-91/-59mutMyb1 used in bandshift assays; and pGalt57mutMyb2, which contains a downstream c-Myb site with the mutations that were introduced in the double-stranded oligonucleotide *calt*-57/-27mutMyb2. SBL cells were cotransfected with the c-Myb expression vector and pGalt173mutMyb1 or pGalt57mutMyb2 to compare the level of transactivation due to the wild-type or the mutant reporter constructs. Similar transactivation values were observed using pGalt173mutMyb1, pGalt173, or pGalt57, which is consistent with the suggestion that the upstream box is not responsible for the transactivating effect of c-Myb. In contrast, c-Myb did not activate the transcription of the construct harboring the mutated downstream c-Myb box (pGalt57mutMyb2, Fig. 5B). This finding led us to conclude that the c-Myb box located at positions -52

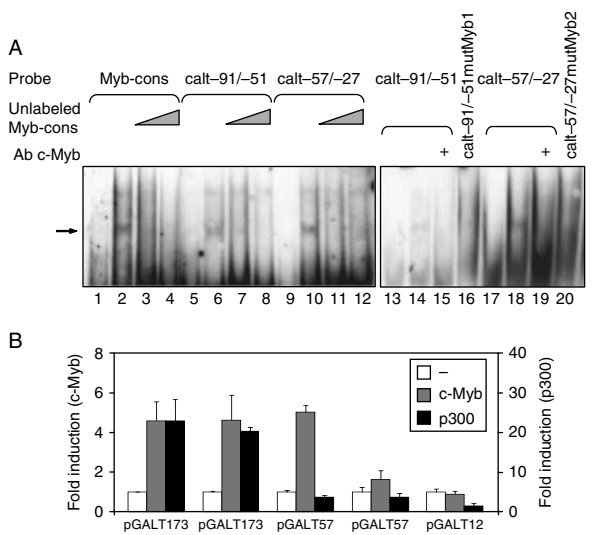


Figure 5 Effect of mutating the c-Myb response element on *S. aurata calt* promoter binding and transcription in SBL cells. (A) The left part of the figure shows an electrophoretic mobility shift assay of a competition analysis using nuclear extracts of SBL cells overexpressing c-Myb incubated with labeled oligonucleotides Myb-cons (lanes 1–4), *calt*-91/-51 (lanes 5–8), or *calt*-57/-27 (lanes 9–12). Lanes 1, 5, and 9 contained no nuclear extract. Lanes 2, 6, and 10 show binding of nuclear extracts to labeled probes without competitor. Lanes 3, 4, 7, 8, 11, and 12 correspond to competition with 5- and 20-fold molar excess of unlabeled double-stranded competitor (Myb-cons). The right part of the figure includes a supershift assay using nuclear extracts of c-Myb-overexpressing SBL cells incubated with labeled oligonucleotides *calt*-91/-51 and *calt*-57/-27 in the absence (lanes 13–14 and 17–18) or presence of 2 μ g (lanes 15 and 19) of antibody against c-Myb. Lanes 13 and 17 contained no nuclear extract. Lanes 16 and 20 show nuclear extracts of c-Myb-overexpressing SBL cells incubated with probes *calt*-91/-51mutMyb1 and *calt*-57/-27mutMyb2 respectively. DNA-protein complexes are indicated by an arrow. (B) SBL cells were transfected with pGalt173, pGalt173mutMyb1, pGalt57, pGalt57mutMyb2, or pGalt12, with or without expression plasmids encoding c-Myb or p300. The promoter activity of the constructs alone was set at 1. The data represent the mean \pm S.D. values of three independent duplicate experiments.

to -35, relative to the transcriptional start of the *S. aurata calt* promoter, is responsible for the transactivating effect of c-Myb.

Nutritional and hormonal regulation of p300 and c-Myb expression in liver of *S. aurata*

Having established transactivation of the *calt* promoter by p300 and c-Myb, we next asked whether the expression of p300 and c-Myb is controlled by nutritional and hormonal regulation in the liver of *S. aurata*. We showed elsewhere that alternative splicing of *calt* gene in *S. aurata* generates two isoforms: cAlt1 and cAlt2. Specifically, the hepatic expression of *S. aurata* cAlt2 increased under gluconeogenic conditions, such as starvation and STZ-induced diabetes (Anemaet *et al.* 2008).

Quantitative RT-PCR assays showed that starvation similarly affected the expression of p300 and c-Myb. Both p300 and c-Myb mRNA levels significantly increased 1.3- and 1.4-fold respectively in the liver of 20-day-starved *S. aurata* (Fig. 6A). The administration of insulin did not cause significant changes in the expression of p300 6 h after the treatment, although a

tendency to decrease to about 80% of the values in control animals was observed. A significant 55% decrease in c-Myb mRNA levels was found in the liver 6 h after insulin administration (Fig. 6B). STZ is a glucosamine-nitrosourea derivative widely used to generate diabetic animal models through β cell necrosis (Junod *et al.* 1969, Like & Rossini 1976, Wilson & Leiter 1990). As it is the characteristic of the diabetogenic action of STZ, significant hyperglycemia (175.8 ± 53.6 mg/dl, mean \pm s.d., $n=4$ vs 94.3 ± 2.7 mg/dl, mean \pm s.d., $n=4$ in control animals; $P<0.05$) followed 22 h after i.p. administration of 600 mg/kg STZ to *S. aurata*. The administration of STZ significantly up-regulated p300 1.5-fold in the liver of 22-h-treated animals. However, STZ promoted a decrease in c-Myb expression to about 25% of the levels in control fish (Fig. 6B).

Discussion

The liver plays important roles in regulating blood levels of amino acids and synthesizing glucose from excess amino acids. In this tissue, Alt has an essential function in intermediary metabolism to obtain energy and to provide gluconeogenic substrates. To assess the transcriptional regulation of *calt* gene in *S. aurata*, we addressed cloning and characterization of the *calt* promoter. The genomic fragment isolated is the first *calt* gene promoter reported for animals other than humans, and it allowed us to identify two functional *cis* elements involved in transactivation by p300 and c-Myb in the proximal region of the *calt* promoter.

The *S. aurata calt* promoter does not contain a TATA box. However, it includes an initiator (Inr)-like element that overlaps the transcription start site. The functionality of the putative promoter region of fish *calt* was tested by transient transfection of SBL cells with fusion constructs of the isolated genomic fragment to the luciferase reporter gene. Sequential 5'-deletions of the 2235 bp fragment and analysis of promoter activity after transfection of SBL cells with the deleted constructs allowed us to conclude that the promoter region within 89 bp upstream from the transcription start site is essential for transcriptional basal activity of *calt* and constitutes the core functional promoter of this gene.

p300 and CBP have emerged as transcriptional coactivator proteins that interact with and modulate the activity of a wide array of transcription factors bound at upstream activator elements (Shiama 1997). Transient transfection experiments and EMSA analysis demonstrated that p300 confers an activating signal on the *calt* promoter. This is achieved by forming part of a complex that binds to a p300 response element located between -73 and -60 bp upstream from the transcription start site of the *S. aurata* liver *calt* gene

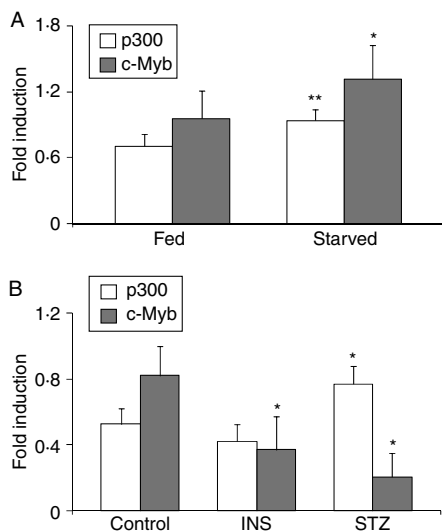


Figure 6 Effect of starvation, insulin, and streptozotocin on p300 and c-Myb mRNA levels in liver of *S. aurata*. (A) Quantitative RT-PCR assays of p300 and c-Myb mRNA levels performed on total RNA isolated from liver of fed and 20-day-starved fish. The mRNA levels of p300 and c-Myb relative to β -actin mRNA are expressed as mean \pm s.d. of four fish. Statistical significance related to fed animals is indicated as follows: * $P<0.05$; ** $P<0.01$. (B) Quantitative RT-PCR assays carried out on total RNA isolated from liver of fish after treatment with vehicle (control; 0.01 M sodium citrate, pH 4.5), insulin (INS; 10 U/kg fish; 6 h), or streptozotocin (STZ; 600 mg/kg fish; 22 h). The mRNA levels of p300 and c-Myb relative to β -actin mRNA are expressed as mean \pm s.d. of four animals. Statistical significance related to control animals is indicated as follows: * $P<0.05$.

promoter. Recruitment of proteins with HAT activity, such as p300, to the Inr element of the *calt* promoter may provide an open DNA configuration precisely at the site of transcription initiation. Histone acetylation in the proximal *calt* promoter region probably makes chromatin more accessible to other transcription factors and the basal transcriptional machinery. Targeting of p300 to the Inr element might enable the recruitment of TFIID to the *calt* promoter, as suggested for other TATA-less Inr-containing promoters (Abraham *et al.* 1993, Swope *et al.* 1996).

Apart from acetylating histones, p300 has been shown to acetylate several transcription factors in a regulated manner and is recruited to the various promoters in response to several stimuli. Many of the p300 mutations identified in tumors actually result in the loss of acetyltransferase activity (Gayther *et al.* 2000), suggesting that the ability of p300 to acetylate one or more cell proteins may be critical for their functions in growth control. Since an acetyltransferase-deficient point mutant of p300 (p300DY) failed to induce the acetylation of the tumor suppressor p53, Ito *et al.* (2001) concluded that binding between p53 and p300 is necessary for p300-mediated p53 acetylation. Transfection experiments in SBL cells using p300DY show that an acetylase-deficient mutant p300 was unable to induce *calt* promoter activity, indicating that the acetyltransferase activity of p300 is essential for the p300-mediated transcriptional activation of *S. aurata calt*.

Our findings suggest that p300 may induce *calt* promoter activity by acetylating histones, to promote a transcriptionally favorable structure of the nucleosome at the transcriptional start, and transcription factors such as c-Myb. The c-Myb gene encodes a proto-oncogene that leads to viral myeloblastosis in avian species (Beug *et al.* 1982). The role of c-Myb as a transcription factor has been extensively studied in hematopoietic stem cells. However, the expression of c-Myb seems to be required in a number of other tissues (Ramsay 2005). The transcriptional activity of c-Myb and other transcription factors is regulated through binding the KIX domain of p300 (Kasper *et al.* 2002, Kauppi *et al.* 2008). Two putative c-Myb boxes were found in the *S. aurata calt* promoter at positions -85 to -68 and -52 to -35 relative to the transcriptional start. Although EMSA assays suggested that c-Myb can bind both sites, site-directed mutagenesis revealed that the downstream element (positions -52 to -35) was the only functional one and responsible for c-Myb-dependent transactivation of the *calt* promoter. Since c-Myb was still able to activate the transcription of *calt* promoter reporter constructs lacking the p300 response element, we can conclude that the c-Myb-dependent transactivation of *calt* occurred irrespective of the p300 response element located at

positions -73 to -60 . However, it is well known that the DNA-binding activity of c-Myb is increased by p300-mediated acetylation (Tomita *et al.* 2000). Furthermore, replacement of c-Myb-acetylated residues (lysines) by arginine dramatically decreases the transactivating capacity of c-Myb (Sano & Ishii 2001). Thus, p300-mediated acetylation of c-Myb could enhance the binding of c-Myb to the *S. aurata calt* promoter. Conceivably, p300-mediated acetylation of c-Myb at lysine residues neutralizes the positive charge and results in a conformational change, which, in turn, may increase the DNA-binding activity of c-Myb and thus the transcriptional activity of *calt*.

Previously, we showed that the hepatic mRNA levels of *S. aurata* cAlt1 and cAlt2 depend largely on nutritional and hormonal status. Long-term starvation increases cAlt2 mRNA levels in the liver of *S. aurata*, whereas short-term refeeding and administration of insulin down-regulate cAlt2 expression. These conditions lead to opposite effects on the mRNA levels of cAlt1. Consistent with stimulation of cAlt2 in conditions associated with increased gluconeogenesis, STZ-treated fish present a marked increase in the hepatic expression of cAlt2. These findings led us to hypothesize that increased cAlt2 expression can be responsible for the serum elevation of Alt activity levels in animals under conditions related to insulin resistance and development of type 2 diabetes (Anemaet *et al.* 2008). To understand the molecular mechanism that governs *calt* gene transcription, we analyzed the expression of p300 and c-Myb in the liver of starved and insulin- and STZ-treated *S. aurata*. In agreement with cAlt2 expression, the mRNA levels of p300 and c-Myb increased in starved animals and decreased in fish liver after the administration of insulin. It remains uncertain whether the suppressing effect of insulin on cAlt2 expression results from a direct or indirect pathway. As it has been described in mammals, we cannot rule out an indirect action of insulin on *calt* expression through inhibition of gluconeogenic substrates release from muscle and adipose tissue, rather than direct hepatic insulin effects. Hence, hyperglycemia has been shown to potentiate the indirect actions of insulin (Fisher & Kahn 2003). This may well account for down-regulation of cAlt2 expression in the liver of *S. aurata* following the administration of glucose or insulin (Anemaet *et al.* 2008).

Based on the data given, both p300 and c-Myb are likely to contribute to increased cAlt2 expression in starved fish. Interestingly, and in a similar way as for cAlt2, up-regulation of p300 expression was also observed in STZ-induced diabetic *S. aurata*. In this regard, p300 is recognized as an important element in the pathogenesis of various diseases (Kalkhoven 2004), and there is increasing evidence that links p300 with diabetes (Chen *et al.* 2010). Consistent with our

findings, increased p300 mRNA levels have been found in the heart of STZ-induced diabetic mice (Kaur *et al.* 2006), leading the authors to conclude that p300 may play an important role in glucose- and diabetes-induced fibronectin synthesis. Moreover, curcumin decreases diabetes-induced oxidative stress in the kidney through reversion of p300 up-regulation in STZ-treated rats (Chiu *et al.* 2009). Indeed, it has been suggested that abnormal interactions between mutant transcription factors and p300 contribute to the pathogenesis of diabetes (Eeckhoutte *et al.* 2001, Fajans *et al.* 2001, Ban *et al.* 2002, Stanojevic *et al.* 2004, Fernandez-Zapico *et al.* 2009). The transcriptional regulation of *calt* expression in *S. aurata* does not necessarily apply to human *ALTI*. However, since a p300 putative response element is present in the human *ALTI* promoter, further research is needed to explore the relationship between the expression of p300, ALT, and diabetes in humans.

In conclusion, besides characterization for the first time of an *alt* promoter in animals other than humans, the results of the present study suggest a contribution of p300 and c-Myb to up-regulation of cAlt2 expression in the liver of *S. aurata* subjected to starvation. Our findings also argue for a role of p300 in up-regulation of cAlt2 in STZ-induced diabetic fish. Upcoming efforts will be addressed to unravel the specific mechanisms that govern alternative splicing of *calt* gene and cAlt1 transcription.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the MCYT (Spain) grants BIO2006-01857 and BIO2009-07589. I G Anemaet and J D González were recipients of FI-IQUC (Generalitat de Catalunya, Spain) and FPU (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain) fellowships.

Author contribution statement

I G Anemaet isolated the *calt* promoter, obtained reporter constructs, and performed transfection and EMSA studies. J D González, M C Salgado, and M Giralt developed the quantitative RT-PCR analysis. F Fernández, I V Baanante, I Metón, I G Anemaet, J D González, and M C Salgado performed fish treatments and obtained the samples. I Metón, F Fernández, and I V Baanante designed the experiments. I G Anemaet, I Metón, and I V Baanante analyzed the data and wrote the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Dr D Haro (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain), Dr Tso-Pang Yao (Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke

University, USA), and Dr Bernard Lüscher (Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany) for providing the p300, p300DY, and c-Myb expression vectors respectively.

References

- Abraham SE, Lobo S, Yaciuk P, Wang HG & Moran E 1993 p300, and p300-associated proteins, are components of TATA-binding protein (TBP) complexes. *Oncogene* **8** 1639–1647.
- Anemaet IG, Metón I, Salgado MC, Fernández F & Baanante IV 2008 A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40** 2833–2844.
- Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K & Seino Y 2002 Hepatocyte nuclear factor-1alpha recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. *Diabetes* **51** 1409–1418.
- Begum NA & Datta AG 1992 Effect of adrenergic agonists and antagonists on alanine amino transferase, fructose-1:6-bisphosphatase and glucose production in hepatocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **113** 93–103.
- Beug H, Hayman MJ & Graf T 1982 Myeloblasts transformed by the avian acute leukemia virus E26 are hormone-dependent for growth and for the expression of a putative myb-containing protein, p135 E26. *EMBO Journal* **1** 1069–1073.
- Castric J 1984 Obtention et étude de quelques caractéristiques d'une lignée cellulaire du bar, *Morone labrax* (Linné). Mémoire. Faculté des Sciences de Brest, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Chan HM & La Thangue NB 2001 p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of Cell Science* **114** 2363–2373.
- Chen S, Feng B, George B, Chakrabarti R, Chen M & Chakrabarti S 2010 Transcriptional co-activator p300 regulates glucose induced gene expression in the endothelial cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **298** E127–E137.
- Chiu J, Khan ZA, Farhangkhoei H & Chakrabarti S 2009 Curcumin prevents diabetes-associated abnormalities in the kidneys by inhibiting p300 and nuclear factor-kappaB. *Nutrition* **25** 964–972.
- Das C, Lucia MS, Hansen KC & Tyler JK 2009 CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459** 113–117.
- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS & Seeff LB 2000 Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clinical Chemistry* **46** 2050–2068.
- Eeckhoutte J, Formstecher P & Laine B 2001 Maturity-onset diabetes of the young type 1 (MODY1)-associated mutations R154X and E276Q in hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) gene impair recruitment of p300, a key transcriptional co-activator. *Molecular Endocrinology* **15** 1200–1210.
- Fajans SS, Bell GI & Polonsky KS 2001 Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *New England Journal of Medicine* **345** 971–980.
- Fernández F, Miquel AG, Cordoba M, Varas M, Metón I, Caseras A & Baanante IV 2007 Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **343** 1–10.
- Fernandez-Zapico ME, van Velkinburgh JC, Gutierrez-Aguilar R, Neve B, Froguel P, Urrutia R & Stein R 2009 MODY7 gene, KLF11, is a novel p300-dependent regulator of Pdx-1 (MODY4) transcription in pancreatic islet beta cells. *Journal of Biological Chemistry* **284** 36482–36490.

- Fisher SJ & Kahn CR 2003 Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *Journal of Clinical Investigation* **111** 463–468.
- Fynn-Aikins K, Hughes SG & Vandenberg GW 1995 Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Physiology* **111** 163–170.
- Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Soutter HM *et al.* 2000 Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nature Genetics* **24** 300–303.
- Ghosh AK & Varga J 2007 The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. *Journal of Cellular Physiology* **213** 663–671.
- Glinghammar B, Rafter I, Lindstrom AK, Hedberg JJ, Andersson HB, Lindblom P, Berg AL & Cotgreave I 2009 Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *International Journal of Molecular Medicine* **23** 621–631.
- Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong EG, Fisch S, Haldar S, Cline GW, Kim JK, Peroni OD, Kahn BB *et al.* 2007 Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. *Cell Metabolism* **5** 305–312.
- Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Kempf J, Zinman B & Haffner SM 2004 Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* **53** 2623–2632.
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA *et al.* 1998 Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Research* **26** 362–367.
- Iacobellis G, Moschetta A, Buzzetti R, Ribaldo MC, Baroni MG & Leonetti F 2007 Aminotransferase activity in morbid and uncomplicated obesity: predictive role of fasting insulin. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases* **17** 442–447.
- Ishiguro M, Takio K, Suzuki M, Oyama R, Matsuzawa T & Titani K 1991 Complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT) determined by a combination of conventional and mass spectral methods. *Biochemistry* **30** 10451–10457.
- Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E & Yao TP 2001 p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO Journal* **20** 1331–1340.
- Jadhao SB, Yang RZ, Lin Q, Hu H, Anania FA, Shuldiner AR & Gong DW 2004 Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology* **39** 1297–1302.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W & Renold AE 1969 Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation* **48** 2129–2139.
- Kalkhoven E 2004 CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochemical Pharmacology* **68** 1145–1155.
- Kasper LH, Boussouar F, Ney PA, Jackson CW, Reh J, van Deursen JM & Brindle PK 2002 A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature* **419** 738–743.
- Kauppi M, Murphy JM, de Graaf CA, Hyland CD, Greig KT, Metcalf D, Hilton AA, Nicola NA, Kile BT, Hilton DJ *et al.* 2008 Point mutation in the gene encoding p300 suppresses thrombocytopenia in *Mpl*^{-/-} mice. *Blood* **112** 3148–3153.
- Kaur H, Chen S, Xin X, Chiu J, Khan ZA & Chakrabarti S 2006 Diabetes-induced extracellular matrix protein expression is mediated by transcription coactivator p300. *Diabetes* **55** 3104–3111.
- Like AA & Rossini AA 1976 Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* **193** 415–417.
- Lindblom P, Rafter I, Copley C, Andersson U, Hedberg JJ, Berg AL, Samuelsson A, Hellmold H, Cotgreave I & Glinghammar B 2007 Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum – differential tissue expression using novel antibodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **466** 66–77.
- Marmorstein R & Trievel RC 2009 Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochimica et Biophysica Acta* **1789** 58–68.
- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F & Baanante IV 1999 Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* **82** 223–232.
- Metón I, Egea M, Fernández F, Eraso MC & Baanante IV 2004 The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Letters* **566** 251–254.
- Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F & Baanante IV 2006 Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* **147** 3446–3456.
- Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB & Kaplowitz N 2005 Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* **41** 380–382.
- Oelgeschläger M, Krieg J, Luscher-Firzlaff JM & Luscher B 1995 Casein kinase II phosphorylation site mutations in c-Myb affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M. *Molecular and Cellular Biology* **15** 5966–5974.
- Ramsay RG 2005 c-Myb a stem-progenitor cell regulator in multiple tissue compartments. *Growth Factors* **23** 253–261.
- Rosen F, Roberts NR & Nichol CA 1959 Glucocorticosteroids and transaminase activity. I. Increased activity of glutamicpyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **234** 476–480.
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Garcia-Salguero L, de la Higuera M & Lupianez JA 1998 Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30** 55–63.
- Sandberg ML, Sutton SE, Pletcher MT, Wiltshire T, Tarantino LM, Hogenesch JB & Cooke MP 2005 c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Developmental Cell* **8** 153–166.
- Sano Y & Ishii S 2001 Increased affinity of c-Myb for CREB-binding protein (CBP) after CBP-induced acetylation. *Journal of Biological Chemistry* **276** 3674–3682.
- Sattar N, McConnachie A, Ford I, Gaw A, Cleland SJ, Forouhi NG, McFarlane P, Shepherd J, Cobbe S & Packard C 2007 Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes* **56** 984–991.
- Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ & Diamant M 2007 Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* **191** 391–396.
- Shiama N 1997 The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends in Cell Biology* **7** 230–236.
- Sohocki MM, Sullivan LS, Harrison WR, Sodergren EJ, Elder FF, Weinstock G, Tanase S & Daiger SP 1997 Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3. cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites. *Genomics* **40** 247–252.
- Stanojevic V, Habener JF & Thomas MK 2004 Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300. *Endocrinology* **145** 2918–2928.

- Swope DL, Mueller CL & Chrivia JC 1996 CREB-binding protein activates transcription through multiple domains. *Journal of Biological Chemistry* **271** 28138–28145.
- Thulin P, Rafter I, Stockling K, Tomkiewicz C, Norjavaara E, Aggerbeck M, Hellmold H, Ehrenborg E, Andersson U, Cotgreave I *et al.* 2008 PPARalpha regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **231** 1–9.
- Tomita A, Towatari M, Tsuzuki S, Hayakawa F, Kosugi H, Tamai K, Miyazaki T, Kinoshita T & Saito H 2000 c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene* **19** 444–451.
- Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C & Tataranni PA 2002 High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* **51** 1889–1895.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L & Whincup PH 2005 Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* **28** 2913–2918.
- West J, Brousil J, Gazis A, Jackson L, Mansell P, Bennett A & Aithal GP 2006 Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *QJM* **99** 871–876.
- Wilson GL & Leiter EH 1990 Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **156** 27–54.
- Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR & Gong DW 2002 cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* **79** 445–450.
- Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L & Gong DW 2009 Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology* **49** 598–607.

Received in final form 16 June 2010

Accepted 22 June 2010

Made available online as an Accepted Preprint 23 June 2010



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel



A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*

Ida G. Anemaet^a, Isidoro Metón^a, María C. Salgado^a,
Felipe Fernández^b, Isabel V. Baanante^{a,*}

^a Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2008
Received in revised form 29 May 2008
Accepted 30 May 2008
Available online 6 June 2008

Keywords:

Alanine aminotransferase
Alternative splicing
Diabetes
Gluconeogenesis
Sparus aurata
Streptozotocin

ABSTRACT

Increased alanine aminotransferase (ALT) activity is associated with insulin resistance and the development of type 2 diabetes. The aim of this study was to characterize the modulation of cytosolic ALT expression in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under conditions associated with increased gluconeogenesis and in streptozotocin (STZ)-treated fish. RT- and RACE-PCR assays allowed us to isolate a novel ALT isozyme (cALT2) generated from alternative splicing of cALT gene in *S. aurata*. HEK293 cells transfected with constructs expressing cALT2 as a C-terminal fusion with the enhanced green fluorescent protein allowed us to demonstrate that cALT2 is cytosolic. To unravel the molecular functions of cALT1 and cALT2 in liver of *S. aurata*, we examined tissue distribution, kinetic characterization of piscine cALT isozymes expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, and regulation of hepatic cALT1 and cALT2 expression in various metabolic conditions. Kinetic analysis indicates that cALT2 is more efficient in catalysing the conversion of L-alanine to pyruvate than cALT1. Starvation increased cALT2 expression and decreased cALT1 mRNA in liver. Opposite effects were found in regularly fed fish at postprandial time 4–8 h, and 6 h after treatment with glucose or insulin. From these results we conclude that increased cALT2 expression occurred in liver under gluconeogenic conditions, while cALT1 was predominant during postprandial utilization of dietary nutrients. Since up-regulation of hepatic cALT2 expression occurred in STZ-induced diabetic *S. aurata*, increased hepatic cALT2 expression may be a promising marker in the prognosis of diabetes.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alanine aminotransferase (ALT, glutamate pyruvate transaminase, EC 2.6.1.2) is a pyridoxal-dependent enzyme that links carbohydrate and amino acid metabolism through the catalysis of reversible transamination between L-alanine and 2-oxoglutarate to form pyruvate and L-glutamate. Increased ALT activity is observed in rat liver

under conditions associated with enhanced gluconeogenesis, such as high protein intake, fasting, diabetes and treatment with hydrocortisone (Rosen et al., 1959, 1963). The presence of ALT isoforms in the cytosol and mitochondria has been proposed on the basis of biochemical studies (De Rosa and Swick, 1975). Nevertheless, the functional role of ALT isozymes in the cell remains unclear. Two ALT isoforms, ALT1 and ALT2, each encoded by a different gene, have been cloned from humans and mice (Sohocki et al., 1997; Yang et al., 2002; Jadhao et al., 2004). Human ALT1 gene was cloned from the amino acid sequence of liver cytosolic ALT (Sohocki et al., 1997), whereas the subcellular

* Corresponding author. Tel.: +34 934024521; fax: +34 934024520.
E-mail address: baanantevazquez@ub.edu (I.V. Baanante).

localization of mammalian ALT2 remains unknown. In humans, Western blot and immunohistochemistry studies indicate that ALT1 is expressed mainly in liver, skeletal muscle and kidney, and to a lesser extent in heart. ALT2 is found mainly in heart and skeletal muscle (Lindblom et al., 2007).

Increased ALT activity values in serum are associated with a variety of liver diseases including hepatitis, cirrhosis or drug hepatotoxicity (Sherman, 1991; Dufour et al., 2000), and other pathologies such as the metabolic syndrome and obesity (Wannamethee et al., 2005; Iacobellis et al., 2007), muscle diseases (Nathwani et al., 2005), cardiovascular disease (Schindhelm et al., 2007) and type 1 diabetes (Thakran et al., 2003; West et al., 2006). Recent years have witnessed a growing number of reports supporting the hypothesis that an increased serum ALT activity level within the normal range is a marker for the development of type 2 diabetes (Vozarova et al., 2002; Hanley et al., 2004; West et al., 2006; Sattar et al., 2007). Although the molecular mechanism behind this effect remains unclear, excess deposition of fat in liver leads to non-alcoholic fatty liver disease, increased ALT activity, and appears to contribute to development of insulin resistance and type 2 diabetes (Westerbacka et al., 2004; Schindhelm et al., 2006; Chang et al., 2007).

We recently reported the cloning and subcellular localization of cytosolic and mitochondrial ALT isozymes, named cALT and mALT, respectively, in the liver of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) (Metón et al., 2004). In the present study, we identified two transcripts resulting from alternative splicing of *S. aurata* cALT gene, herein named cALT1 and cALT2. To unravel the metabolic role of cALT isoforms in the piscine liver, we examined the nutritional and hormonal regulation of hepatic cALT1 and cALT2 expression. Our findings provide evidence that these two isozymes participate in opposite metabolic conditions in liver.

2. Methods

2.1. Experimental animals

Gilthead sea bream (*S. aurata*) obtained from Tina-menor (Cantabria, Spain) were maintained, at 20 °C, in 260-L aquaria as described (Fernández et al., 2007). The diet supplied contained 46% protein, 9.3% carbohydrates, 22% lipids, 10.6% ash, 12.1% moisture and 21.1 kJ/g gross energy. Unless stated otherwise, fish were fed 25 g/kg body weight (BW) once a day (10 a.m.). To prevent stress, fish were anesthetized with MS-222 (1:12,500) before handling (9:30 a.m.). Fish were killed by cervical section, blood was collected and tissue samples were dissected out, immediately frozen in liquid N₂, and kept at –80 °C until use. The experimental procedures complied with the guidelines of the Animal Use Committee of the Universitat de Barcelona.

2.2. Molecular cloning of cALT2 from liver of *S. aurata*

RT-PCR assays performed with oligonucleotides IGAL105 and IGAL15 (Table 1) on total RNA from liver of *S. aurata* resulted in the amplification of a 339 bp fragment. Sequence analysis of this fragment using ABI Prism BigDye

Table 1
Primers used in the present study

Primers	Sequence 5' to 3'
IGAL1	GG <u>AAGCTT</u> AAAAATGTCTCACCAGCGCGGAACGGGGTC
IGAL2C	GG <u>AAGCTT</u> AAAAATGTCTCAGATATCAGTCCAGAGGGTG
IGAL2Cd1	GG <u>AAGCTT</u> AAAAATGTCTAACAAACAAACAAACAAAC AAAAACAACATGTCCCACCG
IGAL2CmN	GG <u>AAGCTT</u> AAAAATGTCTCAGATATCAGTCCAGAGGGTGA CAGCGCGGAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAAAGC AGCAATGTCCCACCGCGCGGAAC
IGAL15	CCCTCCCTCAGTCTCTCTATCTGC
IGAL20	G <u>AGGATCCT</u> TGGGGTTGTATGAGAAGCTCTTG
IGAL105	GACGACAAACAGCAGCGGAGCC
IGAL305	CTGCTACTCCTCAACCTCTCTTC
IGALD	G <u>AGCTAGC</u> CAACATGTTTCAGATATCAGTCCAGAGGGTG
IGALR2	G <u>AGGATCCT</u> TGAGAAGCTCTTGTGTGAAGCG

The following primers contain restriction sites (bold and underlined): IGAL20 and IGALR2 BamHI; IGAL1, IGAL2C, IGAL2Cd1, IGAL2Cd14 and IGAL2CmN HindIII; IGALD NheI.

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), allowed us to design oligonucleotides to complete the isolation of cALT2 mRNA with the SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). DNA fragments generated by 5' and 3'-RACE-PCR were sequenced on both strands. The full-coding sequence of cALT2 was amplified by RT-PCR using total RNA from *S. aurata* liver as template and oligonucleotides IGAL305 and IGAL20 (Table 1). The amplified fragment was ligated into pGEM-T Easy (Promega, Southampton, UK) to generate pGEMcALT2.

2.3. Expression plasmids

The coding sequence of cALT2, obtained by PCR using primer pair IGALD/IGALR2 (Table 1) and pGEMcALT2 as template, was ligated into pEGFP-N1 (Clontech), previously digested with BamHI and NheI, to generate pcALT2-GFP. Constructs pcALT1-GFP and pmALT-GFP are reported elsewhere (Metón et al., 2004). To express cALT isozymes in *Saccharomyces cerevisiae*, cALT1, cALT2, cALT2Δ3-13 and cALT2N14-23A cDNAs were cloned into the GAL-inducible pYES2 vector (Invitrogen, Paisley, UK). Constructs pYcALT1, pYcALT2, pYcALT2Δ3-13 and pYcALT2N14-23A were generated by PCR using primer pairs IGAL1/IGAL20, IGAL2C/IGAL20, IGAL2Cd1/IGAL20 and IGAL2CmN/IGAL20, respectively (Table 1), and pGEMcALT2 as template. The PCR products were digested with BamHI and HindIII and ligated into pYES2, previously digested with the same enzymes. All constructs were verified by sequencing.

2.4. Confocal fluorescence microscopy

Human kidney-derived HEK293 cells were cultured on glass coverslips at 37 °C under 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamine and 110 mg/mL sodium pyruvate. Cells grown to 45–50% confluence in 6-well plates were transiently transfected with 4 µg of the corresponding GFP-fusion protein construct using the calcium phosphate co-precipitation method. For mitochondrial staining, 48 h

post-transfection the cells were incubated for 45 min at 37 °C in the presence of 1 μ M Mitotracker[®] Red CM-H₂XRos (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, mounted in Mowiol (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and examined by sequential excitation at 488 nm (GFP) and 543 nm (Mitotracker) by laser scanning confocal fluorescence microscopy (Olympus Fluoview FV600, Olympus, Middlesex, UK). The images were acquired and merged using Fluoview software (Olympus).

2.5. Semi-quantitative RT-PCR assay

Five micrograms of total RNA isolated from tissue samples of *S. aurata* was retrotranscribed by incubation with Moloney murine leukemia virus RT (Invitrogen) for 60 min at 37 °C in the presence of random hexamer primers. The RT product was subjected to PCR amplification using primers IGAL105 and IGAL15 (Table 1). Between 20 and 38 cycles were performed to verify that PCR products amplified linearly without saturation of the signal. A 711-bp fragment of *S. aurata* β -actin was amplified with primers BA0199 and BA0299 (Metón et al., 2006) as an internal control for quality and quantity of RNA. Aliquots of each reaction were electrophoresed on 2.5% agarose gels. Band intensities were compared by imaging of ethidium bromide staining.

2.6. Yeast growth and transformation

S. cerevisiae putative cytosolic ALT deletion strain YDR111c (Euroscarf, Frankfurt, Germany; genotype BY4743; Mat a/ α a; α /a; his3 Δ 1; his3 Δ 1; leu2 Δ 0/1eu2 Δ 0; lys2 Δ 0/LYS2; MET15/met15 Δ 0; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; YDR111c::kanMX4/YDR111c::kanMX4) was transformed using the lithium acetate procedure (Schiestl and Gietz, 1989). Transformed yeasts were grown in complete minimal medium (5 g/L (NH₄)₂SO₄, 1.7 g/L yeast nitrogen base and 0.77 g/L yeast dropout powder) lacking uracil (CM-URA) with 2% glucose as carbon source until OD₆₀₀ = 1. Thereafter, GAL1-promoter activity of pYcALT1, pYcALT2, pYcALT2 Δ 3-13 and pYcALT2N14-23A was induced by removing the glucose-containing medium and adding CM-URA supplemented with 2% galactose for 20 h at 30 °C. To recover protein extracts, cells were sedimented at 3000 \times g for 5 min at 4 °C, washed and resuspended in 150 mM KCl, 5 mM Tris–HCl, pH 7.2, and a protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich). One volume of cold acid-washed glass beads (Sigma–Aldrich) was added. Cells were disrupted by vigorous vortexing and homogenates were centrifuged at 500 \times g for 5 min at 4 °C. The resulting supernatants were centrifuged at 11,000 \times g for 10 min at 4 °C. Soluble fractions were collected, desalted through a Sephadex G-50 column, immediately frozen and stored at –40 °C.

2.7. Enzyme assays

The reaction in the direction of L-glutamate formation (forward reaction) was measured at 30 °C in a Cobas Mira S spectrophotometric analyser (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) by monitoring oxidation of NADH at 340 nm

in a mix containing 0.1 M Tris–HCl, pH 7.2, 500 mM L-alanine, 50 mM 2-oxoglutarate, 0.18 mM NADH, 1.4 U/mL lactate dehydrogenase, and desalted yeast protein extract. To determine the reaction in the direction of L-alanine formation (reverse reaction), oxidation of NADH was followed at 340 nm and 30 °C in a mix containing 0.1 M Tris–HCl pH 7.8, 25 mM L-glutamate, 5 mM pyruvate, 0.18 mM NADH, 10.04 U/mL glutamate dehydrogenase, 33 mM ammonium sulfate, and desalted yeast protein extract. For both reactions, measured in conditions of maximal activity, a unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme consuming 1 μ mol of NADH per min. Protein content in yeast extracts was determined by the Bradford method at 30 °C using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

For kinetic studies, the forward and reverse reactions were determined at varying substrate concentrations. The initial velocity was determined for each combination of substrate concentrations and plotted in a Lineweaver–Burk (double-reciprocal) plot. The resulting plots were used to calculate the kinetic parameters of 2–4 enzyme preparations. The pH optimum for enzyme activities was determined between 4.0 and 9.3 in protein extracts from yeast expressing cALT1 or cALT2.

2.8. Western blot analysis

One hundred micrograms of protein extract was loaded per lane of a polyacrylamide gel and electrophoresed in the presence of sodium dodecyl sulfate. After electrophoresis the gel was equilibrated in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3) and electroeluted onto NytranN nylon membranes (Whatman, Kent, UK) for 3 h at 60 V and 4 °C. Following the Immun-Star[™] Substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) procedure, a rabbit polyclonal antibody raised against a common domain of *S. aurata* cALT isozymes (1:500) was used as primary antibody to detect cALT1 and cALT2 expression in transformed yeast or cytosolic and mitochondrial fractions from transfected HEK293 cells.

2.9. Statistics

Data were analysed by one-factor analysis of variance using a computer program (StatView, Cary, NC, USA). Differences were determined by Fisher's PLSD multiple range test.

3. Results

3.1. Alternative splicing generates cALT1 and cALT2

To characterize the expressional control of cALT gene, RT-PCR assays were performed on total RNA isolated from liver of *S. aurata* using several combinations of oligonucleotides as primers. When the forward oligonucleotide corresponded to the upstream part of the 5'-untranslated region of cALT, two products were amplified. Using oligonucleotides IGAL105 and IGAL15, the most abundant amplicon (244 bp) presented the size expected for the previously reported cALT (Metón et al., 2004), while lower levels of a larger product (339 bp) were also detected. Sequence anal-

Spa cALT2	-----MFQISVQVRVTAENNNNNNNKNNMSHQAAANGVPC-----	RGKVLTVDDNMNPRVKKVVEYA	54
Spa cALT1	-----MSHQAAANGVPC-----	RGKVLTVDDNMNPRVKKVVEYA	31
Hom ALT1	-----MASSTGDRSQAVRHGL-----	RAKVLTLDDGMNPRVRRVVEYA	36
Mus ALT1	-----MASQRNDRIQASRNGL-----	KGKVLTLDDTMNPRVRRVVEYA	36
Spa mALT	MSATRMQLLSPRNVRLLSRGRSELFAGGSGGGPRVRSLSPLSSSSPGRALSSVSATRRCPLPKEKMTENGVSRRKVLTLTDDTMNPRVKKVVEYA		94
Hom ALT2	-----MQRAAALVRRGCGPRTFSSWGRSQSSAAAEASAVLKVRPER--	SRRRRLTLESMMNPQVKAVEYA	63
Mus ALT2	-----MQRAAALVRRGCGPRASGPGWRSHSSAAAEASAAALKVRPER--	SPRDRILTLESMMNPQVKAVEYA	63

Fig. 1. Multiple alignment of the predicted N-terminus of *S. aurata* cALT2, cALT1 and mALT proteins with those reported for humans and mice. Alignment was generated with Clustal W. Black, identical amino acids; grey, conservative amino acid substitutions. The position of the extra exon in *S. aurata* cALT2 is boxed. GenBank entries shown are: Spa cALT2, *Sparus aurata* cALT2 (DO334748); Spa cALT1, *Sparus aurata* cALT1 (AY206502); Hom ALT1, *Homo sapiens* ALT1 (U70732); Mus ALT1, *Mus musculus* ALT1 (NM.182805); Spa mALT, *Sparus aurata* mALT (AY206503); Hom ALT2, *Homo sapiens* ALT2 (AY029173); Mus ALT2, *Mus musculus* ALT2 (NM.173866).

ysis confirmed that the smaller transcript corresponded to cALT, whereas the larger product corresponded to a messenger that included the open reading frame (ORF) of cALT plus an insertion sequence of 85 bp (herein named exon 1a). From these results, we hypothesized that alternative splicing generates two cALT isoforms: cALT1, excluding exon 1a and corresponding to the previously reported cALT (Metón et al., 2004); and cALT2, a newly described isoform that includes exon 1a. RACE-PCR experiments allowed us to isolate a cALT2 mRNA that encodes a full-length cALT2 protein and confirm that it encompasses the nucleotide sequence of cALT1 plus exon 1a. The presence of exon 1a results in a distinct translation start site for cALT2. Therefore, cALT2 mRNA contains a 1545-bp ORF with a deduced amino acid sequence of 514 residues and a calculated molecular mass of 57.510 kDa. Alignment of the inferred N-terminus of cALT2 protein with other ALT isoforms reported for *S. aurata*, humans and mice is shown in Fig. 1. The nucleotide sequence corresponding to cALT2 was submitted to the DDJB/EMBL/GenBank databases under the accession number DQ334748.

3.2. Tissue distribution of cALT isozymes in *S. aurata*

Semi-quantitative RT-PCR performed on total RNA isolated from several tissues of regularly fed *S. aurata* showed that cALT1 is expressed mainly in liver, brain, skeletal muscle, intestine and kidney. No expression of cALT1 was detected in heart, gill or spleen. In contrast, maximal expression of cALT2 occurred in these three organs. Moderate expression levels of cALT2 were also observed in intestine, kidney and liver. The lowest cALT2 mRNA abundance was detected in brain and skeletal muscle (Fig. 2).

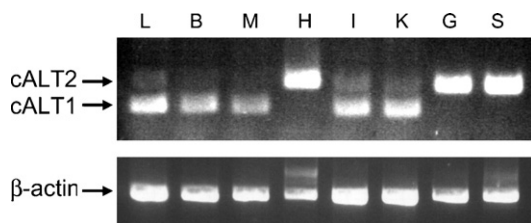


Fig. 2. Tissue expression profile of *S. aurata* cALT1 and cALT2 messengers. Total RNA obtained from liver (L), brain (B), skeletal muscle (M), heart (H), intestine (I), kidney (K), gill (G) and spleen (S) of regularly fed fish was reverse transcribed and submitted to PCR using primer pairs for cALT1, cALT2 or β -actin. PCR products were size fractionated by electrophoresis on a 2.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

3.3. cALT2 is a cytosolic enzyme

To assess the subcellular localization of cALT2, the enhanced green fluorescent protein (GFP) was fused to the C-terminus of cALT2. Localization of the resulting GFP-fusion protein (cALT2-GFP) was analysed in transiently transfected HEK293 cells by confocal fluorescence microscopy. Forty-eight hours after transfection, cALT2-GFP showed a diffused distribution in the cells and did not colocalize with the mitochondrial marker MitoTracker, thereby indicating cytosolic localization (Fig. 3A). Western blots carried out with a polyclonal antibody against *S. aurata* cALT isoforms, and performed on cytosolic and mitochondrial fractions isolated from HEK293 cells transfected with cALT2-GFP, confirmed that cALT2 is a cytosolic protein (Fig. 3B). As previously reported, confocal fluorescence microscopy and Western blots showed cytosolic and mitochondrial localization for cALT1-GFP and mALT-GFP, respectively, in transfected HEK293 cells (Metón et al., 2004).

3.4. Kinetic properties of *S. aurata* cALT1 and cALT2

S. cerevisiae strain YDR111c was chosen as an expression system because it presents a deletion involving the putative yeast cytosolic ALT gene. Enzyme activity and immunodetectable levels of cALT1 and cALT2 were analysed in protein extracts isolated from yeast transformed with pYcALT1 and pYcALT2 expression constructs. The production of *S. aurata* proteins in yeast transformants was checked by Western blot using a polyclonal antibody against *S. aurata* cALT isozymes. Yeast transformants with pYcALT1 and pYcALT2 expressed proteins with estimated molecular masses of 55 kDa for cALT1 and 57 kDa for cALT2, respectively (Fig. 4A). No specific proteins were immunodetected in yeast transformed with the empty vector.

Maximal activity for both isozymes was observed at pH 7.2 and 7.8 for the forward and reverse reaction, respectively. In conditions of maximal activity, ALT specific activity in yeast expressing cALT1 increased 5- and 17-fold for the forward and reverse reaction, respectively, compared to cells transformed with pYES2. Transformation with cALT2 expression vector induced ALT activity 32- and 8-fold for the forward and reverse reaction, respectively (Fig. 4B). On the basis of these results, we postulated that in the conditions studied cALT1 preferentially catalyses the reverse reaction, whereas cALT2 is more efficient in catalysing the forward reaction. To test this hypothesis, the forward/reverse ALT activity ratio was determined in the presence of a range of concentrations of the four substrates.

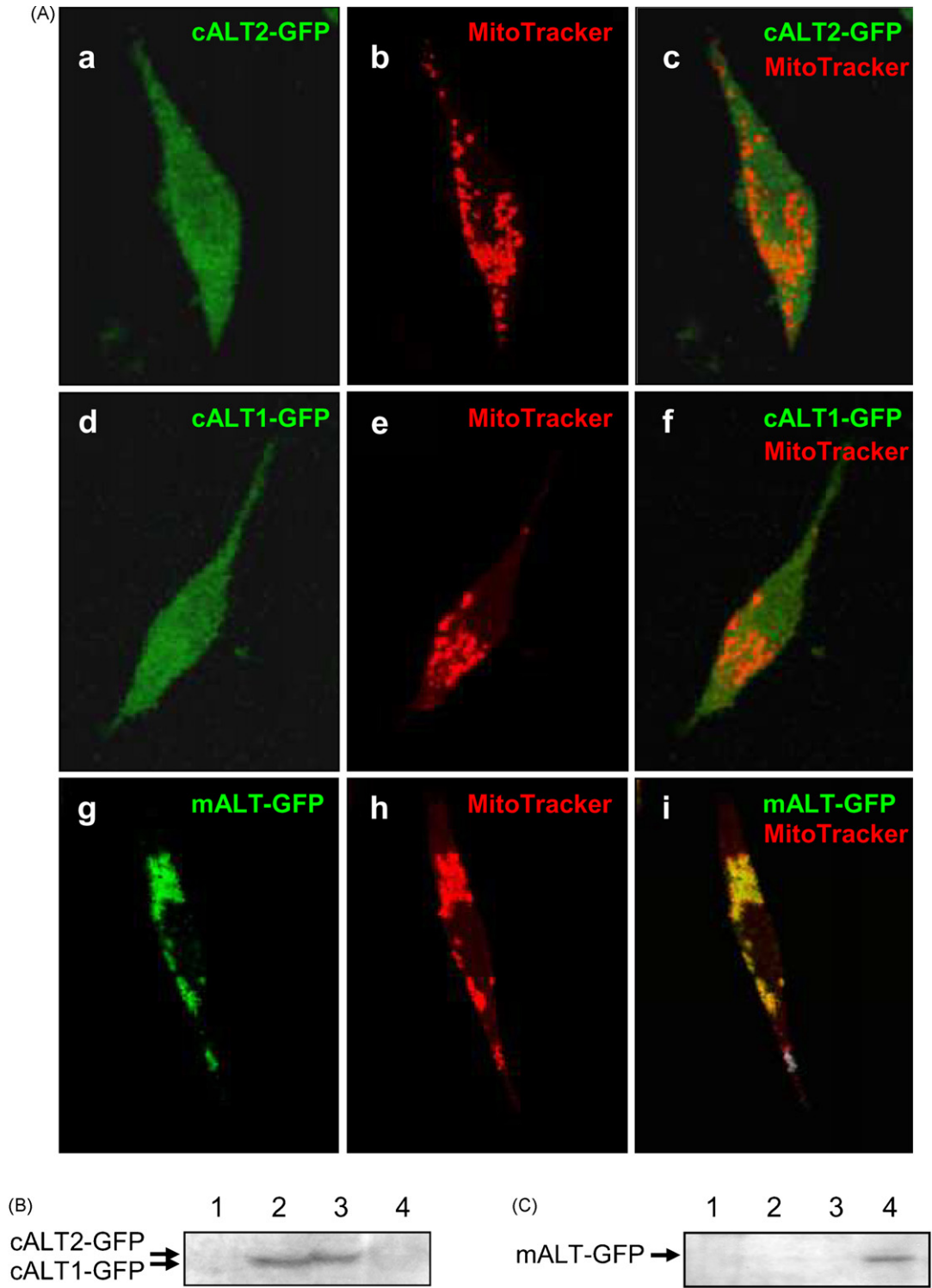


Fig. 3. Subcellular localization of cALT2. (A) HEK293 cells grown on coverslips were transiently transfected with pcALT2-GFP (a–c), pcALT1-GFP (d–f) or pmALT-GFP (g–i), cultured for 48 h and stained with the mitochondrial marker MitoTracker® Red CM-H₂XRos. (a, d and g) Green fluorescence from EGFP; (b, e and h) red fluorescence from CM-H₂XRos staining; (c, f and i) merged images. (B) Immunodetection of cALT-fusion proteins in cytosolic fractions of non-transfected HEK293 cells (lane 1) and cells transfected with pcALT1-GFP (lane 2), pcALT2-GFP (lane 3) or pmALT-GFP (lane 4). (C) Immunodetection of cALT-fusion proteins in mitochondrial fractions of non-transfected HEK293 cells (lane 1) and cells transfected with pcALT1-GFP (lane 2), pcALT2-GFP (lane 3) or pmALT-GFP (lane 4). (For interpretation of the references to color in the figure caption, the reader is referred to the web version of the article.)

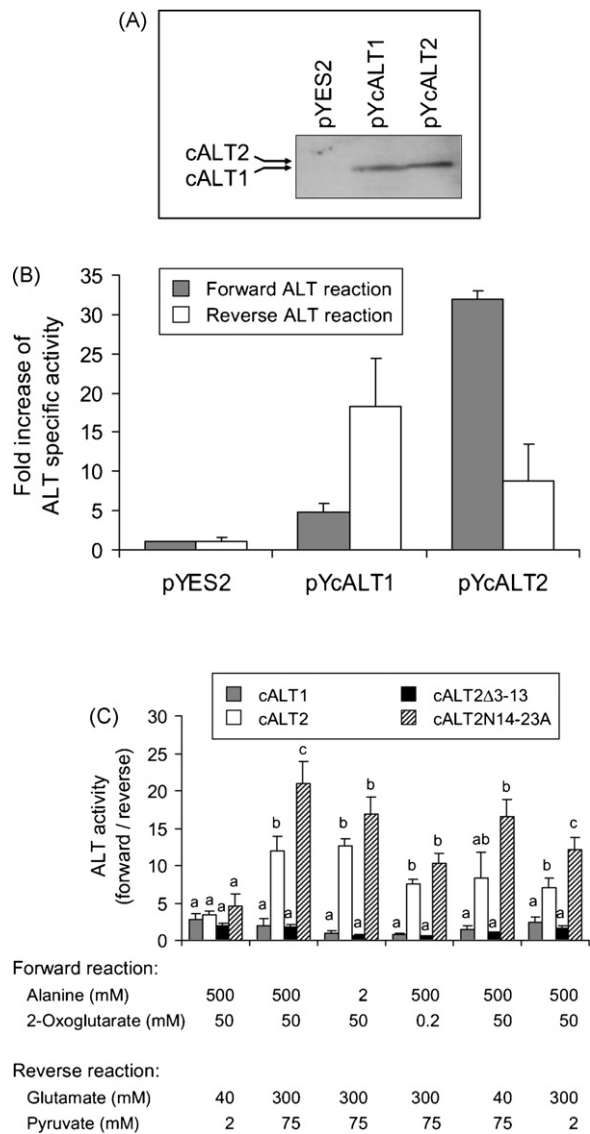


Fig. 4. Expression of cALT1 and cALT2 in yeast. (A) Immunodetectable levels of cALT isozymes in protein extracts obtained from yeast grown 24 h at 30 °C after transformation with the empty vector (pYES2), pYcALT1 or pYcALT2. (B) Levels of forward and reverse ALT activities in desalted protein extracts from yeast expressing the empty vector (pYES2), pYcALT1 or pYcALT2. ALT specific activity in yeast transformed with pYES2 was set at 1. Data are expressed as mean \pm S.D. of duplicate determinations in three desalted yeast protein extracts. (C) Effect of substrate concentration on the ratio forward ALT reaction (L-alanine to L-glutamate formation) over reverse ALT reaction (L-glutamate to L-alanine formation) for *S. aurata* cALT1, cALT2 and mutant proteins cALT2 Δ 3-13 and cALT2N13-24A. Forward and reverse reactions were analysed in desalted protein extracts from yeast expressing cALT isozymes at the indicated concentrations of L-alanine and 2-oxoglutarate for the forward reaction, and of L-glutamate and pyruvate for the reverse reaction. The values are expressed in means \pm S.D. of at least three desalted protein extracts obtained from yeast expressing cALT1, cALT2, cALT2 Δ 3-13 or cALT2N13-24A. Different letters indicate significant differences among cALT isozymes for each condition ($P < 0.001$).

In all the conditions assayed, cALT2 showed higher forward/reverse ALT activity ratios than cALT1 (Fig. 4C).

To confirm that the sequence of 23 amino acids encoded by exon 1a at N-terminus of cALT2 was responsible for differences between cALT isozymes in catalysing the forward or reverse reaction, the forward/reverse ALT activity ratio was calculated at several substrate concentrations for two cALT2 mutant proteins: cALT2 Δ 3-13, which lacks residues 3-13; and cALT2N14-23A, where asparagines 14-20 and 22-23 were substituted by alanine residues. Deletion of amino acids 3-13 turned cALT2 Δ 3-13 into an enzyme with the same behaviour than cALT1, while substitution of the polyasparagine domain by alanines (cALT2N14-23A) did not modify or even exacerbate the preference for catalysing the forward reaction (Fig. 4C).

Kinetic analysis of cALT1 and cALT2 was performed on desalted protein extracts from yeast transformants. Considering the forward reaction, the kinetic plots for cALT1 and cALT2 were hyperbolic when the activity was represented as a function of L-alanine or 2-oxoglutarate concentration. As described for other ALTs, double-reciprocal plots indicated that the mechanism of reaction is of the ping-pong type (Fig. 5A-D). K_m values for L-alanine and 2-oxoglutarate were similar for cALT1 and cALT2. However, cALT2 exhibited a V_{max} more than 250-fold higher than that of cALT1 (Table 2).

The behaviour of cALT1 and cALT2 also differed when the reverse reaction was considered. Kinetic plots of cALT1 for the reverse reaction were hyperbolic (Fig. 6A and B). In contrast, representation of double-reciprocal plots showed strong double competitive substrate inhibition for cALT2 (Fig. 6C and D). Compared to cALT2, cALT1 presented higher K_m values for L-glutamate and pyruvate (3.5- and 4.5-fold, respectively).

Oxamate is a potent inhibitor of pyridoxal phosphate-dependent enzymes (Vedavathi et al., 2004). Oxamate displayed a mixed-type inhibition of the forward reaction for both cALT isozymes. K_i (calculated from slope $_{1/S}$ versus $[I]$ replot) and K_j (calculated from $1/\nu$ -axis intercept versus $[I]$ replot), determined from data with L-alanine as the variable substrate, were similar for cALT1, while the uncompetitive component of the inhibition was more important for cALT2. The cALT1 and cALT2 reverse reactions were less affected by the inhibitor (Fig. 7A and B). The inhibition of the reverse reaction of cALT2 by oxamate was uncompetitive with L-glutamate. We did not determine inhibitory constants of oxamate on cALT1 activity due to the low effect of oxamate on the cALT1 reverse reaction at the highest inhibitor concentration tested (200 mM).

3.5. Nutritional and hormonal regulation of cALT1 and cALT2 expression

To analyse the functional role of cALT1 and cALT2 in hepatic intermediary metabolism, we addressed the effect of nutritional status and hormonal regulation on the expression of these two isozymes in liver of *S. aurata*. Semi-quantitative RT-PCR assays showed that cALT1 and cALT2 mRNA levels were differently affected by starvation and refeeding. Starvation significantly decreased cALT1 mRNA to 50% of the values observed in fed animals, whereas cALT2 expression increased 2.5-fold. Short-term

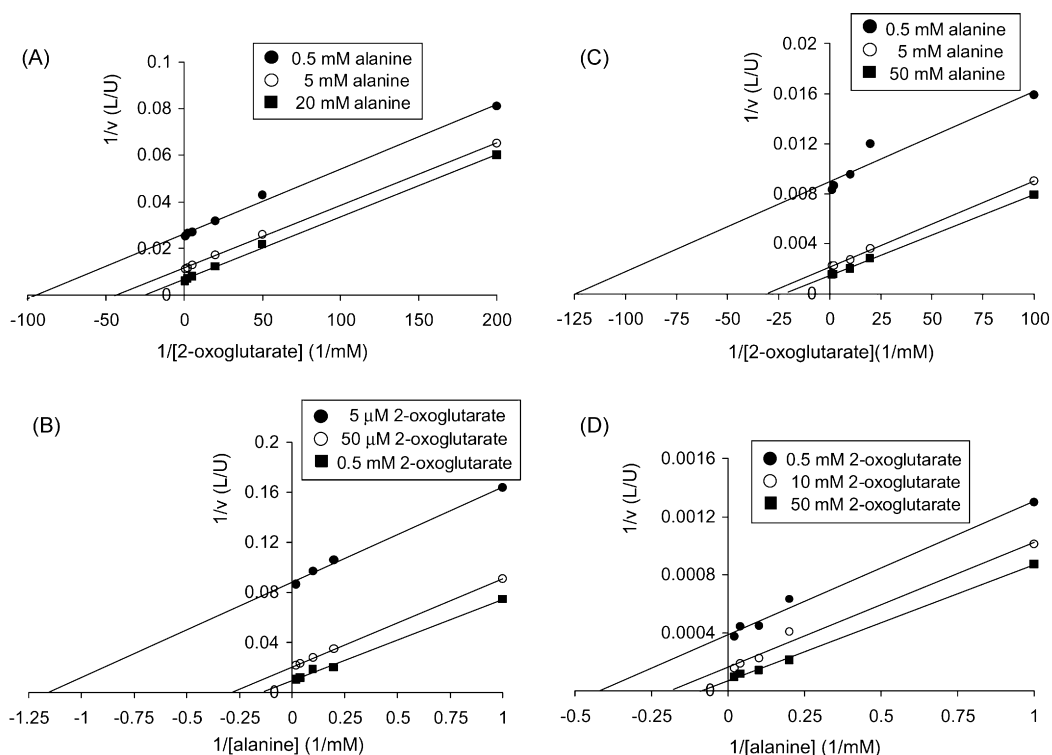


Fig. 5. Saturation kinetics for 2-oxoglutarate and L-alanine of *S. aurata* cALT1 and cALT2. (A) Saturation kinetics for 2-oxoglutarate of cALT1. ALT activity was assayed (forward reaction) by varying 2-oxoglutarate levels in the presence of 0.5 mM (●), 5 mM (○) or 20 mM (■) L-alanine. (B) Saturation kinetics for L-alanine of cALT1. ALT activity was assayed (forward reaction) by varying L-alanine levels in the presence of 5 μM (●), 50 μM (○) or 0.5 mM (■) 2-oxoglutarate. (C) Saturation kinetics for 2-oxoglutarate of cALT2. ALT activity was assayed (forward reaction) by varying 2-oxoglutarate levels in the presence of 0.5 mM (●), 5 mM (○) or 50 mM (■) L-alanine. (D) Saturation kinetics for L-alanine of cALT2. ALT activity was assayed (forward reaction) by varying L-alanine levels in the presence of 0.5 mM (●), 10 mM (○) or 50 mM (■) 2-oxoglutarate. Double-reciprocal plots are representative of experiments performed with 2–4 different protein extracts isolated from yeast expressing cALT1 or cALT2.

Table 2

Kinetic parameters of *S. aurata* cALT1 and cALT2

	cALT1	cALT2
Forward reaction		
K_m^{Ala} (mM)	1.82 ± 0.33	2.21 ± 0.70
$K_m^{2\text{-Oxo}}$ (mM)	0.048 ± 0.006	0.051 ± 0.006
V_{max} (μmol/(min g))	56.8 ± 14.3	14697 ± 4482
$V_{\text{max}}/K_m^{\text{Ala}}$	0.031	6.65
$V_{\text{max}}/K_m^{2\text{-Oxo}}$	1.183	288.2
I_{50}^{Oxamate} (mM)	1.46 ± 0.14	1.10 ± 0.03
K_i^{Oxamate} (mM)	3.20 ± 0.85	2.50 ± 0.32
K_i^{Oxamate} (mM)	4.34 ± 0.35	0.83 ± 0.06
Reverse reaction		
K_m^{Glu} (mM)	15.91 ± 3.99	4.53 ± 1.55
K_m^{Pyr} (mM)	0.690 ± 0.208	0.154 ± 0.053
V_{max} (μmol/min/g)	11.6 ± 2.3	20.9 ± 0.7
$V_{\text{max}}/K_m^{\text{Glu}}$	0.001	0.005
$V_{\text{max}}/K_m^{\text{Pyr}}$	0.017	0.135
K_i^{Glu} (mM)		34.9 ± 13.3
K_i^{Pyr} (mM)		36.5 ± 15.9
I_{50}^{Oxamate} (mM)		104.2 ± 24.8
K_i^{Oxamate} (mM)		81.5 ± 21.5

Protein extracts from *S. cerevisiae* strain YDR111c expressing *S. aurata* cALT1 or cALT2 were assayed for ALT activity at various substrate and cosubstrate concentrations to calculate K_m and V_{max} values. The results are the mean ± standard deviation of four experiments.

refeeding (6h) allowed recovery of cALT2 mRNA levels to the values observed in fed fish (Fig. 8A). Variations of liver cALT1 and cALT2 mRNA was assessed during 24h after food intake by semi-quantitative RT-PCR. Maximal expression of cALT1 was observed 2–8 h after food intake. In contrast, at 4–8 h postprandial time, cALT2 mRNA decreased to 25% of the values observed at time 0 (Fig. 8B). We also examined the effect of glucose and insulin on cALT1 and cALT2 expression in *S. aurata* liver. While cALT1 did not show significant changes 6 h after treatment with glucose or insulin, the expression of cALT2 significantly decreased 2.2- and 2.9-fold 6 h following glucose or insulin administration, respectively (Fig. 9).

Streptozotocin (STZ), a glucosamine–nitrosourea derivative that causes β-cell necrosis, is widely used to generate diabetic animal models (Junod et al., 1969; Like and Rossini, 1976; Wilson and Leiter, 1990). Twenty-two hours after intraperitoneal administration of 600 mg/kg STZ to *S. aurata*, glycaemia increased 2-fold. Semi-quantitative RT-PCR showed a 3-fold significant increase in cALT2 mRNA levels in liver of STZ-treated fish, whereas cALT1 expression showed a tendency to decrease (Fig. 10).

4. Discussion

Elevated ALT activity levels in serum, even within the reference range, and the development of type 2 diabetes

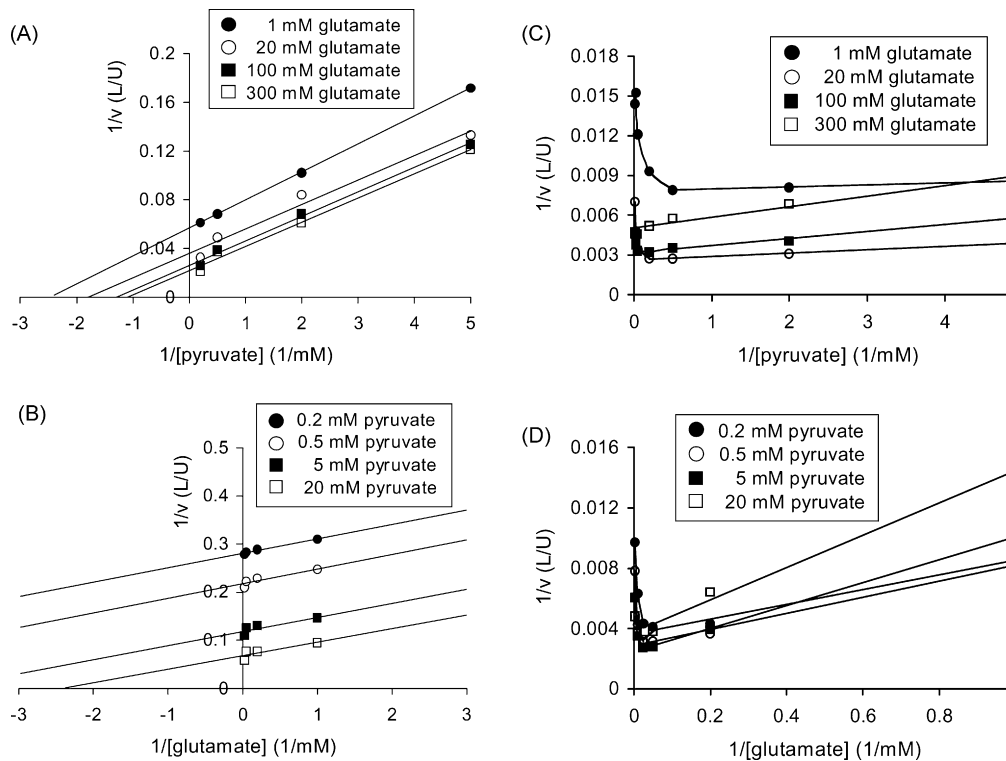


Fig. 6. Saturation kinetics for pyruvate and L-glutamate of *S. aurata* cALT1 and cALT2. (A) Saturation kinetics for pyruvate of cALT1. ALT activity was assayed (reverse reaction) by varying pyruvate levels in the presence of 1 mM (●), 20 mM (○), 100 mM (■) or 300 mM (□) L-glutamate. (B) Saturation kinetics for L-glutamate of cALT1. ALT activity was assayed (reverse reaction) by varying L-glutamate levels in the presence of 0.2 mM (●), 0.5 mM (○), 5 mM (■) or 20 mM (□) pyruvate. (C) Saturation kinetics for pyruvate of cALT2. ALT activity was assayed (reverse reaction) by varying pyruvate levels in the presence of 1 mM (●), 20 mM (○), 100 mM (■) or 300 mM (□) L-glutamate. (D) Saturation kinetics for L-glutamate of cALT2. ALT activity was assayed (reverse reaction) by varying L-glutamate levels in the presence of 0.2 mM (●), 0.5 mM (○), 5 mM (■) or 20 mM (□) pyruvate. Double-reciprocal plots are representative of experiments performed with 2–4 different protein extracts isolated from yeast expressing cALT1 or cALT2.

are the focus of increasing research efforts (Vozarova et al., 2002; Hanley et al., 2004; West et al., 2006; Sattar et al., 2007). In carnivorous fish, a glucose load or high carbohydrate diets results in sustained hyperglycaemia (Wright et al., 1998). Nevertheless, partial substitution of dietary proteins by carbohydrates is tolerated by the carnivorous fish *S. aurata* through adaptation of key enzymes involved in the regulation of intermediary metabolism in liver. In particular, changes in hepatic ALT activity can be used as indicator of nutritional status in this species (Metón et al., 1999; Fernández et al., 2007). To understand the functional role of the cytosolic ALT gene, here we addressed the nutritional and hormonal regulation of cALT expression at mRNA level in liver of *S. aurata*. From RT-PCR and RACE-PCR experiments, we conclude that two spliced isoforms are generated from the cALT gene: cALT1, which corresponds to the previously isolated cALT (Metón et al., 2004), and the newly identified mRNA species cALT2. Compared to cALT1 messenger, cALT2 contains an extra exon (85 bp) and an upstream translational start site that results in the inclusion of 23 amino acid residues in the N-terminal portion of the inferred protein. Since polyasparagine and polyglutamine regions are involved in protein–protein interaction through the formation of a polar zipper of hydrogen bonds between the side chains (Perutz et al., 2002), the presence of an asparagine-rich region in cALT2 suggests that

its enzyme activity is regulated by aggregation or interaction with effector proteins. Interestingly, the aggregation of ALT molecules gives rise to active oligomers during the purification of the rat liver enzyme (Gatehouse et al., 1967).

At present, it is not known whether alternative splicing for ALT genes occurs in humans. Isoelectric focusing experiments performed on purified human and rat liver cytosolic ALT results in the separation of three and four closely migrating bands, respectively (Matsuzawa et al., 1997). These authors did not conclude whether heterogeneity of cytosolic ALT in humans is explained genetically or results from posttranslational modifications. However, they provided evidence that cytosolic ALT comprises two isoforms with distinct pI and apparent molecular mass in rat liver. Furthermore, although the expression of human ALT2 in *E. coli* gives rise to a product of about 58 kDa (Yang et al., 2002), a single 45 kDa product has been immunodetected in tissues with high expression of ALT2 (Lindblom et al., 2007). In addition, a low molecular weight ALT isoform has been recently purified from liver of fasted rats (Vedavathi et al., 2004). The metabolic implications and molecular mechanism that generates these isoforms are unknown.

The occurrence of two cytosolic ALT isozymes in the liver of *S. aurata* supports the notion that cALT isoforms play different roles in the hepatocyte. Both cALT1 and

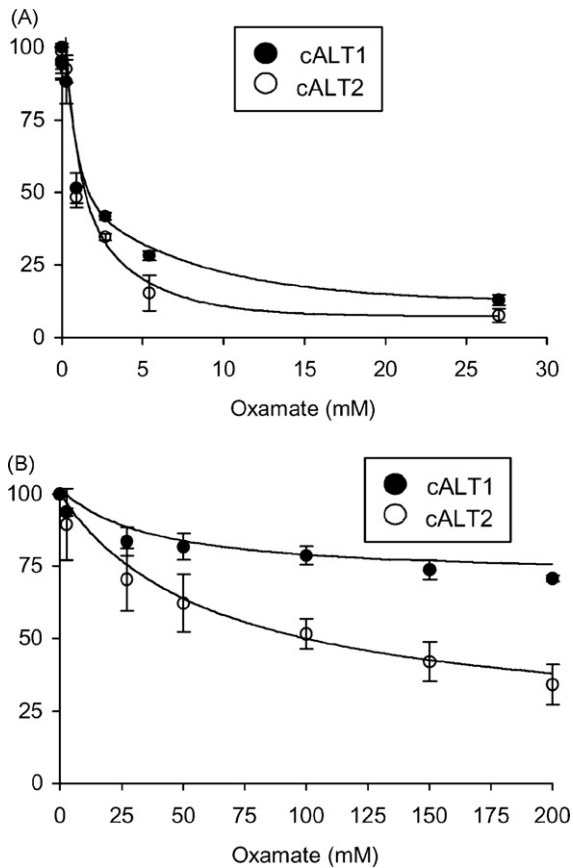


Fig. 7. Effect of oxamate on *S. aurata* cALT1 and cALT2. (A) Effect of oxamate on cALT1 and cALT2 forward activities. ALT activity was assayed (forward reaction) by varying the concentration of oxamate in the presence of 500 mM L-alanine and 50 mM 2-oxoglutarate. (B) Effect of oxamate on cALT1 and cALT2 reverse activities. ALT activity was assayed (reverse reaction) by varying the concentration of oxamate in the presence of 25 mM L-glutamate and 5 mM pyruvate. Percentage of forward or reverse ALT activity is represented as mean \pm S.D. of experiments performed with 2–4 different protein extracts isolated from yeast expressing cALT1 or cALT2.

cALT2 codify for proteins with ALT activity, as revealed by yeast expression studies. Analysis of the forward/reverse ALT activity ratio in cytosolic extracts isolated from yeast expressing piscine cALT isoforms showed that cALT2 preferentially converts L-alanine to pyruvate. Mutagenesis analysis demonstrated that residues 3–13 of cALT2 are essential for the reaction direction preference exhibited by this enzyme. Tissue distribution analysis of cALT1 and cALT2 mRNA in *S. aurata* showed that both isoforms were present in tissues that can undergo both glycolysis and gluconeogenesis, such as liver, kidney and intestine. Taken together, our findings suggest that in these particular tissues cALT2 expression is more restricted to metabolic conditions that favour gluconeogenesis. In contrast, cALT1 is predominantly associated with the fed state, which is characterized by elevated glycolysis and deviation of excess pyruvate to form L-alanine and provide 2-oxoglutarate to replenish the citric acid cycle in a metabolic situation where intermediates of this pathway can be used for biosynthetic purposes.

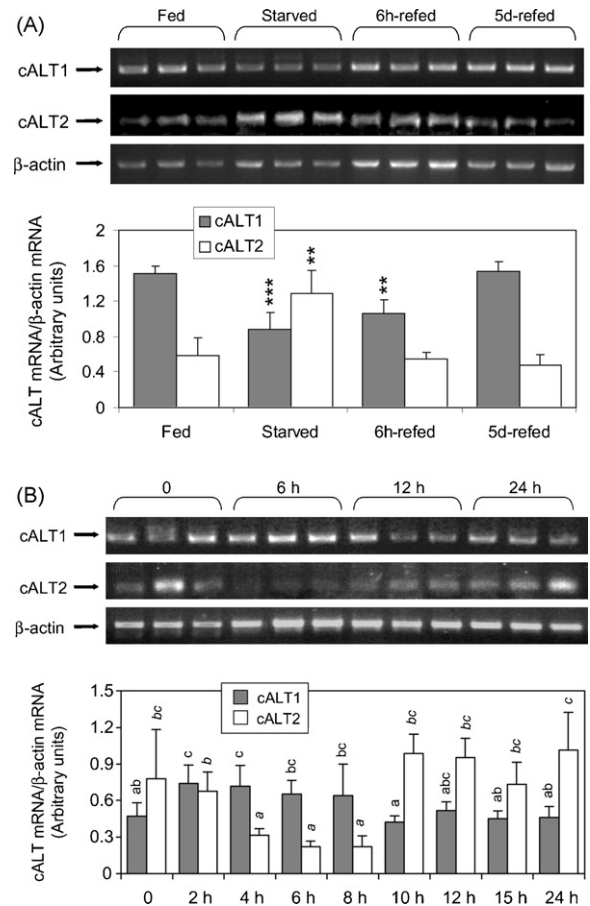


Fig. 8. Effect of starvation–refeeding and diurnal variations of cALT1 and cALT2 mRNA levels in the liver of *S. aurata*. (A) Representative semi-quantitative RT-PCR assay performed on total RNA isolated from liver samples of fed, 20-day starved, 6 h refed and 5-day refed fish. The mRNA levels of cALT1 and cALT2 are expressed in arbitrary units of densitometry as mean \pm S.D. of at least three fish. Statistical significance related to fed animals is indicated as follows: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (B) Representative semi-quantitative RT-PCR assay performed on total RNA isolated from liver of fish at time 0 (preprandial) and postprandial periods 6, 12 and 24 h. In the lower part of the figure, a densitometric analysis of hepatic cALT1 and cALT2 mRNA levels in *S. aurata* is represented at time 0 (preprandial) and postprandial periods 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 and 24 h. The mRNA levels of cALT1 and cALT2 are expressed in arbitrary units of densitometry as mean \pm S.D. of at least three fish. Different letters (regular letters for cALT1 and italic letters for cALT2) denote significant differences ($P < 0.05$).

Analysis of kinetic parameters for L-alanine and 2-oxoglutarate confirmed that cALT2 is considerably more efficient in catalysing the forward reaction than cALT1. Furthermore, cALT1 and cALT2 behaved markedly different when the reverse reaction was considered. In striking contrast to cALT1, the reverse reaction mechanism of cALT2 followed a ping–pong bireactant system with strong double substrate inhibition. Interestingly, substrate inhibition by L-glutamate and pyruvate was also reported for mitochondrial ALT isolated from pig liver and kidney (De Rosa et al., 1979). From these results, the authors hypothesized that mitochondrial ALT has a role in gluconeogenesis and that *in vivo* it can only convert L-alanine to pyruvate, whereas the cytosolic enzyme does not exhibit substrate

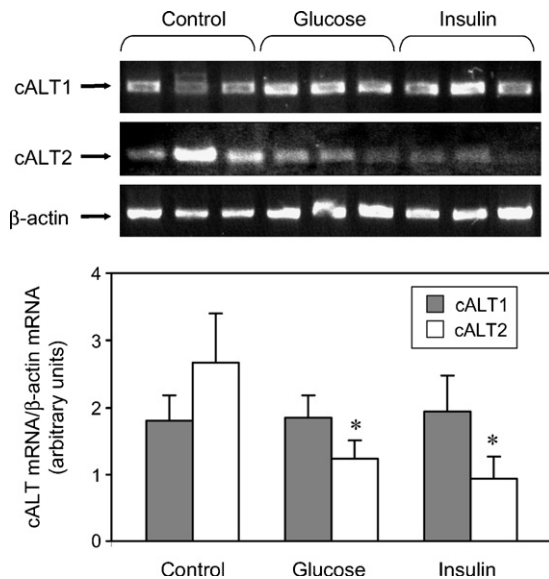


Fig. 9. Effect of glucose and insulin on cALT1 and cALT2 mRNA levels in the liver of *S. aurata*. A representative semi-quantitative RT-PCR assay performed on total RNA isolated from liver of fish 6 h after treatment with vehicle (saline; control), glucose (2 g/kg fish) or insulin (10 U/kg fish) is shown. The daily feeding regime was 10 g/kg BW. The mRNA levels of cALT1 and cALT2 are expressed in arbitrary units of densitometry as mean \pm S.D. of at least three fish. Statistical significance related to control animals is indicated as follows: * $P < 0.05$.

inhibition by L-glutamate and pyruvate, and can function in both directions. Possibly, the expression of cALT2 reinforces production of pyruvate from L-alanine in the liver of *S. aurata*. In this regard, and similarly as in rat liver, the levels of mitochondrial ALT activity in the piscine liver are low compared to the cytosolic isozyme (De Rosa and

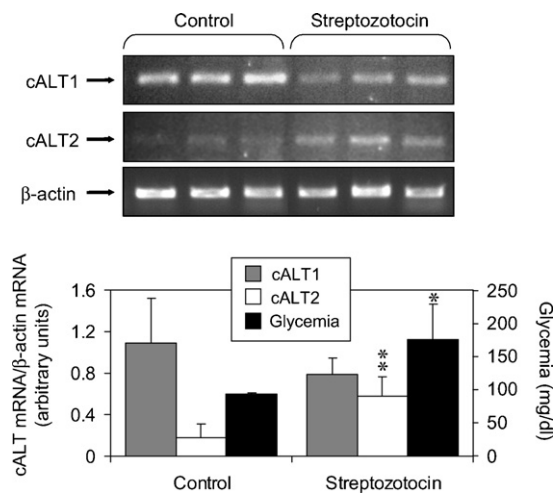


Fig. 10. Effect of STZ on cALT1 and cALT2 mRNA levels in the liver of *S. aurata*. Representative semi-quantitative RT-PCR performed on total RNA isolated from liver of fish 22 h after treatment with vehicle (0.01 M sodium citrate, pH 4.5; control) or STZ (600 mg/kg fish). The mRNA levels of cALT1 and cALT2, and blood glucose levels are expressed in arbitrary units of densitometry and mg/dL, respectively, as mean \pm S.D. of 4–6 fish. Statistical significance related to control animals is indicated as follows: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Swick, 1975; Metón et al., 2004). Differential effects of oxamate on cALT isozymes may be related with modulation of the enzyme activities under different metabolic situations. Taken together, the kinetic behaviour of cALT isozymes indicates that the activity of cALT2 appears to be more sensitive to changes in the concentrations of substrates or effectors, and underlines cALT2 as an enzyme that preferably catalyses the conversion of L-alanine to pyruvate. The fact that cALT2 was the only cALT isoform detected in piscine tissues that are not conventionally considered to be gluconeogenic, as heart, gill and spleen, may be associated with the higher regulatory and kinetic versatility exhibited by this enzyme. The metabolic function of cALT2 in these tissues seems to differ from the role exerted in liver, kidney or intestine, and might be related with processes such as amino acid conversion and deamination.

Knowledge of the control of ALT isozymes expression at mRNA level is scarce. Our findings indicate that long-term starvation increased cALT2 mRNA and reduced the expression of cALT1 in liver of *S. aurata*, whereas refeeding resulted in the recovery of the mRNA levels to those observed in fed animals for both cALT isoforms. Up-regulation of hepatic cALT2 expression in starved fish is consistent with preference of cALT2 in catalysing the production of pyruvate from L-alanine in a metabolic condition with decreased levels of hepatic pyruvate (Veech et al., 1973). Indeed, alanine is the main amino acid released by skeletal muscle and taken up by the liver in starvation (Felig, 1975). The intake of food participates in short-term modulation of hepatic cALT1 and cALT2 expression. Consistently with the expression pattern in starved–refed fish, cALT2 mRNA decreased to minimum levels after a postprandial period of 4–8 h. In contrast, the hepatic expression of cALT1 reached maximal values 2–8 h following food intake. Likewise, the administration of glucose and insulin significantly decreased cALT2 mRNA 6 h after the treatment, whereas no effect was observed on cALT1 mRNA levels. Thus, nutritional and hormonal regulation of cALT isozymes expression in liver of *S. aurata* are consistent with data obtained from expression of cALT isozymes in yeast and points to stimulation of cALT2 in conditions associated with increased gluconeogenesis, whereas cALT1 seems more involved in postprandial utilization of dietary nutrients.

In the mammalian liver, controversial results have been reported regarding the direction of the reaction catalysed by cytosolic ALT. Given the low affinity for L-alanine exhibited by cytosolic ALT, this isozyme was hypothesized as being involved mainly in the conversion of pyruvate to L-alanine (De Rosa and Swick, 1975). However, a part of alanine-derived pyruvate originates in the cytoplasm, and the contribution of rat liver mitochondrial ALT activity during gluconeogenesis is considered negligible compared with that of the cytoplasmic enzyme (Lenartowicz and Wojtczak, 1988). These apparently contradictory findings could be explained by presence of cytosolic homologs to cALT1 and cALT2 in mammalian hepatocytes.

As expected, the diabetogenic action of STZ resulted in increased blood glucose levels in *S. aurata* after intraperitoneal administration of this compound. In mammals, type 2 diabetes leads to increased gluconeogenesis in

the liver (Rosen et al., 1959; Zawadzki et al., 1988; Schindhelm et al., 2006), and among the amino acids, alanine is the most effective precursor of gluconeogenesis (Yamamoto et al., 1974). Consistent with the up-regulation of cALT2 expression in nutritional conditions associated with elevated gluconeogenesis in liver, STZ-treated fish presented a marked increase in the hepatic expression of cALT2, whereas cALT1 mRNA levels showed a tendency to decrease. The requirement for gluconeogenic substrates may be critical to enhance hepatic cALT2 expression in STZ-induced diabetic *S. aurata*.

In conclusion, our findings indicate that two cytosolic ALT isoforms, generated from alternative splicing of cALT gene, exert distinct roles in the liver of *S. aurata*. Conditions associated with increased gluconeogenesis up-regulated cALT2 and down-regulated cALT1, whereas the opposite regulation of cALT isozymes expression was observed under conditions that favoured glycolysis. Given the elevation of cALT2 mRNA levels in liver of STZ-induced diabetic fish, research should now focus on identifying the human homolog to cALT2, and thus evaluate the expression of this ALT isozyme as a marker in the prognosis of diabetes and as a target for anti-diabetic compounds.

Acknowledgements

This work was supported by grants BIO2003-01098 and BIO2006-01857 from MCYT and MEC (Spain). IGA and MCS are recipients of FI-IQUC (Generalitat de Catalunya, Spain) and BRD (Universitat de Barcelona, Spain) fellowships.

References

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.

Chang Y, Ryu S, Sung E, Jang Y. Higher concentrations of alanine aminotransferase within the reference interval predict nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Chem* 2007;53:686–92.

De Rosa G, Swick RW. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem* 1975;250:7961–7.

De Rosa G, Burk TL, Swick RW. Isolation and characterization of mitochondrial alanine aminotransferase from porcine tissue. *Biochim Biophys Acta* 1979;567:116–24.

Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem* 2000;46:2050–68.

Felig P. Amino acid metabolism in man. *Annu Rev Biochem* 1975;44:933–55.

Fernández F, Miquel AG, Córdoba M, Varas M, Metón I, Caseras A, et al. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J Exp Mar Biol Ecol* 2007;343:1–10.

Gatehouse PW, Hopper S, Schatz L, Segal HL. Further characterization of alanine aminotransferase of rat liver. *J Biol Chem* 1967;242:2319–24.

Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino Jr RB, Kempf J, et al. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2004;53:2623–32.

Iacobellis G, Moschetta A, Buzzetti R, Ribaudo MC, Baroni MG, Leonetti F. Aminotransferase activity in morbid and uncomplicated obesity: predictive role of fasting insulin. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:442–7.

Jadhao SB, Yang RZ, Lin Q, Hu H, Anania FA, Shuldiner AR, et al. Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology* 2004;39:1297–302.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969;48:2129–39.

Lenartowicz E, Wojtczak AB. Significance of the alanine aminotransferase reaction in the formation of alpha-ketoglutarate in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1988;260:309–19.

Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976;193:415–7.

Lindblom P, Rafter I, Copley C, Andersson U, Hedberg JJ, Berg AL, et al. Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum-differential tissue expression using novel antibodies. *Arch Biochem Biophys* 2007;466:66–77.

Matsuzawa T, Kobayashi T, Ogawa H, Kasahara M. Microheterogeneity and intrahepatic localization of human and rat liver cytosolic alanine aminotransferase. *Biochim Biophys Acta* 1997;1340:115–22.

Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F, Baanante IV. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 1999;82:223–32.

Metón I, Egea M, Fernández F, Eraso MC, Baanante IV. The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Lett* 2004;566:251–4.

Metón L, Egea M, Anemaet IG, Fernández F, Baanante IV. Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* 2006;147:3446–56.

Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* 2005;41:380–2.

Perutz MF, Pope BJ, Owen D, Wanker EE, Scherzinger E. Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid beta-peptide of amyloid plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5596–600.

Rosen F, Roberts NR, Nichol CA. Glucocorticosteroids and transaminase activity. I. Increased activity of glutamicpyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis. *J Biol Chem* 1959;234:476–80.

Rosen F, Harding HR, Milholland RJ, Nichol CA. Glucocorticoids and transaminase activity. VI. Comparison of the adaptive increases of alanine- and tyrosine-alpha-ketoglutarate transaminases. *J Biol Chem* 1963;238:3725–9.

Sattar N, McConnachie A, Ford I, Gaw A, Cleland SJ, Forouhi NG, et al. Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes* 2007;56:984–91.

Schiestl RH, Gietz RD. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 1989;16:339–46.

Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:437–43.

Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ, et al. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* 2007;191:391–6.

Sherman KE. Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. *Arch Intern Med* 1991;151:260–5.

Sohocki MM, Sullivan LS, Harrison WR, Sodergren EJ, Elder FF, Weinstock G, et al. Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites. *Genomics* 1997;40:247–52.

Thakran S, Salimuddin, Baquer NZ. Oral administration of orthovanadate and *Trigonella foenum graecum* seed powder restore the activities of mitochondrial enzymes in tissues of alloxan-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2003;247:45–53.

Vedavathi M, Girish KS, Kumar MK. Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. *Mol Cell Biochem* 2004;267:13–23.

Veech RL, Veloso D, Mehlman MA. Thiamin deficiency: liver metabolite levels and redox and phosphorylation states in thiamin-deficient rats. *J Nutr* 1973;103:267–72.

Voarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1889–95.

- Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, Whincup PH. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 2005;28:2913–8.
- West J, Brousil J, Gazis A, Jackson L, Mansell P, Bennett A, et al. Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *QJM* 2006;99:871–6.
- Westerbacka J, Corner A, Tiikkainen M, Tamminen M, Vehkavaara S, Hakkinen AM, et al. Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex differences in markers of cardiovascular risk. *Diabetologia* 2004;47:1360–9.
- Wilson GL, Leiter EH. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;156:27–54.
- Wright Jr JR, O'Hali W, Yang H, Han XX, Bonen A. GLUT-4 deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 1998;111:20–7.
- Yamamoto H, Aikawa T, Matsutaka H, Okuda T, Ishikawa E. Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats. *Am J Physiol* 1974;226:1428–33.
- Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR, Gong DW. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* 2002;79:445–50.
- Zawadzki JK, Wolfe RR, Mott DM, Lillioja S, Howard BV, Bogardus C. Increased rate of Cori cycle in obese subjects with NIDDM and effect of weight reduction. *Diabetes* 1988;37:154–9.

Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*

M C Salgado, I Metón, M Egea and I V Baanante

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

(Requests for offprints should be addressed to I V Baanante; Email: baanantevazquez@ub.edu)

Abstract

Increase in glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6Pase, *G6pc*) transcription enhances hepatic glucose production in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). The fact that carnivorous fish is an alternative model to study NIDDM led us to clone and characterise the first *G6pc* promoter region reported for fish and non-mammalian animals. The 5'-flanking region of *G6pc* from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) was isolated by chromosome walking. With SMART RACE-PCR, the transcription start site was located 106 base pairs (bp) upstream of the translational start. Transfection analysis in HepG2 cells located a functional promoter in the 850 bp 5'-flanking isolated fragment (positions -770 to +80 relative to the transcription start). Sequential 5'-deletion analysis of the promoter fragment revealed that a core functional promoter for basal transcription is comprised within the 190 bp upstream of the transcription start site. *In vivo*, glucose and insulin reduced G6Pase mRNA levels in the fish liver. Transfection experiments in HepG2 cells showed that insulin repressed *S. aurata G6pc* under high-glucose conditions. Synergistic activation of piscine *G6pc* promoter was induced by cotransfection with expression plasmids for hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 (PGC-1 α). No direct relationship was found between PGC-1 α coactivation of HNF-4 α transactivation and the repressive effect of insulin. Interestingly, insulin hardly affected *G6pc* promoter activity in the absence of glucose, suggesting that a reduced capacity of insulin-dependent repression of piscine *G6pc* may lead to insulin resistance in carnivorous fish.

Journal of Molecular Endocrinology (2004) **33**, 783–795

Introduction

In mammals, liver glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9, G6Pase, *G6pc*) plays a key role in blood glucose homeostasis by catalysing the dephosphorylation of glucose-6-phosphate (G-6P) to glucose, the terminal reaction of gluconeogenesis and glycogenolysis. According to the substrate-transport model, G6Pase is a multicomponent complex located in the endoplasmic reticulum. Hydrolysis of G-6P involves the coupled functions of different membrane-spanning translocases that mediate penetration of G-6P and efflux of inorganic phosphate (Pi) and glucose (Van de Werve *et al.* 2000, Clottes *et al.* 2002, Foster & Nordlie 2002, Van Schaftingen & Gerin 2002). Expression of the catalytic subunit of G6Pase is restricted to liver,

kidney, small intestine and brain (Gautier-Stein *et al.* 2003, Guionie *et al.* 2003). Hepatic *G6pc* gene expression is hormonally and nutritionally regulated. *G6pc* expression is stimulated by glucose, glucocorticoids, cAMP, fatty acids, leptin and β_3 -adrenergic receptor agonists, whereas it is inhibited by tumour necrosis factor α , interleukin-6 and insulin (Streeper *et al.* 2000). Studies *in vivo* and *in vitro* indicate that *G6pc* expression in rats is stimulated by glucose and xylitol, irrespective of insulin, through different signalling pathways (Massillon *et al.* 1996, 1998, Massillon 2001, Pagliassotti *et al.* 2003). Insulin inhibits gluconeogenesis by suppressing the expression of key enzymes, such as G6Pase. In HepG2 cells, repression of *G6pc* transcription by insulin requires two regions in the proximal promoter, designated

A and B. Hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 binds to region A, and enhances the effect of insulin (Streeper *et al.* 1998). Recently, insulin was postulated to downregulate *G6pc* expression by inhibiting the binding of a transcriptional activator, the forkhead transcription factor Foxo1 (also known as FKHR), to insulin response sequence (IRS) motifs located in region B (Vander Kooi *et al.* 2003). The dual-specificity protein kinase DYRK1A synergistically potentiates transactivation of *G6pc* by Foxo1 (Von Groote-Bidlingmaier *et al.* 2003). Short-chain fatty acids induce *G6pc* transcription via recruitment of HNF-4 α to the promoter (Massillon *et al.* 2003). Recent studies have shown that transcriptional activation of the *G6pc* promoter by HNF-4 α and Foxo1 involves the coactivator protein peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 (PGC-1 α) (Herzig *et al.* 2001, Yoon *et al.* 2001, Boustead *et al.* 2003, Puigserver *et al.* 2003, Rhee *et al.* 2003). CRE-binding protein (CREB) mediates activation of *G6pc* transcription through binding to a cAMP response element (CRE), which contributes to the regulation of the gene transcription by both cAMP and glucocorticoids (Schmoll *et al.* 1999). Additionally, binding of HNF-3 γ and Sp family proteins is essential for the basal activity of *G6pc* promoter (Lin *et al.* 1997, Wasner *et al.* 2001).

In carnivorous fish, glucose intolerance and limited use of dietary carbohydrates have been reported. Compared with mammals, these animals show prolonged hyperglycaemia after a glucose load and when fed high-carbohydrate diets (Christiansen & Klungsoyr 1987, Cowey & Walton 1989, Baanante *et al.* 1991, Wilson 1994, Moon 2001, Metón *et al.* 2003). This metabolic profile mimics non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) in humans, and carnivorous fish are thus considered as an alternative model in which to study NIDDM (Wilson 1994, Moon 2001). In patients with NIDDM, hepatic gluconeogenesis is increased; the inability of insulin to control enzymes such as G6Pase contributes to hyperglycaemia (Streeper *et al.* 1997, Clore *et al.* 2000). Consistent with a model whereby a reduction of G6Pase activity affects glucose homeostasis, silencing of hepatic *G6pc* reduces postprandial serum glucose levels in mice (Huang *et al.* 2004). In the present study, to understand regulation of *G6pc* transcription in the carnivorous fish glucose-intolerant model, we have cloned the first *G6pc* catalytic subunit promoter

reported for fish and non-mammalian animals. In addition, we characterised regulation of the proximal promoter region activity of piscine *G6pc* by glucose and insulin, and transactivation by HNF-4 α and the coactivator PGC-1 α .

Materials and methods

Animal treatments

Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) obtained from Tinamenor (Cantabria, Spain) were maintained, at 20 °C, in 260-l aquaria supplied with running seawater in a closed system with an active pump filter and UV lamps. The photoperiod was a 12 h/12 h dark/light cycle. Fish were fed daily (1000 h) at 1% body weight with a diet containing 46% protein, 9.3% carbohydrates, 22% lipids, 10.6% ash and 12.1% moisture, and 21.1 kJ/g gross energy. To study regulation of *G6pc* expression by insulin and glucose *in vivo*, we divided the animals into four groups of six fish each. At 24 h after the last meal (at 10 h), three different groups received an intraperitoneal injection of glucose (2 g/kg fish), bovine insulin (10 units/kg fish) (Sigma) or glucose (2 g/kg fish) plus insulin (10 units/kg fish). The other group was injected with vehicle (saline). At 6 h after treatment, fish were killed by cervical section. Blood was collected, and liver samples were dissected out, immediately frozen in liquid N₂ and kept at -80 °C until use. To avoid stress, fish were anaesthetised with MS-222 (1:12 500) before handling. The experimental procedures met the guidelines of the animal use committee of the University of Barcelona.

Cloning of the 5'-flanking region of *G6pc* from *S. aurata* by chromosome walking

The 5'-flanking region of *G6pc* was isolated by PCR with the Universal GenomeWalker Kit (Clontech). Briefly, four libraries were obtained by blunt-end digestion of *S. aurata* genomic DNA with DraI, EcoRV, PvuII and StuI. Each batch of digested genomic DNA was ligated to the GenomeWalker adaptor provided in the kit. Primary PCR was performed on each library with the gene-specific primer MCGP01 (5'-TCGACCCCCAGCTGTGCAGAAGATC-3') and the AP-1 primer provided in the kit. Seven initial cycles were carried out, with 25-s denaturation at 94 °C, and 3-min

annealing and DNA synthesis at 72 °C, followed by 32 cycles in which the annealing and DNA synthesis temperature was 67 °C, and a final extension step of 7 min at 67 °C. Nested PCR was performed on the primary PCR product with the gene-specific primer MCGP02 (5'-GATGGCTCAGCCTCTGCCTGAGGATG-3') and the AP2 primer from the kit. The PCR reaction mixture was incubated for 2 min at 94 °C and subjected to five cycles of denaturation at 94 °C for 25 s, annealing at 68 °C for 30 s and DNA synthesis at 72 °C for 90 s, followed by 20 cycles in which the annealing temperature was 65 °C, and a final extension step of 5 min at 72 °C. The longer amplification product, a single 850 bp band, was obtained from the DraI library and ligated into pGEM T Easy plasmid (Promega) to generate pGEM-P850. Two independent clones were fully sequenced on both strands, according to the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Characterisation of the transcription start site

The 5' end of the hepatic *S. aurata* G6Pase cDNA was determined by the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). This generates full-length cDNAs in reverse transcription reactions (Zhu *et al.* 2001). In brief, 1 µg poly A⁺ RNA obtained from liver of *S. aurata* was converted into cDNA with PowerScript RT (Clontech, Palo Alto, CA, USA) at 42 °C for 1.5 h. 5'-RACE ready cDNA was obtained with the 5'-CDS primer, for first-strand synthesis, and the SMART II A oligonucleotides from the kit. After the end of the mRNA template is reached, the terminal transferase activity of PowerScript RT adds several dC residues that allow annealing of the SMART II A oligonucleotide, which serves as an extended template for RT. A touchdown PCR was conducted with the Universal Primer Mix A from the kit and MCGP01 oligonucleotides. Five initial cycles were carried out, with 30-s denaturation at 94 °C and 1-min annealing and extension at 72 °C, followed by five cycles with 30-s denaturation at 94 °C, 30-s annealing at 70 °C and 1-min extension at 72 °C, and 20 cycles with 30-s denaturation at 94 °C, 30-s annealing at 68 °C and 1-min extension at 72 °C. The single 187 bp band generated was purified and ligated into pGEM T Easy plasmid (Promega). Identical nucleotide sequence corresponding to the 5' end of G6Pase

cDNA was obtained by sequence analysis of two independent clones.

Construction of reporter gene plasmids

The *S. aurata* G6pc-luciferase reporter fusion construct harbouring promoter sequences located between positions -770 and +80 relative to the transcription start site (pGP770) was generated by PCR. To this end, a forward MCGP05 primer (5'-GCGCTAGCGACGGCCCCGGGCTGGTAAA-3'), extending from positions -770 to -751, and containing a 5'-anchor sequence with an NheI site (underlined), a reverse MCGP06 oligonucleotide (5'-GCAAGCTTGATGGCTCAGCCTCTGCCTG-3') between positions +87 and +107 with a 5'-anchor sequence containing a HindIII site (underlined), and pGEM-P850 as a template were used. The PCR product was cloned into the NheI/HindIII digested pGL3-Basic promoterless luciferase reporter plasmid (Promega). The reporter constructs designated as pGP629, pGP190 and pGP51 were produced by self-ligation of filled-in ends of pGP770 after digestion with EcoRV/HindIII, SmaI/HindIII and XhoI/HindIII respectively. All constructs were verified by sequencing with the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Cell transfection and luciferase assay

The human hepatoma derived cell line HepG2 (ATCC HB 8065) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine. The cells were grown at 37 °C in 5% CO₂. The calcium phosphate coprecipitation method was used for transient transfection of HepG2 at 45–50% confluence in six-well plates (Graham & Van der Eb 1973). Cells were transfected with 4 µg reporter construct, and when necessary, with 800 ng expression vector encoding human insulin receptor B, or 400 ng expression vectors encoding HNF-4α or PGC-1α. To correct for variations in transfection efficiency, 500 ng CMV-β (*lacZ*) were included in each transfection. To ensure equal DNA amounts, empty plasmids were added in each transfection. At 4 h after addition of the precipitate, cells were shocked in 10% dimethylsulphoxide in

serum-free medium for 2 min. Fresh medium or serum-free medium (supplemented with glucose or recombinant human insulin (Sigma)) was added, and the cells were harvested 16 h later, washed in PBS and incubated for 15 min in 300 µl cell culture lysis reagent (Promega). After removal of cellular debris by centrifugation at 10 000 *g* for 15 s, luciferase activity was measured in 5 µl supernatant after addition of 30 µl luciferase assay reagent (Promega). Peak light emission was recorded on a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). β-Galactosidase activity of 30–100 µl clear lysate was measured in a 1-ml reaction containing 0.3 mM MgCl₂, 13.5 mM β-mercaptoethanol, 0.9 mM ONPG (2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) and 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5. After incubation at 37 °C (usually 20 min to 1 h), the reaction was stopped by addition of 0.5 ml 0.5 M Na₂CO₃, and the intensity of the yellow colour was determined by its optical density at 420 nm. The expression plasmids encoding rat HNF-4α (pcDNA3.HNF4α; Bartoov-Shifman *et al.* 2002), mouse PGC-1α (pSV2-PGC1; Puigserver *et al.* 1998) and human insulin receptor B (InsRB; Yoshimata *et al.* 1988) were kindly provided by Drs M.D. Walker (Weizmann Institute of Science, Israel), B.M. Spiegelman (Harvard Medical School, USA), and J. Whittaker (Case Western Reserve University, USA) respectively.

Northern blotting analysis

Total RNA was isolated from liver samples of *S. aurata* with the Total Quick RNA Cells & Tissues kit (Talent, Trieste, Italy). An amount of 20 µg of total RNA was denatured and then loaded onto a 1% agarose gel containing 4.75% formaldehyde. Electrophoresis was performed in denaturing conditions for 5 h at 35 V; RNA was then transferred overnight to Nytran membranes (Schleicher & Schuell) in 5 × SSC (1 × SSC = 150 mM NaCl and 15 mM sodium citrate, pH 7.5). RNA was cross-linked to the membranes by UV irradiation for 3 min. A G6Pase homologous probe was labelled by incorporation of digoxigenin-11-dUTP during PCR with primer pairs F1 (5'-GTCCTGGGAGACTGGC TCAAC-3')/F2R (5'-CCACTTCTGGGCTTTC TCCA-3'), which correspond to nucleotides 223–243 and 759–740 respectively in the *S. aurata* G6Pase cDNA (Metón *et al.* 2004). Prehybridisations of the membranes

proceeded for 2 h at 50 °C in 7% SDS (w/v), 50% formamide, 5 × SSC, 2% blocking reagent (Roche), 0.1% *N*-laurylsarcosine (w/v) and 50 mM sodium phosphate, pH 7.0. The probes were added and hybridisation was performed overnight at 50 °C. Membranes were then washed twice for 15 min at room temperature in 2 × SSC, 0.1% SDS and twice for 15 min at 68 °C in 0.2 × SSC and 0.1% SDS. For normalisation, hybridisation of membranes with β-actin was carried out. Labelled probes were immunodetected with antidigoxigenin conjugated to alkaline phosphatase (Roche) and CDP-Star (Roche) as chemiluminescent substrate. Membranes were finally exposed to Hyperfilm ECL (Amersham). Autoradiograms of Northern blots were quantified by scanning densitometry.

Hepatocyte isolation and semiquantitative RT-PCR

S. aurata hepatocytes were isolated by collagenase digestion. Minced tissue was incubated in L15 medium containing 0.5 mg/ml collagenase (Sigma) for 30 min at 20 °C. The cell suspension was centrifuged at 100 *g* for 3 min, and the supernatant was discarded. Cells were then washed three times with PBS and suspended in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin for 30 min at 20 °C. For analysis of the effect of glucose and insulin on *G6pc* expression, the cells were incubated for 4 h at 20 °C in serum-free DMEM medium supplemented with 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, and with or without 5 mM glucose or 10 nM recombinant human insulin (Sigma). Cell viability, estimated by Trypan blue exclusion, was >95%. Total RNA from cells was obtained with the Total Quick RNA Cells & Tissues kit (Talent). cDNA templates for PCR amplification were synthesised from 1 µg total RNA with MMLV-RT (BRL Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 60 min at 37 °C in the presence of random hexamer primers. The RT reaction products were subjected to PCR amplification. F6 (5'-CTC TCCTTGACCTCCCTGGC-3') and F8R (5'-CG GCTGCTGACATCAGAGT GG-3') were used as primers to amplify a 673 bp fragment of G6Pase (Metón *et al.* 2004). *S. aurata* β-actin was used as an internal control for quality and quantity of RNA. Each PCR reaction contained cDNA template, PCR buffer, 0.2 mM

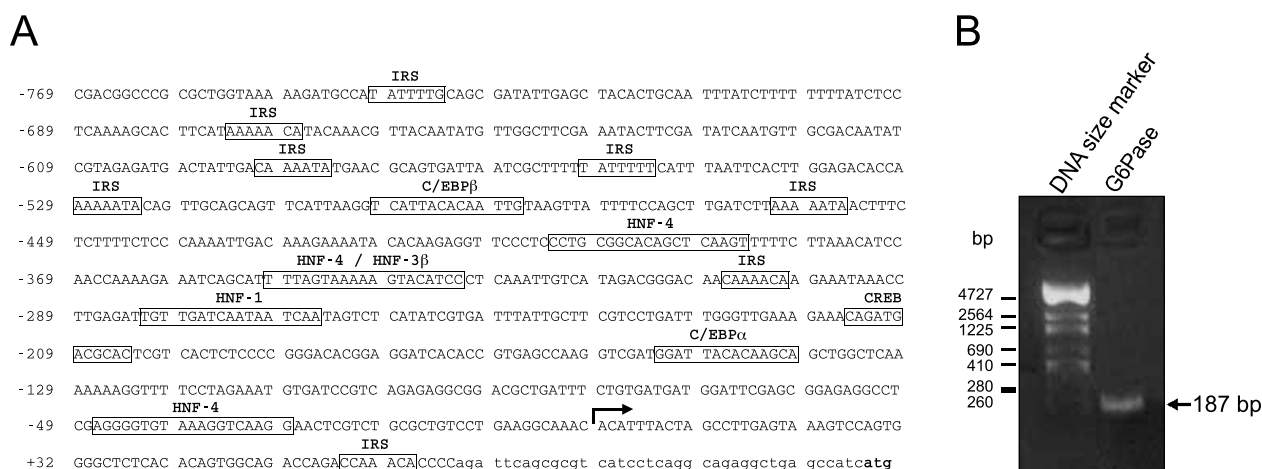


Figure 1 Sequence analysis of the 5'-flanking region of the *S. aurata* *G6pc* and mapping of the transcription initiation site of G6Pase mRNA. (A) The upstream sequences isolated by chromosome walking are shown in capitals. An arrow indicates the transcription start site. The translation start codon ATG is in boldface and underlined. Putative binding sites for transcription factors and IRS motifs are boxed. (B) Resolution of SMART RACE PCR products on a 2% agarose gel is shown. The assay, performed with 1 µg hepatic poly A⁺ RNA, produced a 187 bp band that was purified, ligated into pGEM T Easy and sequenced.

dNTP, 250 µM of each primer and 1 U Taq DNA polymerase (Biotools). After initial denaturation at 94 °C for 2 min, a number of cycles (20–30) at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 2 min were performed to verify that the PCR products amplify linearly and to determine the optimal number of cycles allowing their detection without saturation of the signal. Aliquots of each reaction were electrophoresed on a 2% agarose gel, and band intensities were compared by imaging of ethidium bromide staining.

Statistics

Data were analysed by one-factor analysis of variance by a computer program (StatView, SAS Institute, Cary, NC, USA). Differences were determined by Fisher's PLSD multiple range test, with significance level at $P < 0.01$.

Results

Cloning of the 5'-flanking region of the *S. aurata* *G6pc* gene

An 850 bp fragment upstream of the translation start codon of *G6pc* was isolated by chromosome walking on *S. aurata* genomic DNA, using oligonucleotides designed from the hepatic G6Pase catalytic subunit cDNA previously cloned from this species

(Metón *et al.* 2004) (Fig. 1A). The putative transcription initiation site of G6Pase mRNA was determined by the SMART RACE PCR approach (Zhu *et al.* 2001). A single fragment was obtained and cloned into pGEM T Easy. Upon sequencing, this fragment exhibited complete homology to the 39 bases in the 5' untranslated region (UTR) of the previously cloned *S. aurata* G6Pase cDNA. Analysis of two independent clones indicated that *S. aurata* G6Pase mRNA initiates 106 nucleotides upstream of the translation start codon (Fig. 1B). Sequence analysis of the 850 bp 5'-flanking region with MOTIF-TRANSFAC 6.0 (Heinemeyer *et al.* 1999) revealed lack of basal elements such as a TATA box or a CAAT box, and presence of several putative transcription factor binding sites in the proximal region of the promoter. Among the potential transcription factors were sites for CREB, HNF-1, HNF-3β and HNF-4α, all implicated in the transcriptional activation of *G6pc* promoter in mammals (Fig. 1A). The nucleotide sequence reported in this paper was submitted to the DDBJ/EMBL/GeneBank databases under accession no. AY344583.

Identification of a functional *S. aurata* *G6pc* promoter

To determine whether the genomic DNA flanking exon 1 contains a functional promoter, the 850 bp

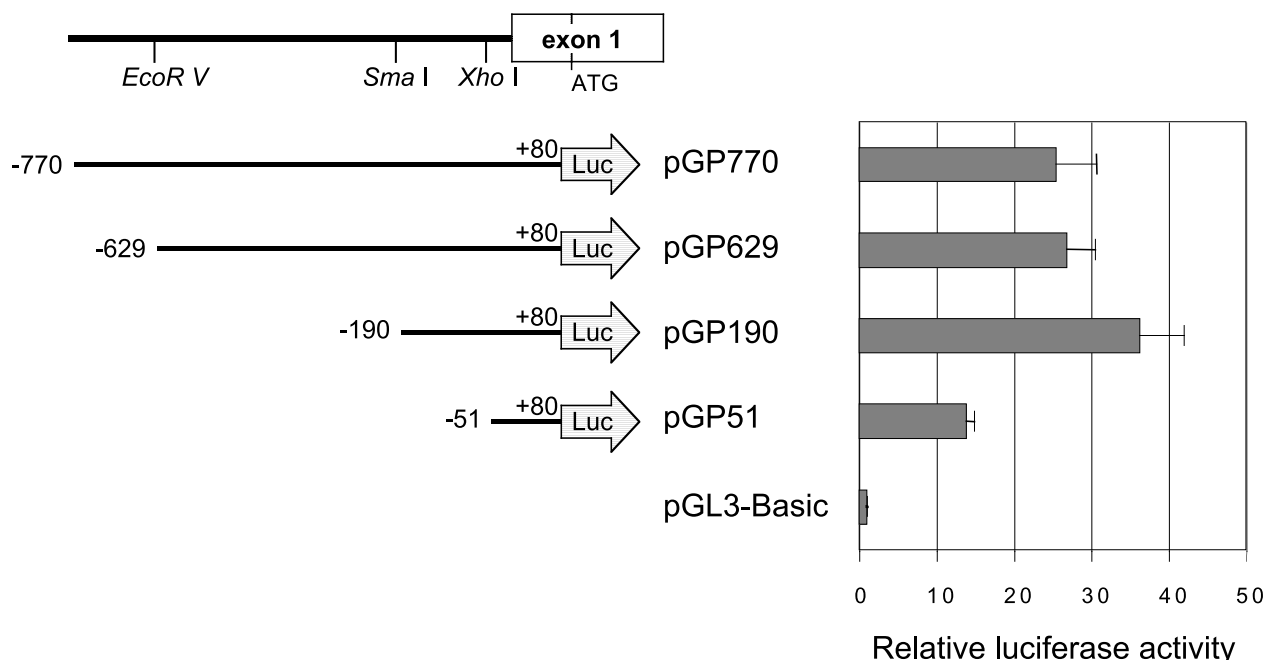


Figure 2 Deletion analysis and promoter activity of the 5'-flanking region of *S. aurata G6pc* in HepG2 cells. The top left part represents the genomic organisation of the 5'-flanking region of *S. aurata G6pc*. Relevant restriction sites and exon 1, depicted as a white box, are indicated. Nucleotide numbering starts with +1, corresponding to the transcription initiation site. The *S. aurata G6pc* promoter having varying 5' ends and an identical 3' end (+80) was fused to the luciferase reporter gene in pGL3-Basic vector. The constructs were transfected in HepG2 cells along with CMV- β (*lacZ*) to normalise for transfection efficiency. Luciferase activity is expressed as a fold increase over promoterless reporter plasmid pGL3-Basic. Results presented are the mean \pm s.d. from at least three independent experiments performed in duplicate.

fragment isolated by chromosome walking was subcloned in the promoterless plasmid pGL3-Basic, upstream of the luciferase reporter gene. The recombinant plasmid pGP770 (–770/+80) was transiently cotransfected into HepG2 cells together with a *lacZ*-containing plasmid, as internal control for transfection efficiency. The cell lysate was assayed for luciferase and β -galactosidase activity 20 h after transfection. This construct exhibited more than 25-fold increase in luciferase activity relative to the promoterless vector, pGL3-Basic (Fig. 2). This result indicated that the region comprised within 770 nucleotides upstream of the transcription start site of *S. aurata G6pc* contains a functional promoter.

Transcriptional activity of *G6pc* promoter deletions

To examine the functional regions of the promoter involved in modulation of basal *G6pc* expression in

S. aurata, sequential 5'-deletion analysis of the promoter fragment was carried out. To this end, deletion fragments, with 5' ends ranging from –770 to –51 and 3' ends at +80, were fused to the luciferase reporter gene and transfected into HepG2 cells. After 20 h, luciferase activity was measured in crude cell lysate. The longest 5' construct (pGP770; –770 to +80) yielded a 25-fold increase in luciferase activity relative to pGL3-Basic (Fig. 2). Similar results were obtained with pGP629 (–629 to +80). Upon further deletion of 580 bases (pGP190; –190 to +80), a noticeable but non-significant increase with respect to pGP770 and pGP629 was observed. Thus, the pGP190 construct exhibited the highest increase in luciferase activity, 35-fold. These results indicate that motifs located between –770 and –190 do not play an essential role in the *G6pc* promoter basal activity in HepG2 cells. The lower promoter activity was observed with the construct containing the promoter region spanning –51 to +80 (pGP51),

which exhibited a 13-fold increase compared with the promoterless pGL3-Basic and a 64% reduction in luciferase activity compared with pGP190. Therefore, positive *cis*-elements may be found between nucleotide positions -190 and -51, as well as in the region comprised within 51 nucleotides upstream of the transcription start site.

Regulation of hepatic glucose-6-phosphatase expression by glucose and insulin *in vivo* and in isolated hepatocytes

To investigate *in vivo* effects of glucose and insulin on *G6pc* expression in the liver of *S. aurata*, four groups of fish were injected with glucose, insulin, glucose plus insulin, or saline (vehicle). Hepatic G6Pase mRNA levels were assessed 6 h after the treatment, by Northern blotting analysis. Administration of glucose, insulin or glucose plus insulin reduced G6Pase mRNA to 50%, 40% and 28% respectively, of control (saline) (Fig. 3A). Similar results were observed in *G6pc* expression in isolated hepatocytes by semiquantitative RT-PCR after treatment for 4 h with insulin and glucose plus insulin. No reduction of G6Pase mRNA levels was observed in hepatocytes incubated in the presence of glucose alone (Fig. 3B). The effect of insulin and glucose administration on serum glucose levels was also determined. Compared with control fish (146.51 ± 6.08 mg/dl, mean \pm s.d., $n=5$), insulin treatment significantly reduced glycaemia, to 54% (79.44 ± 14.85 mg/dl, $n=5$), whereas both glucose and glucose plus insulin caused a 12–15-fold increase (1682.30 ± 684.04 mg/dl, $n=6$; and 2276.87 ± 585.39 mg/dl, $n=6$, respectively).

Regulation of *G6pc* promoter activity by glucose and insulin in HepG2 cells

In view of the effect of glucose and insulin on hepatic G6Pase mRNA levels *in vivo* and on isolated hepatocytes, and to study further the molecular mechanism by which glucose and insulin regulate *G6pc* expression in *S. aurata*, HepG2 cells transiently transfected with *G6pc* promoter fragments fused to the luciferase reporter gene were incubated in the presence or absence of glucose and insulin. Addition of up to 25 mM glucose to the culture medium caused a marked, dose-dependent increase in *G6pc* promoter activity (Fig. 4A). Addition of insulin in the absence of glucose did not affect

luciferase activity with the longer 5' construct (pGP770) or the shorter 5' construct (pGP51). However, in the presence of 5 mM glucose, insulin repressed promoter activity of both pGP770 and pGP51 constructs (Fig. 4B). Thus, insulin overrode the effect of glucose on *G6pc* promoter activity in *S. aurata*, and the putative *cis*-element for insulin action may be located downstream of position -51 relative to the transcription start site.

Synergistic activation of *G6pc* promoter by HNF-4 α and PGC-1 α

Efficient promoter activation often requires the synergistic effect of transcription factors and coactivator proteins. At present, the mechanism by which insulin downregulates the expression of gluconeogenic genes remains unclear. Recently, Puigserver *et al.* (2003) suggested that insulin suppresses gluconeogenesis stimulated by PGC-1 α through disruption of PGC-1 α -Foxo1 interaction. We tested whether simultaneous overexpression of PGC-1 α and HNF-4 α resulted in *G6pc* promoter activation to levels higher than with one transcription factor alone. The pGP770 construct was activated about fivefold by PGC-1 α alone, whereas HNF-4 α caused fivefold activation. The combination of HNF-4 α and PGC-1 α resulted in 20-fold activation of the *G6pc* promoter (Fig. 5). In order to identify the region responsible for the synergistic effect of HNF-4 α and PGC-1 α , the same experiment was carried out in the 5' deletion constructs pGP629, pGP190 and pGP51. HepG2 cells cotransfected with pGP629, pGP190 or pGP51 and expression plasmids for HNF-4 α and PGC-1 α lacked the synergistic effect (Fig. 5), suggesting that the region located between positions -770 and -629 relative to the transcription start site is required for this effect.

Discussion

Disturbed regulation of *G6pc* expression by insulin contributes to increased hepatic glucose production and to NIDDM in mammals. The advent of carnivorous fish as a glucose-intolerant system for the study of non-insulin-dependent diabetes (Wilson 1994, Caseras *et al.* 2000, Moon 2001) led us to isolate and characterise modulation of the promoter region of *G6pc* from *S. aurata* by glucose

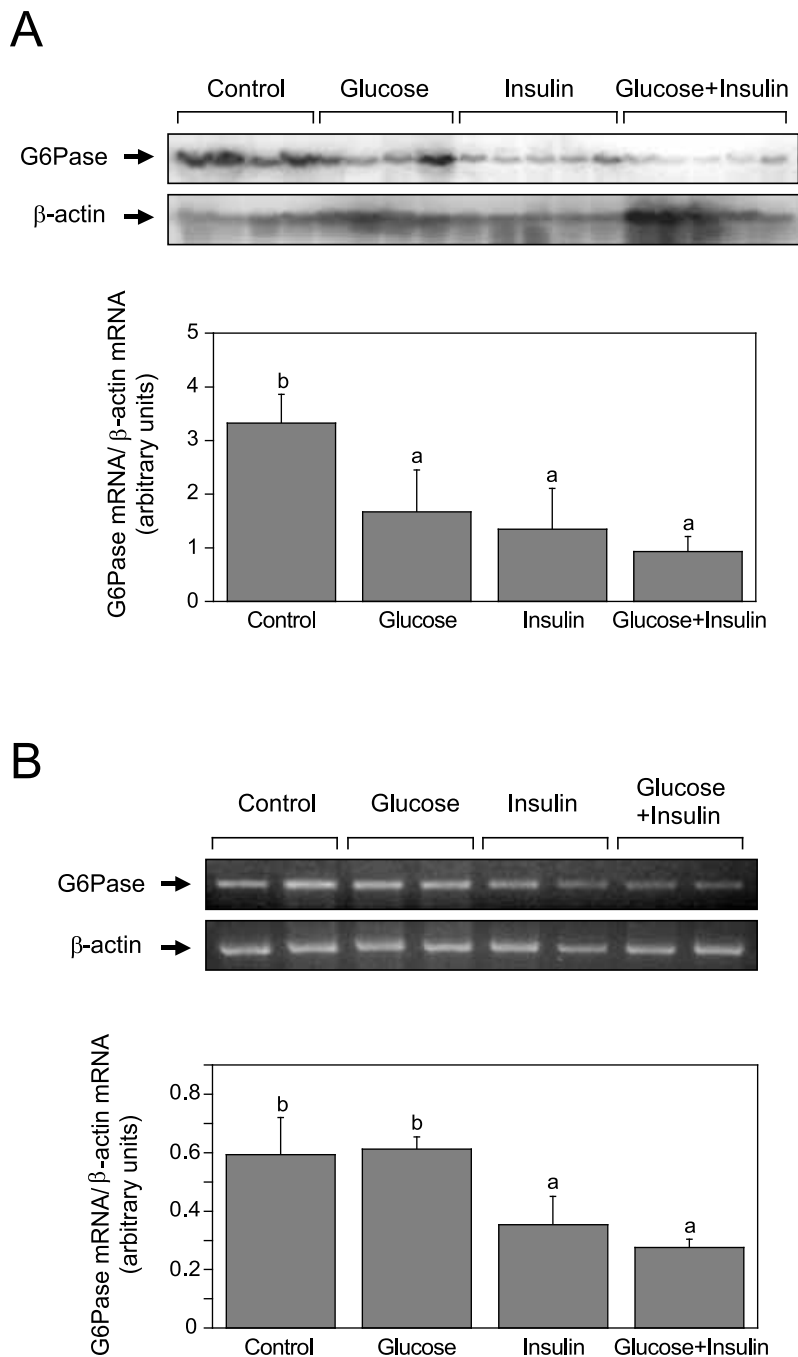


Figure 3 Effect of glucose and insulin on hepatic G6Pase mRNA *in vivo* and in isolated hepatocytes from *S. aurata*. (A) Northern blot and densitometric analysis of G6Pase mRNA levels in liver of fish 6 h after treatment with saline (control), glucose (2 g/kg fish), insulin (10 units/kg fish) or glucose (2 g/kg fish) plus insulin (10 units/kg fish). An amount of 20 µg total RNA was loaded in each lane. G6Pase mRNA levels are expressed as mean±s.d. of four or five fish. (B) Semiquantitative RT-PCR and densitometric analysis of G6Pase mRNA levels in isolated hepatocytes 4 h after no treatment (control) or treatment with glucose (5 mM), insulin (10 nM) or glucose (5 mM) plus insulin (10 nM). G6Pase mRNA levels are expressed as mean±s.d. of two independent duplicate experiments. Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.01$).

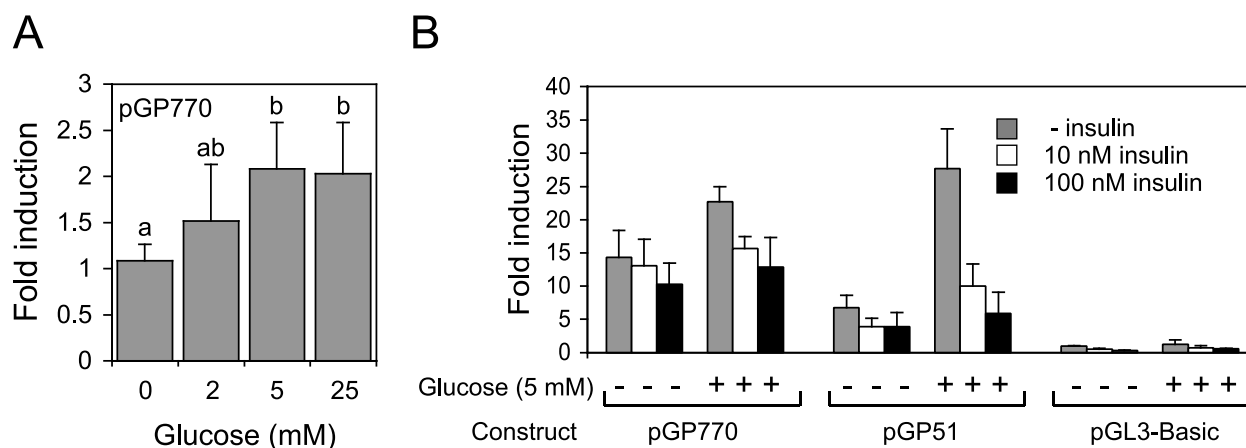


Figure 4 Effect of glucose and insulin on the activity of *S. aurata* *G6pc* promoter in HepG2 cells. (A) HepG2 cells transiently transfected with the pGP770 promoter construct were cultured in the presence (2, 5 and 25 mM) or absence of glucose in the medium, and luciferase activity was measured 16 h later. The promoter activity of pGP770 in the absence of glucose was set at 1. Different letters indicate significant differences ($P < 0.01$). (B) HepG2 cells were transiently transfected with pGL3-Basic or the promoter constructs pGP770 or pGP51, and 800 ng expression vector encoding human insulin receptor B. After transfection, the cells were cultured in the presence (5 mM) or absence of glucose, and with 10 or 100 nM insulin or without human insulin in serum-free medium. The promoter activity of pGL3-Basic in the absence of glucose and insulin was set at 1. Variations in transfection efficiencies were corrected with CMV- β (*lacZ*) as an internal control. The data represent the mean \pm s.d. values of three independent duplicate experiments.

and insulin. Understanding the transcriptional regulation of *G6pc* in carnivorous fish may explain why these animals are glucose intolerant. We previously reported that long-term starvation and energy restriction increase hepatic *G6pc* expression at mRNA level in *S. aurata* (Caseras *et al.* 2002). Consistent with strong dependence upon *G6pc* expression of hepatic glucose cycling in mammals

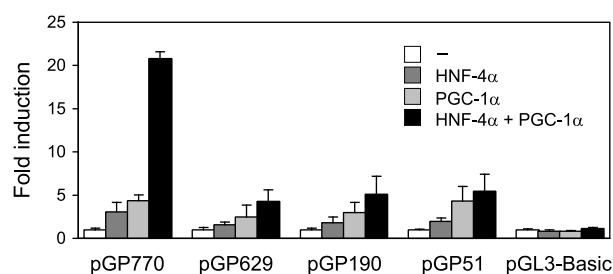


Figure 5 Effect of HNF-4 α and PGC-1 α on the activity of *S. aurata* *G6pc* promoter in HepG2 cells. The cells were transiently transfected with pGL3-Basic or the promoter constructs pGP770, pGP629, pGP190 or pGP51, either with or without 400 ng expression plasmids encoding HNF-4 α or PGC-1 α . The promoter activity of reporter constructs alone was set at 1. Variations in transfection efficiencies were corrected for using CMV- β (*lacZ*) as an internal control. The data represent the mean \pm s.d. values of two independent duplicate experiments.

(Nordlie *et al.* 1999, Pagliassotti *et al.* 2003), postprandial short-term modulation of *G6Pase* mRNA in the liver of regularly fed *S. aurata* occurs, with minimal mRNA levels 4–15 h after food intake (Caseras *et al.* 2002). In the present study, we have isolated the 5'-flanking region of the *S. aurata* *G6pc* and analysed its promoter activity in HepG2 cells by transient transfection. This genomic fragment allowed us to assess transcriptional regulation of the piscine *G6pc* promoter by glucose and insulin, and to identify *trans*-regulatory factors.

The promoter region of *S. aurata* *G6pc* was cloned by chromosome walking. Mapping of the transcriptional start indicated the presence of a start site located 106 bp upstream of the translation start codon. Our localisation of the transcription start site predicts an 1815 bp mRNA, which is consistent with the 1.8 kb transcript identified by Northern blotting (Metón *et al.* 2004).

The functionality of the putative promoter region of fish *G6pc* was tested by transient transfection of HepG2 cells with fusion constructs of the 850 bp isolated by chromosome walking and sequential 5' deletions of this fragment to the luciferase gene. The longest construct (pGP770) exhibited 25-fold higher luciferase activity than the promoterless pGL3-Basic. Deletions of the promoter region

between -770 and -190 did not significantly affect the promoter activity as compared with the pGP770 construct. Therefore, it can be inferred that this region is not essential for promoter basal activity. Deletion between -190 and -51 resulted in a significant decrease in the promoter activity. The shorter construct -51 to +80 (pGP51) conferred moderate promoter activity. These data suggest the presence of positive regulatory element(s) within 190 bp upstream of the transcription start site, and indicate that this region is a core functional promoter for basal transcriptional activation of *G6pc*.

In rats, starvation and hormones that increase cAMP stimulate *G6pc* expression, whereas refeeding and insulin administration decrease it (Argaud *et al.* 1996, Minassian *et al.* 1999). Insulin inhibits basal *G6pc* expression as well as *G6pc* stimulation by glucose, glucocorticoids, cAMP and fatty acids. Studies *in vivo* and *in vitro* have shown that glucose stimulates *G6pc* expression in rats. However, the induction of *G6pc* by glucose is paradoxical and has been linked to a balancing effect with that of insulin to avoid complete depletion of the enzyme during meal absorption, to control the hepatic glycogen storage and to prepare the transition to fasting periods (Argaud *et al.* 1997, Chatelain *et al.* 1998, Massillon 2001).

In the present study, repression of *G6pc* occurred in insulin-treated fish and isolated hepatocytes. In contrast to glucose-dependent activation of *G6pc* expression in rats, G6Pase mRNA levels decreased in *S. aurata* after glucose administration. Interestingly, glucose did not modulate *G6pc* expression in isolated hepatocytes, suggesting that glucose-dependent repression *in vivo* may result from a prevailing effect of insulin in a physiological state that leads to increased insulin levels. Treatment with glucose plus insulin resulted in a marked reduction of G6Pase mRNA both *in vivo* and in isolated hepatocytes. These findings argue for an *in vivo* repression of *G6pc* in the liver of *S. aurata* caused by a hyperglycaemic state following food intake. This agrees with suppression of hepatic glucose production by hyperinsulinaemia and hyperglycaemia through inhibition of G6Pase in rats (Guignot & Mithieux 1999), and with the postprandial rise in blood glucose levels followed by a decrease of hepatic *G6pc* expression previously observed in regularly fed fish (Caseras *et al.* 2002). The lack of stimulatory effect of glucose on fish *G6pc in vivo* is consistent with previous results

indicating that increasing carbohydrate dietary content does not affect hepatic G6Pase mRNA levels in *S. aurata* (Caseras *et al.* 2002). Likewise, Hornbuckle *et al.* (2001) did not observe a stimulatory effect of glucose on G6Pase mRNA in conscious dogs, whereas insulin had an inhibitory effect. Thus, control of *G6pc* expression in carnivorous animals such as *S. aurata* and dogs followed a similar mechanism, which in turn differs from that in rats (omnivore). In HepG2 cells transfected with 770 bp of the *S. aurata G6pc* promoter region, absence of insulin in the culture medium allowed a positive regulatory effect of glucose on the transcriptional activity of the fish *G6pc* promoter. Since glucose administration leads to increased insulin release *in vivo*, the observation that glucose decreased G6Pase mRNA levels in the liver of *S. aurata* may result from a prevailing inhibitory effect of insulin over the effect of glucose on *G6pc* promoter. The possible contribution of glucose-derived metabolites and other hormones to suppression of *G6pc* transcription in fish cannot be excluded.

In contrast to the strong inhibitory effect of insulin on rat *G6pc* promoter activity in H4 IIE hepatoma cells in the absence of glucose (Chen *et al.* 2000), insulin hardly affected the transcriptional activity of *S. aurata G6pc* promoter in HepG2 cells under a no-glucose condition. However, a repressing effect of insulin was observed in the presence of glucose, a situation that is probably closer to the postprandial state in the piscine liver. Hence, as in mammals, insulin overrode glucose-mediated activation of *S. aurata G6pc* promoter. Since the ability of insulin to repress hepatic glucose production is reduced in NIDDM, the fact that insulin had no significant effect on the activity of *S. aurata G6pc* promoter under low-glucose conditions suggests that glucose availability determines insulin-dependent repression of piscine *G6pc*, and thus may contribute to insulin resistance in carnivorous fish.

Recent studies illustrate the role of the coactivator PGC-1 α in the transcriptional activation of mammalian gluconeogenic genes, such as *G6pc* and phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*). PGC-1 α has been shown to mediate induction of mouse *G6pc* by HNF-4 α (Boustead *et al.* 2003, Rhee *et al.* 2003). Puigserver *et al.* (2003) showed that coactivation by PGC-1 α is critical for Foxo1-dependent transcriptional activation of the *G6pc*

and *Pck1* promoters in mice, leading the authors to propose a model in which gluconeogenic gene expression is inhibited by insulin via a PKB-dependent disruption of the complex formed with the coactivator protein PGC-1 α and Foxo1. Indeed, *Pgc1* promoter activity is induced by coexpression of Foxo1 via the IRS within the *Pgc1* promoter in HepG2 cells, and coexpression of PKB was found to mimic the inhibitory effect of insulin on *Pgc1* promoter activity (Daitoku *et al.* 2003). In addition, glucagon may stimulate *G6pc* expression via PGC-1 α . The expression of *Pgc1* is induced by glucagon via cAMP, leading to increased *G6pc* expression, probably by the interaction of PGC-1 α with HNF-4 α and the glucocorticoid receptor. In liver, fasting markedly induces PGC-1 α expression (Lin *et al.* 2002), and overexpression of PGC-1 α in primary hepatocytes increases glucose production and the expression of *G6pc* and *Pck1* (Yoon *et al.* 2001). Furthermore, in several models of NIDDM that are associated with increased gluconeogenesis, *Pgc1* gene expression is also elevated (Hara *et al.* 2002, Yoon *et al.* 2003). On the other hand, heterozygous mutations in the *HNF4a* gene give rise to maturity onset diabetes of the young type 1 (Ryffel 2001). We investigated the effect of overexpression of HNF-4 α and PGC-1 α on *G6pc* promoter activity in HepG2 cells cotransfected with plasmids ranging from -770 to +80 relative to the transcription start site in the *S. aurata G6pc* promoter and sequential 5' deletions of this fragment. A synergistic effect was observed through cotransfection with both HNF-4 α and PGC-1 α and the longest promoter construct, suggesting that coactivation of HNF-4 α occurs in *S. aurata*. Loss of synergism was observed with the shorter constructs, indicating that the sequence between -770 and -629 in the *S. aurata G6pc* promoter region is essential for this effect, presumably by binding of HNF-4 α to this region. These findings suggest that the major role attributed to PGC-1 α in turning on the gluconeogenic programme in mammals may also occur in fish. Since the pGP51 construct was modestly activated by overexpression of PGC-1 α , a second *cis*-element involved in PGC-1 α stimulation within the 51 bp upstream of the transcription start of the *S. aurata G6pc* promoter cannot be ruled out. However, this putative site would be neither necessary nor sufficient for PGC-1 α coactivation of HNF-4 α . The fact that insulin repressed the promoter activity of pGP51 construct excludes a

model involving suppression of PGC-1 α coactivation of HNF-4 α in the piscine *G6pc* promoter to explain insulin repression of *S. aurata G6pc* under high-glucose conditions, as occurs with insulin-dependent disruption of the PGC-1 α -Foxo1 complex in mice (Puigserver *et al.* 2003). Further studies are needed to identify *cis*-elements involved in insulin repression of fish *G6pc*.

Acknowledgements

The authors wish to thank Drs M D Walker, B M Spiegelman and J Whittaker for providing the HNF-4 α , PGC-1 α and insulin receptor B expression vectors respectively. This study was supported by grants from MCYT (Spain), BMC2000-0761 and BIO2003-01098. M Egea is the recipient of a fellowship from the University of Barcelona. We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for correcting the English manuscript.

References

- Argaud D, Zhang Q, Pan W, Maitra S, Pilks SJ & Lange AJ 1996 Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states. Gene structure and 5'-flanking sequence. *Diabetes* **45** 1563-1571.
- Argaud D, Kirby TL, Newgard CB & Lange AJ 1997 Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* **272** 12854-12861.
- Baanante IV, García de Frutos P, Bonamusa L & Fernández F 1991 Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6-P2 and PFK-2. *Comparative Biochemistry and Physiology* **100B** 11-17.
- Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bar-Tana J & Walker MD 2002 Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 α . *Journal of Biological Chemistry* **277** 25914-25919.
- Boustead JN, Stadelmaier BT, Eeds AM, Wiebe PO, Svitek CA, Oeser JK & O'Brien RM 2003 Hepatocyte nuclear factor-4 α mediates the stimulatory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1 α (PGC-1 α) on glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription in H4 IIE cells. *Biochemical Journal* **369** 17-22.
- Caseras A, Metón I, Fernandez F & Baanante IV 2000 Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochimica et Biophysica Acta* **1493** 135-141.
- Caseras A, Metón I, Vives C, Egea M, Fernández F & Baanante IV 2002 Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* **88** 607-614.
- Chatelain F, Pegorier JP, Minassian C, Bruni N, Tarpin S, Girard J & Mithieux G 1998 Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney: *in vivo* and *in vitro* studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes* **47** 882-889.

- Chen R, Meseck M, McEvoy RC & Woo SL 2000 Glucose-stimulated and self-limiting insulin production by glucose 6-phosphatase promoter driven insulin expression in hepatoma cells. *Gene Therapy* **7** 1802–1809.
- Christiansen DC & Klungsoyr L 1987 Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* **88B** 701–711.
- Clore JN, Stillman J & Sugerman H 2000 Glucose-6-phosphatase flux *in vitro* is increased in NIDDM. *Diabetes* **49** 969–974.
- Clottes E, Middleditch C & Burchell A 2002 Rat liver glucose-6-phosphatase system: light scattering and chemical characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **408** 33–41.
- Cowey CB & Walton MJ 1989 Intermediary metabolism. In *Fish Nutrition*, pp 260–321. Ed JE Halver. San Diego, CA: Academic Press.
- Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M & Fukamizu A 2003 Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* **52** 642–649.
- Foster JD & Nordlie RC 2002 The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system. *Experimental Biology and Medicine* **227** 601–608.
- Gautier-Stein A, Domon-Dell C, Calon A, Bady I, Freund JN, Mithieux G & Rajas F 2003 Differential regulation of the glucose-6-phosphatase TATA box by intestine-specific homeodomain proteins CDX1 and CDX2. *Nucleic Acids Research* **31** 5238–5246.
- Graham FL & Van der Eb AJ 1973 A new technique for assay of infectivity of human adenovirus 5. *DNA Virology* **52** 456–467.
- Guignot L & Mithieux G 1999 Mechanisms by which insulin, associated or not with glucose, may inhibit hepatic glucose production in the rat. *American Journal of Physiology* **277** E984–E989.
- Guionie O, Clottes E, Stafford K & Burchell A 2003 Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform. *FEBS Letters* **551** 159–164.
- Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S & Kadowaki T 2002 A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to type II diabetes. *Diabetologia* **45** 740–743.
- Heinemeyer T, Chen X, Karas H, Kel AE, Kel OV, Liebich I, Meinhardt T, Reuter I, Schacherer F & Wingender E 1999 Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Research* **27** 318–322.
- Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, *et al.* 2001 CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413** 179–183.
- Hornbuckle LA, Edgerton DS, Ayala JE, Svitek CA, Oeser JK, Neal DW, Cardin S, Cherrington AD & O'Brien RM 2001 Selective tonic inhibition of G-6-Pase catalytic subunit, but not G-6-P transporter, gene expression by insulin *in vivo*. *American Journal of Physiology* **281** E713–E725.
- Huang A, Chen Y, Wang X, Zhao S, Su N & White DW 2004 Functional silencing of hepatic microsomal glucose-6-phosphatase gene expression *in vivo* by adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNA. *FEBS Letters* **558** 69–73.
- Lin B, Morris DW & Chou JY 1997 The role of HNF1 α , HNF3 γ , and cyclic AMP in glucose-6-phosphatase gene activation. *Biochemistry* **36** 14096–14106.
- Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P & Spiegelman BM 2002 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 β (PGC-1 β), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *Journal of Biological Chemistry* **277** 1645–1648.
- Massillon D 2001 Regulation of glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **276** 4055–4062.
- Massillon D, Barzilai N, Chen W, Hu M & Rossetti L 1996 Glucose regulates *in vivo* glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats. *Journal of Biological Chemistry* **271** 9871–9874.
- Massillon D, Chen W, Barzilai N, Prus-Wertheimer D, Hawkins M, Liu R, Taub R & Rossetti L 1998 Carbon flux via the pentose phosphate pathway regulates the hepatic expression of the glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in conscious rats. *Journal of Biological Chemistry* **273** 228–234.
- Massillon D, Arinze IJ, Xu C & Bone F 2003 Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in cultured hepatocytes and H4 IIE cells by short-chain fatty acids: role of hepatic nuclear factor-4 α . *Journal of Biological Chemistry* **278** 40694–40701.
- Metón I, Egea M & Baanante IV 2003 New insights into the regulation of hepatic glucose metabolism in fish. In *Recent Research Developments in Biochemistry*, vol 4 (1), pp 125–149. Ed SG Pandalai. Kerala, India: Research Signpost.
- Metón I, Caseras A, Fernández F & Baanante IV 2004 Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **138B** 145–153.
- Minassian C, Montano S & Mithieux G 1999 Regulatory role of glucose-6 phosphatase in the repletion of liver glycogen during refeeding in fasted rats. *Biochimica et Biophysica Acta* **1452** 172–178.
- Moon TW 2001 Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology* **129B** 243–249.
- Nordlie RC, Foster JD & Lange AJ 1999 Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition* **19** 379–406.
- Pagliassotti MJ, Wei Y & Bizeau ME 2003 Glucose-6-phosphatase activity is not suppressed but the mRNA level is increased by a sucrose-enriched meal in rats. *Journal of Nutrition* **133** 32–37.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92** 829–839.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, *et al.* 2003 Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature* **423** 550–555.
- Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ & Spiegelman BM 2003 Regulation of hepatic fasting response by PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 α in gluconeogenesis. *PNAS* **100** 4012–4017.
- Ryffel GU 2001 Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *Journal of Molecular Endocrinology* **27** 11–29.
- Schmoll D, Wasner C, Hinds CJ, Allan BB, Walther R & Burchell A 1999 Identification of a cAMP response element within the glucose-6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4 IIE hepatoma cells. *Biochemical Journal* **338** 457–463.
- Streeper RS, Svitek CA, Chapman S, Greenbaum LE, Taub R & O'Brien RM 1997 A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *Journal of Biological Chemistry* **272** 11698–11701.
- Streeper RS, Eaton EM, Ebert DH, Chapman SC, Svitek CA & O'Brien RM 1998 Hepatocyte nuclear factor-1 acts as an accessory factor to enhance the inhibitory action of insulin on mouse glucose-6-phosphatase gene transcription. *PNAS* **95** 9208–9213.
- Streeper RS, Svitek CA, Goldman JK & O'Brien RM 2000 Differential role of hepatocyte nuclear factor-1 in the regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription by cAMP in liver- and kidney-derived cell lines. *Journal of Biological Chemistry* **275** 12108–12118.

- Vander Kooi BT, Streeper RS, Svitek CA, Oeser JK, Powell DR & O'Brien RM 2003 The three insulin response sequences in the glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter are functionally distinct. *Journal of Biological Chemistry* **278** 11782–11793.
- Van de Werve G, Lange AJ, Newgard C, Méchin M-C, Li Y & Berteloot A 2000 New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose-6-phosphatase system. *European Journal of Biochemistry* **267** 1533–1549.
- Van Schaftingen E & Gerin I 2002 The glucose-6-phosphatase system. *Biochemical Journal* **362** 513–532.
- Von Groote-Bidlingmaier F, Schmoll D, Orth HM, Joost HG, Becker W & Barthel A 2003 DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300** 764–769.
- Wasner C, Grempler R, Walther R & Schmoll D 2001 Basal level glucose-6-phosphatase gene transcription requires binding sites for Sp family proteins within the gene promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* **1521** 126–129.
- Wilson RP 1994 Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* **124** 67–80.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, *et al.* 2001 Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413** 131–138.
- Yoon JC, Xu G, Deeney JT, Yang SN, Rhee J, Puigserver P, Levens AR, Yang R, Zhang CY, Lowell BB, *et al.* 2003 Suppression of β cell energy metabolism and insulin release by PGC-1 α . *Developmental Cell* **5** 73–83.
- Yoshimasa Y, Seino S, Whittaker J, Takechi T, Kosaki A, Kuzuya H, Imura H, Bell GI & Steiner DF 1988 Insulin-resistant diabetes due to a point mutation that prevents insulin proreceptor processing. *Science* **240** 784–787.
- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R & Siebert PD 2001 Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* **30** 892–897.

Received 19 July 2004

Accepted 9 August 2004

Made available online as an Accepted Preprint

15 September 2004

ALT2 gene is regulated by Activating Transcription Factor 4.

María C. Salgado^a, Isidoro Metón^a, and Isabel V. Baanante^{a*}

^aDepartament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

Keywords: Alanine aminotransferase 2, Alanine aminotransferase 1, Activating Transcription Factor 4, histidinol, tunicamycin.

* Corresponding author and to whom reprint requests should be addressed: Isabel V. Baanante, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024521; Fax: +34 934024520; E-mail: baanantevazquez@ub.edu

Abstract

Alanine aminotransferase (ALT) provides a molecular link between carbohydrate and amino acid metabolism. Knowledge about the transcriptional control of ALT enzymes are scarce. To gain insight into the transcriptional regulation of the mitochondrial *ALT* gene (*ALT2*), we cloned and characterized the human *ALT2* promoter. 5'-deletion analysis of *ALT2* promoter in transiently transfected HepG2 cells and site-directed mutagenesis allowed us to identify ATF4 as a new factor involved in the transcriptional regulation of *ALT2* expression. Quantitative RT-PCR assays showed that histidinol and tunicamycin increased ATF4 levels in HepG2 cells, leading to *ALT2* up-regulation but not *ALT1* transcription. Moreover, ATF3 and CHOP prevented the increase in transcriptional activation of *ALT2* promoter induced by histidinol or tunicamycin. COUP-TF1 prevented the increase in transcriptional activation of *ALT2* promoter induced by tunicamycin. Our findings suggest that *ALT2* isoenzyme plays a role in the response to stress situations.

Introduction

Alanine aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) links carbohydrate and amino acid metabolism through catalysing the reversible transamination between L-alanine and 2-oxoglutarate to form pyruvate and L-glutamate. In humans and mice, two ALT isoforms, ALT1, cytosolic, and ALT2, mitochondrial, each encoded by a different gene, have been cloned (Sohocki et al., 1997; Yang et al., 2002; Jadhao et al., 2004). Western blotting indicates that human ALT1 is mainly expressed in liver, skeletal muscle, kidney and to a lesser extent, in heart, whereas ALT2 is mainly expressed in heart and skeletal muscle (Lindblom et al., 2007).

High levels of ALT activity are associated with hepatic injury conditions such as hepatitis, cirrhosis, and drug hepatotoxicity (Dufour et al., 2000; Glinghammar et al., 2009), but also with other pathologies such as obesity, muscle diseases, type 1 diabetes, coronary atherosclerotic disease, and metabolic syndrome (Nathwani et al., 2005; Wannamethee et al., 2005; West et al., 2006; Adibi et al., 2007; Iacobellis et al., 2007; Schindhelm et al., 2007; De Luis et al., 2008; Leeds et al., 2009; McMillan et al., 2011). In addition, a rise of serum ALT activity within the reference values in healthy populations is considered a marker for the development of insulin resistance and type 2 diabetes (Vozarova et al., 2002; Hanley et al., 2004; West et al., 2006; Sattar et al., 2007; Zhang et al., 2010).

Recent efforts are focused to develop better tools for the diagnosis and prognosis of the various diseases associated with increased ALT activity. However, little attention has been paid to how the expression of ALT isoenzymes is regulated. Gray et al. (2007) reported a reduction of ALT1 mRNA levels, but not ALT2 mRNA levels, in the liver of Krüppel-like factor 15-deficient mice. Transfection experiments showed that peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonist and fenofibric acid induce specifically the human *ALT1* promoter, whereas the human *ALT2* promoter is unaffected (Thulin et al., 2008). In *Sparus aurata*, Anemaet et al. (2010), showed that the transcription factors p300 and cMyb transactivate the cALT promoter and that p300 might be involved in up-regulation of cALT expression in STZ-treated fishes. More recently, Salgado et al. (2011) demonstrated that HNF4 α transactivated the mALT gene but not the cALT gene in kidney of *S. aurata*.

Activating transcription factor 4 (ATF4) is a member of the basic region leucine zipper (bZIP) transcription factor family, and can regulate gene transcription by forming a homodimer or heterodimer with other bZIP transcription factors (Ameri and Harris, 2008). Several ATF4 target genes have been identified that contain a genomic sequence comprised of

a half-site for C/EBP family members and a half-site for ATF members that is referred to as a C/EBP-ATF response element (CARE) (Kilberg et al., 2009).

ATF4 is a stress responsive gene, which is upregulated by several factors/stressors, including oxygen deprivation (Hypoxia/anoxia), amino acid deprivation, endoplasmic reticulum stress (ER stress), oxidative stress, and by the growth factor heregulin (Hardling et al., 2003; Ameri et al., 2004; Blais et al., 2004). The various stress signals integrate to a common pathway of increased translation of ATF4 which subsequently ensures supply of amino acids for protein biosynthesis and protects cells against oxidative stress, by modulating a number of genes involved in mitochondrial function (e.g., Lon mitochondrial protease homologue), amino acid metabolism and transport (e.g. asparagine synthetase), as well as in redox chemistry (e.g., NADH-cytochrome B5 reductase homolog) (Hardling et al., 2003; Cullinan and Diehl, 2006). ATF4 can function as a transcriptional activator, as well as a repressor and is required for skeletal and eye development and haematopoiesis .

Since molecular studies devoted to unravel the bases that govern regulation of *ALT* gene expression in mammals are scarce, the aim of this study was to increase the current knowledge of human ALT2 regulation in order to better understand the role played by this enzyme in the cell. In the present study we characterized for the first time the human ALT2 promoter and addressed the role of ATF4 in the transcriptional control of ALT1 and ALT2 in HepG2 cells. We studied the regulation of the expression of ALT2, ALT1 and ATF4 in HepG2 cells after treatment with histidinol and tunicamycin.

Materials and methods

Cloning of the 5'-flanking region of ALT2 gene from human.

The 5'-flanking region of ALT2 was isolated by PCR. To this end, the gene-specific primers MC0507 and MC0505 were used together with human genomic DNA (Roche) as a template, obtaining a fragment of 2026 pb. The 2026 bp fragment obtained was ligated into the pGEM-T Easy plasmid (Promega) to generate pGEMALT2-2026. Two independent clones were fully sequenced on both strands according to the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Construction of reporter gene plasmids

The human ALT2-luciferase reporter fusion construct, which harbours promoter sequences located between positions -1689 and +315 relative to the transcription start site (pGALT2-1689) was generated by PCR. To this end, the gene-specific primers MC06H1 and MC06H2 were used together with pGEMALT2-2026 as a template. The PCR product was restricted with *MluI/HindIII* and ligated into the pGL3-*Basic* promoterless luciferase reporter plasmid (Promega) previously digested with the same enzymes. To obtain the pGALT2-1544 reporter construct (-1544 to +315 bp), pGALT2-1689 was digested with *MluI* and *MlsI*, the digested plasmid was filled and dephosphorilated by treatment with CIP (SIGMA) for 1h and was thereafter ligated with an *MlsI/MlsI* fragment (corresponding to nucleotides -1544 to -508) obtained from digestion of pGALT2-1689 with *MlsI*. Reporter construct pGALT2-507 (-507 to +315 bp) was obtained by self-ligation of filled-in ends of pGALT2-1689 after digestion with *MlsI/MluI*. Construct pGALT2-182 (-182 to +315 bp) was obtained by digesting pGALT2-1689 with *RsrII/MluI* followed by chew-back and filled-in reactions with Klenow enzyme and self-ligation. The pGALT2-100 (-100 to +315 bp) construct was obtained by digesting pGALT2-1689 with *ApaI/MluI* followed by chew-back and filled-in reactions with Klenow enzyme and self-ligation. The pGALT2+185 (+185 to +315 bp) plasmid was obtained by PCR using primer pairs MC06H5OK and MC06H2, and pGALT2-1689 as a template. The PCR product was digested with *MluI* and *HindIII* and ligated to the pGL3-*Basic* vector, previously digested with the same enzymes. Construct pGALT2-1544mutATF4 (-1544 to +315 bp), which harbours a mutated ATF4 binding site, was obtained by PCR using oligonucleotides MC0950 and MC06H2. The PCR product was digested with *MluI* and *HindIII* and ligated to pGL3-*Basic* digested with the same enzymes. Then the construct was digested with *MlsI* and dephosphorilated and the previously described *MlsI* fragment (-1544 to -507) was ligated. All constructs were verified by cycle sequencing.

Molecular cloning of human ATF4 cDNA.

RT-PCR experiment was carried out with total RNA from HepG2 cells. The synthesized cDNA was used as a template for PCR using primers MC0955 and MC0956, designed from data bank sequence for human ATF4 (GenBank: D90209.1). The PCR was conducted through 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and DNA synthesis at 72°C for 2 min, followed by a final extension step of 5 min. The resulting product was restricted with *BamHI* and *HindIII* and ligated into pcDNA3, previously digested with the

same enzymes, to generate pcDNA3-ATF4. Two independent clones were fully sequenced on both strands.

Cell transfection and luciferase assay

The human hepatoma derived cell line HepG2 (ATCC HB 8065) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/l penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2mM glutamine. The cells were grown in six-well plates at 37°C in 5% CO₂. The calcium phosphate coprecipitation method was used for the transient transfection of HepG2 cells at 45-55% confluence. Cells were transfected with 2 µg of reporter construct, and when necessary, with 200 ng of expression vector encoding different transcription factors. To correct for variations in transfection efficiency, 250 ng of CMV-β (lacZ) plasmid were included in each transfection. The cells were harvested 16 h later, washed in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 15 min with 300 µl of Cell Culture Lysis Reagent (Promega). Cell debris was removed by centrifugation at 10000g for 30 sec, and luciferase activity was measured in the supernatant after the addition of the Luciferase Assay Reagent (Promega) in a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs). The activity of β-galactosidase in 20-50 µl of the clear lysate was measured as previously described (Salgado et al., 2004).

Quantitative real time PCR

The reverse transcriptase reaction was performed on 2 µg of total RNA isolated from cultured HepG2 cells by incubation with Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) RT (Invitrogen) for 60 min at 37°C in the presence of random hexamer primers. The cDNA product was used for subsequent quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis.

ALT2, ALT1 and ATF4 mRNA levels were determined in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 0.4 µM of each primer (MC0916/MC0917, MC100/MC101 and MC104/MC105 for ALT2, ALT1 and ATF4 respectively), 10 µl of SYBR Green (Applied biosystems) and 1.6 µl of the diluted cDNA mixture in a final volume of 20 µl. The amount of mRNA to be used for the gene of interest in each of the samples was normalized with human ribosomal-18s using primer pair MC109/MC110 (Table 1). Variations in gene expression were calculated by the standard $\Delta\Delta C_t$ method.

Results

Cloning of the 5'-flanking region of the human ALT2 gene

A 2026 bp of the 5'-flanking region (-1689 to +315 bp relative to the transcription start site) of ALT2 was isolated by PCR, using oligonucleotides designed from the human genomic sequence (Fig. 1A). Sequence analysis of the isolated fragment carried out using the MatInspector program (Cartharius et al., 2005), revealed the presence of several putative transcription factor binding sites in the proximal promoter region (Fig. 1A).

Identification of a functional human ALT2 promoter

To determine whether the 5'-flanking region of the ALT2 gene contains a functional promoter, the isolated 2026 bp fragment was subcloned into the promoterless plasmid pGL3-*Basic*, upstream of the luciferase reporter gene. HepG2 cells were transiently cotransfected with the resulting construct (pGALT2-1544) and a lacZ-containing plasmid, which was used as an internal control for transfection efficiency. The cell lysate was assayed for luciferase and β -galactosidase activity 16 h after transfection. The pGALT2-1544 construct exhibited a 118-fold increase in luciferase activity relative to the promoterless vector, pGL3-*Basic* (Fig. 1B). This result indicates that the region comprised within 1544 nucleotides upstream from the transcription start site of human ALT2 contains a functional promoter.

To further examine the functional regions involved in modulation of basal ALT2 expression in humans, a sequential 5'-deletion analysis of the promoter fragment was carried out. The deleted fragments, with 5' ends ranging from -507 to +185 and 3' ends at +315, were fused to the luciferase reporter gene and transfected into HepG2 cells. The expression induction of pGALT2-507, pGALT2-182, pGALT2-100 and pGALT2+185 were 105, 54, 12 and 4-fold compared to the empty vector. These findings the presence of *cis*-acting elements within 1544 bp upstream from the transcriptional start of human ALT2 gene. Due to the fact that the promoter sequence of human ALT2 has a putative CARE element, and that ATF4 is involved in transcriptional regulation of several amino acid metabolism regulatory enzymes (Siu et al., 2002; Sato et al., 2004; Adams, 2007), this study was focused on the effect of ATF4 on the promoter activity of human ALT2.

ATF4 transactivates the human ALT2 promoter.

In silico analysis indicated the presence of a putative ATF4 response element in the human ALT2 promoter at nucleotide position -435 to -427 upstream from the transcription

start site (Fig. 1A). To analyse the effect of ATF4 on the transcriptional activity of ALT2 gene, transient transfection experiments were performed in HepG2 cells. Reporter constructs containing sequential 5'-deletions of pGALT2-1544 were introduced into HepG2 cells together with an expression plasmid encoding human ATF4. Cotransfection of ATF4 with reporter constructs equal to or longer than pGALT2-507 resulted in a 4-fold induction of the promoter activity relative to the basal activity of the corresponding promoter construct. These constructs retain an ATF4 response element at position -435 to -427, from the transcription start site. However, no significant enhancement of promoter activity was detected when transfection experiments were performed with reporter constructs that lack the -435 to -427 element (pGALT2-182, pGALT2-100, pGALT2+185 or the promoterless vector pGL3-*Basic*) (Fig. 2).

To analyse whether the transcriptional activating action of ATF4 is restricted to ALT2 or it may transactivate also ALT1 gene, a plasmid encoding the ALT1 promoter was transfected into HepG2 cells together with an expression plasmid encoding ATF4. No enhancement of the transcriptional activity of ALT1 was observed (data not shown).

Mutating the ATF4 response element abolishes the ATF4 dependent transactivation of the human ALT2 gene.

A three point mutation in the putative CARE element located at position -435 to -427 of the promoter construct pGALT2-1544 was introduced to generate a reporter construct encompassing a mutated ATF4 response element (pGALT2-1544mutATF4). Cotransfection experiments of this construct and the expression vector encoding human ATF4 were performed in HepG2 cells to assess whether this transcription factor still remains able to transactivate the mutant reporter construct. As shown in Fig. 3, introduction of three point mutations in the CARE element prevented the enhancement of transcriptional activity by human ATF4 in transient transfection experiments. These results demonstrated that the ATF4 response element, found at position -435 to -427 upstream of the transcriptional start of the human *ALT2* promoter, is responsible for *ALT2* gene transactivation by ATF4.

ALT2, but not ALT1 is upregulated in response to histidinol and tunicamycin in HepG2 cells.

Having concluded that ATF4 binds to and transactivates the human *ALT2* promoter whereas the human *ALT1* promoter is unaffected, we studied the role of ATF4 the transcriptional expression of ALT2 and ALT1 in HepG2 cells under different stress

conditions that have been previously reported to promote overexpression of ATF4 protein (Kilberg et al, 2009).

First, we tested whether expression of ALT1 and ALT2 is influenced by amino acid starvation. We therefore made use of L-histidinol, a histidine analog, which inhibits activation of histidine by histidyl-tRNA synthetase (Hansen et al., 1972). Analysis by qRT-PCR revealed that this condition increased ALT2 and ATF4 mRNA levels in the HepG2 cells. Between 6h and 25h after treatment, ATF4 levels were 4 fold higher than that observed in untreated cells. ALT2 mRNA levels followed a similar pattern than that of ATF4; 4-fold induction of ALT2 expression was observed between 6h and 14h after treatment, whereas 25h of treatment caused a 2-fold increase (Fig. 4). However, ALT1 mRNA levels were not significantly affected by histidinol treatment during the first 8h. Furthermore, ALT1 expression showed a tendency to decrease following 14h of histidinol treatment. After 25h, ALT1 mRNA levels dropped to 50% of the values observed in untreated cells. (Fig. 4)

We further tested whether expression of ALT1 and ALT2 is influenced by endoplasmic reticulum (ER) stress. HepG2 cells were incubated with the N-glycosylation inhibitor tunicamycin (TM). qRT-PCR analysis indicated that this ER stressor increased the levels of ATF4 and ALT2 genes by 3-fold with a maximum at 6h to 15h and 3h to 15h after treatment, respectively, and both genes showed a tendency to decrease following 24h of incubation (Fig. 5). However, the ALT1 mRNA levels showed a tendency to decrease following 8h of TM exposure. Between 15h and 24h of TM treatment ALT1 expression decreased to 50% of the values observed in non-treated cells (Fig. 5).

Effect of histidinol and TM on ALT2 promoter activity. ATF3, COUP-TF and CHOP act as a transcriptional repressors of ATF4 induced ALT2 promoter.

We next tested the effect of histidinol and TM on the ALT2 promoter activity. For that purpose, we transfected HepG2 cells with pGALT2-1544 and pGALT2-1544mutATF4 plasmids and exposed the cells to histidinol, TM and the transcription factors ATF3, COUP-TF and CHOP. Consistent with the induction of ALT2 mRNA following TM and histidinol treatment (Figs. 4 and 5), these compounds induced the wild-type ALT2 promoter activity by 7- and 3-fold respectively. The effect of ATF3, COUP-TF and CHOP on the induction of ALT promoter activity in HepG2 cells treated with histidinol or TM was also addressed. ATF3 had an 50% inhibitory effect on the wild type promoter. The TM-dependent induction of ALT promoter activity was completely abolished by cotransfection of the wild-type promoter with ATF3, an effect that was also observed when the cells were treated with

histidinol. COUP-TF caused a slightly increase in the basal promoter activity and originated a decrease in the induction of the promoter activity by TM of about 75%, whereas it did not exhibit any effect on histidinol treated cells. CHOP had no effect on basal promoter activity. Transfection of HepG2 cells with CHOP, prevented the induction on ALT2 promoter activity by 75% in the cells incubated with TM and histidinol alike.

Discussion

One of the functional consequences of ATF4 expression is to maintain intracellular amino acid levels. Intracellular amino acid levels are tightly regulated through a complex interplay of several processes, including the synthesis of nonessential amino acids; the import, export and degradation of essential and nonessential amino acids; and protein synthesis and degradation. ATF4 has been shown to regulate a number of enzymes involved in amino acid synthesis, such as asparagine synthetase, phosphoserine aminotransferase and phosphoserine phosphatase, the amino acid transporters solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter) member 4 (Slc1a4), Slc7a1 and Slc7a5, and amino acid t-RNA synthetases such as alanyl-tRNA synthetase and threonyl-tRNA synthetase (Siu et al., 2002; Sato et al., 2004; Adams, 2007).

To study the transcriptional regulation of ALT2, we isolated and characterized the promoter region of ALT2 from human. The functionality of the putative promoter region of human ALT2 was tested by transient transfection of human hepatoma HepG2 cells. Cells were transfected with fusion constructs containing sequential 5'-deletions of the 1544 bp fragment promoter isolated by PCR. We found that the promoter region within 1544 bp upstream from the transcription start site contains a functional promoter. Due to the presence of a putative ATF4 binding site and the fact that there is increasing evidence for the involvement of ATF4 in the transcriptional control of several regulatory enzymes of amino acid metabolism (Siu et al., 2002; Sato et al., 2004; Adams, 2007), we addressed whether ATF4 plays a role in the transcriptional control of ALT2.

In this study, we demonstrated that ATF4 interacts specifically with the CARE element located between -435 and -427 bp upstream from the transcription start site of the human ALT2 gene promoter. Transient transfection studies carried out in HepG2 cells allowed us to demonstrate that ATF4 confers an activating signal by binding to the CARE element in the human ALT2 promoter. Mutations in the CARE element into the pGALT2-1544 construct, abolished the transcriptional activation induced by ATF4. These findings confirm that ATF4

transactivates the ALT2 promoter. In contrast, ALT1 promoter was not induced by ATF4, suggesting that ATF4 exerts a specific role on ALT2 promoter.

TM and histidinol treatment increased the ALT2 promoter activity by 7 and 2-fold respectively. ATF3 completely prevented the TM and histidinol effect on ALT2 promoter activity. COUP-TF1 had no effect on the promoter induction on histidinol treated cells, but prevented by 75% the promoter induction activity due to the TM incubation. CHOP dropped by 75% the increase in promoter activity following TM or histidinol treatment. These results are in accordance to the fact that ATF3 and CHOP, together with C/EBP β , after being induced by ATF4 itself, cause a suppression of transcription of the previously ATF4 induced genes, back toward the basal level. This self-limiting model for ATF4 action has been reported for several CARE-containing genes such as ASNS and arginine/lysine transporter cat-1 (Pan et al., 2003; Lopez et al., 2007; Shan et al., 2009).

Our results revealed that treatment with TM (5 μ mol/ml) or histidinol (2 mM) resulted in an up-regulation of ALT2 and ATF4 mRNA levels in HepG2 cells. However, ALT1 mRNA levels showed a tendency to decrease. Since up-regulation of ATF4 α expression correlated with high mRNA levels of ALT2 in HepG2 cells, our findings point to a specific role of ATF4 in the transcriptional regulation of ALT2.

The liver plays important roles in regulating blood levels of amino acids and synthesizing glucose from excess amino acids. The presence of ALT1 mainly in the hepatic periportal region in mammals (Lenartowicz i Wojtczac, 1988; Dieterle i col·l, 1978; Matsuzawa i col·l, 1997; Botini i col·l, 2005), the regulation of ALT1 expression by the transcription factor KLF15, involved in gluconeogenesis (Gray i col·l, 2007; Takashima i col·l, 2010), and the increase in ALT cytosolic activity, but not in the mitochondrion, in rats under prolonged starvation (Swick i col·l, 1965), are indicative of the role of ALT1 in gluconeogenesis. The localization of ALT2 mainly in the periportal region (Lenartowicz i Wojtczac, 1988), the fact that some authors have indicated that the direction of the enzyme reaction is put towards the formation of alanine (Tischeler et al., 1977), and its up-regulation following conditions that increase the ATF4 transcription factor, that favour the amino acid uptake and synthesis, suggest a role of ALT2 as a part of the machinery to cope with stressful situations.

In conclusion, besides reporting the first characterization of the human ALT2 promoter, our results indicate that ATF4 plays an important role in the transcriptional regulation of ALT2 expression in HepG2 cells.

Acknowledgements

This work was supported by the MCYT (Spain) BIO2006-01857 and MICINN (Spain) BIO2009-07589 grants.

Figure captions

Fig. 1. Sequence analysis of the 5' flanking region of *ALT2* gene and deletion analysis and promoter activity of the 5'-flanking region of human *ALT2* gene in HepG2 cells. (A) Sequence analysis of the 5'-flanking region of the human *ALT2* gene. The upstream sequence isolated by chromosome walking is shown in capitals. The arrow indicates the transcription start site. The translation start codon ATG is in boldface and underlined. Several putative binding sites for transcription factors are boxed. (B) The top left part represents genomic organization of the 5'-flanking region of human *ALT2* gene. Relevant restriction sites are indicated. Nucleotide numbering starts with +1, corresponding to the transcription initiation site. The human *ALT2* promoter fragments having varying 5' ends and an identical 3' end (+315) were fused to the luciferase reporter gene in pGL3-*Basic* vector. The constructs were transfected into HepG2 cells along with CMV- β to normalise for transfection efficiency. Luciferase activity is expressed as a fold increase over promoterless reporter plasmid pGL3-*Basic*. Results presented are the mean \pm S.D. from four independent experiments performed in duplicate.

Fig. 2. ATF4 transactivates human *ALT2* promoter in HepG2 cells. HepG2 cells were transfected with the promoter constructs pGALT2-1544, pGALT2-507, pGALT2-182, pGALT2-100, pGALT2+185 or pGL3-*Basic*, with or without an expression plasmid encoding human ATF4. The promoter activity for cells transfected with the constructs alone was set at 1. The results presented are means \pm S.D. from four independent duplicate experiments.

Fig. 3. ATF4 binds to human *ALT2* promoter. Mutations in the ATF4 box abolish transactivation of *ALT2* promoter by ATF4. HepG2 cells were transfected with the promoter constructs pGALT2-1544, pGALT2-1544mutATF4 or pGL3-*Basic*, with or without an expression plasmid encoding human ATF4. The promoter activity displayed by the constructs alone was set at 1. Results presented are means \pm S.D. from four independent duplicate experiments.

Fig. 4. Effect of histidinol on *ALT2*, *ALT1* and ATF4 mRNA levels in HepG2 cells. Average value of two independent real-time PCR assays performed on total RNA isolated from HepG2 cells 0h, 3h, 6h, 8h, 15h and 25h after treatment with histidinol (2mM) is shown. *ALT2*,

ALT1 and ATF4 mRNA levels relative to ribosomal 18s mRNA are expressed as mean \pm S.D. of two duplicates.

Fig. 5. Effect of tunicamycin on ALT2, ALT1 and ATF4 mRNA levels in HepG2 cells. Average value of two independent real-time PCR assays performed on total RNA isolated from HepG2 cells 0h, 3h, 6h, 8h, 15h and 25h after treatment with TM (5 μ mol/ml) is shown. ALT2, ALT1 and ATF4 mRNA levels relative to ribosomal 18s mRNA are expressed as mean \pm S.D. of two duplicates.

Fig. 6. Effect of histidinol, tunicamycin and ATF3, COUPTF-1 and CHOP on the basal activity of ALT2 promoter. HepG2 cells were transfected with the promoter constructs pGALT2-1544 or pGALT2-1544mutATF4, with or without an expression plasmid encoding ATF3, COUPTF-1 or CHOP transcription factors. 24h following transfection, cells were treated with PBS, histidinol (2mM) or TM (5 μ mol/ml) for 8h. The promoter activity displayed by the construct pGALT2-1544mutATF4 alone was set as 1. Results presented are means \pm S.D. from two duplicates.

Table 1.

Primers used in the present study.

Primer	Sequence (5' to 3')	Maps to
MC0505	GCGCGCTTGCGGAGAGAAACCCTG	+320 to +296 ALT2
MC0507	GGGTGGACAGCAAGGGACTGCATG	-1711 to -1688 ALT2
MC06H1	GG <u>ACGCGT</u> GGACATTACATGC	-1689 to -1671 ALT2
MC06H2	GG <u>AAGCTT</u> GCGGAGAGAAACCCTGGCAC	+292 to +315 ALT2
MC06H4OK	GG <u>ACGCGT</u> CAGGCACGTTGCATGCATGCC	+70 to +91 ALT2
MC06H5OK	GG <u>ACGCGT</u> CGAAGCCAGGCTGGCACCGC	+185 to +208 ALT2
MC0950	<u>GACGCGT</u> GTGGCCAAGTCCCAGACTCCTCACCCGCCTTCCTGCCA GCTCTGGTGGGCAGCCGACGGCACCCTGTGGCCTTGGACCCTGAA ACTCGGGGCGATGACTGC	-511 to -411 ALT2
MC0955	<u>GAAGCTT</u> GCCGCCATGACCGAAATGAGCTTCCTG	1 to 21 ATF4 cDNA
MC0956	<u>GGATCC</u> CTAGGGGACCCCTTTTCTTCC	1038 to 1056 ATF4 cDNA
MC104	CGACCAGTCGGGTTTGGGGGC	60 to 80 ATF4 qRT-PCR
MC105	AGCCCGCCTTAGCCTTGTCGC	172 to 152 ATF4 qRT-PCR
MC109	CGGCTACCACATCCAAGGAA	18S qRT-PCR
MC110	GCTGGAATTACCGCGGCT	18S pRT-PCR
MC0916	CATGAACCCGCAGGTGAAGG	ALT2 qRT-PCR
MC0917	TGACCTCTGTGAATGGCTTTTTG	ALT2 qRT-PCR
MC100	GAGCACAGGTGACCGGAGCCA	ALT1 qRT-PCR
MC101	CCTGCTCCAGCTCCAAGGCTCGCT	ALT1 qRT-PCR

Primers used in the present study. The following primers contain restriction sites indicated in bold and underlined: MC06H2 and MC0955, *Hind*III; MC0956 *Bam*HI; MC06H1, MC06H4OK, MC06H5OK and MC0950, *Mlu*I.

Figure 1.

A.



B.

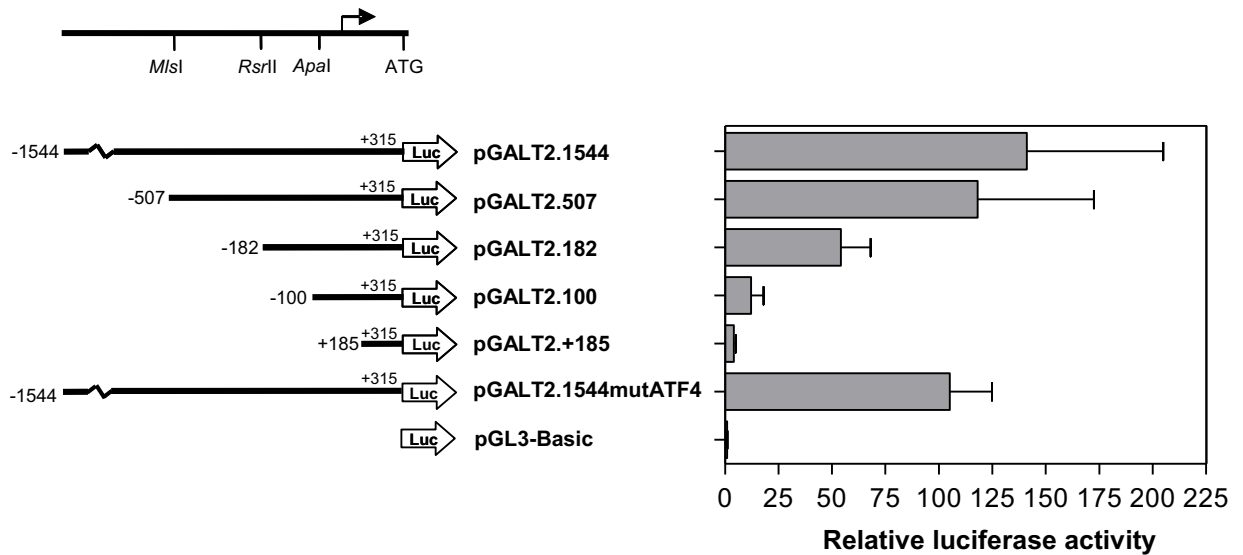


Figure 2.

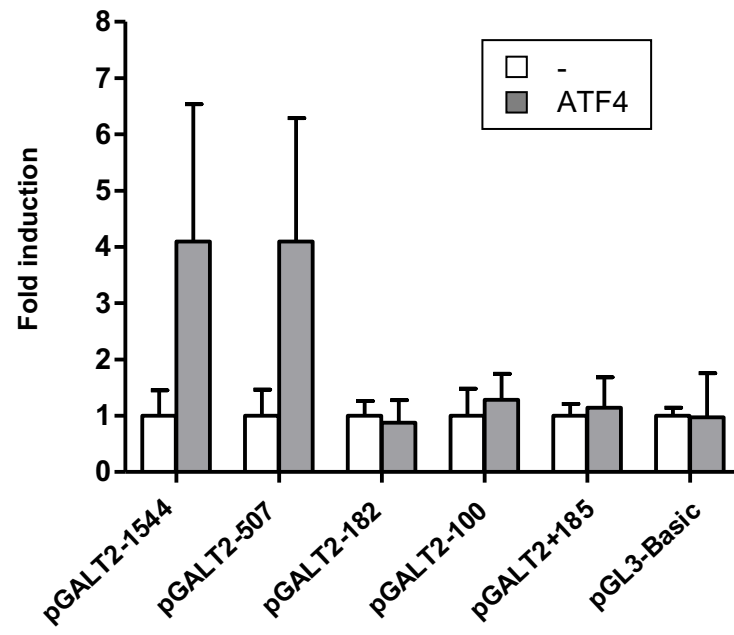


Figure 3.

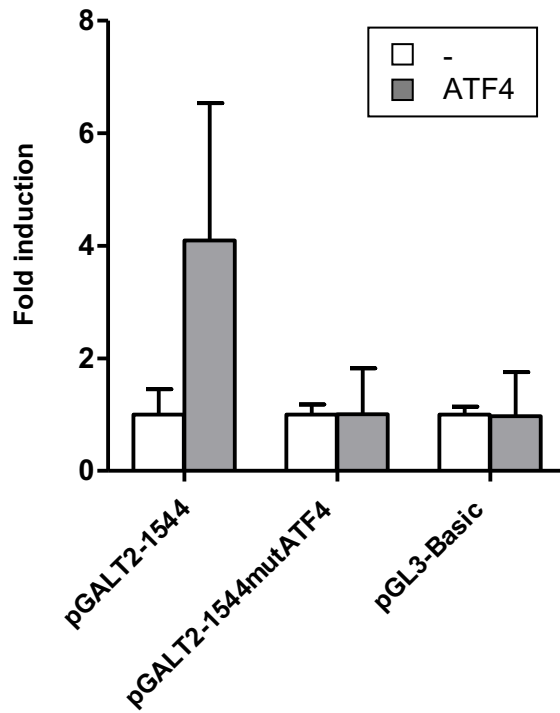


Figure 4.

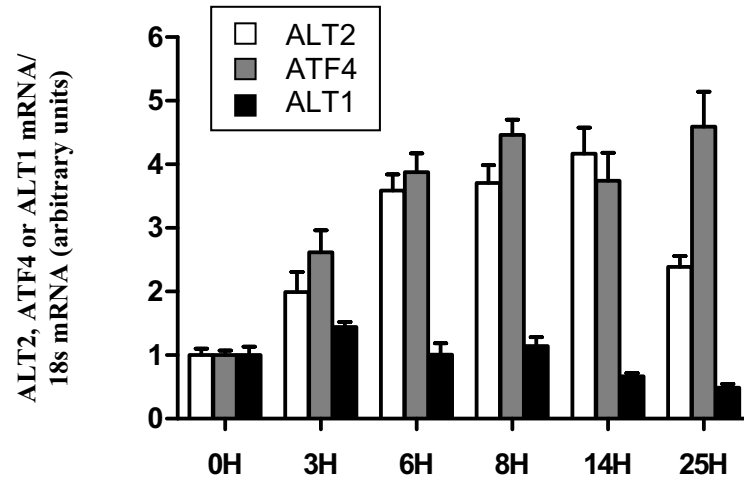


Figure 5.

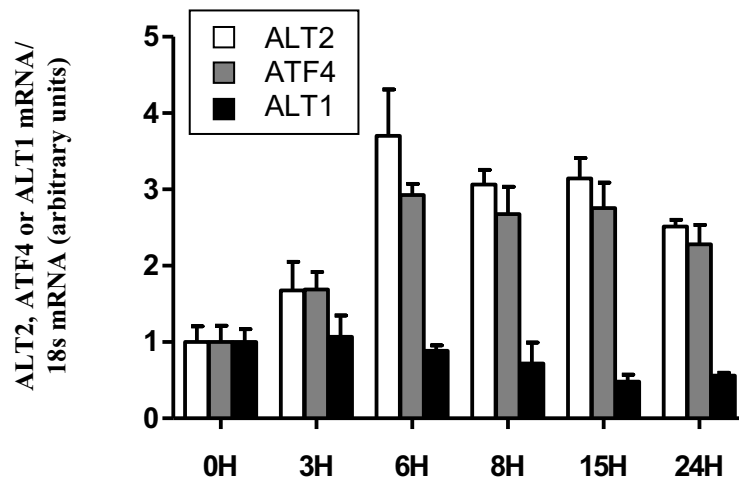
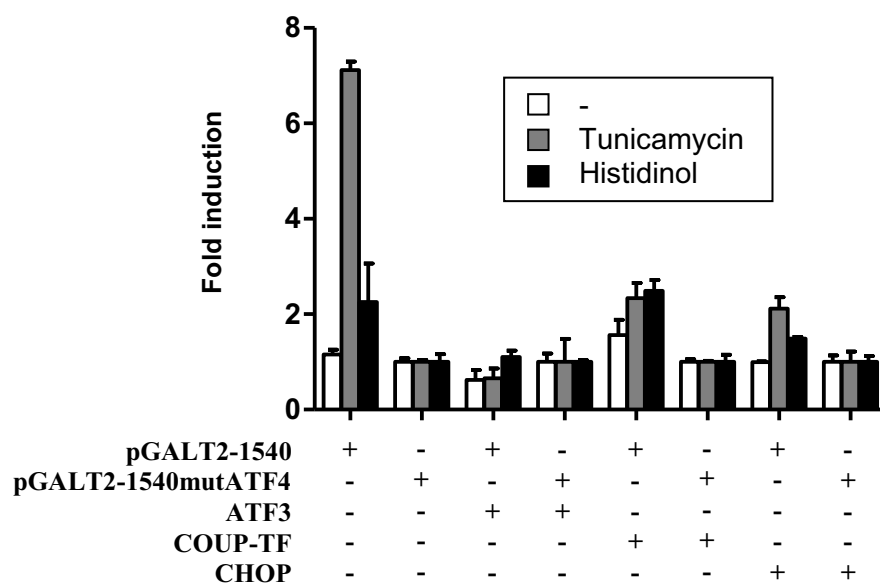


Figure 6.



REFERENCES:

- Adams, C. M. (2007). Role of the Transcription Factor ATF4 in the Anabolic Actions of Insulin and the Anti-anabolic Actions of Glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 16744-16753.
- Ameri, K. & Harris, A. L. (2008). Activating transcription factor 4. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 14-21.
- Ameri, K., Lewis, C. E., Raida, M., Sowter, H., Hai, T. & Harris, A. L. (2004). Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells. *Blood*, 103, 1876-1882.
- Anemaet, I. G., González, J. D., Salgado, M. C., Giralt, M., Fernández, F., Baanante, I. V. & Metón, I. (2010). Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol*, 45, 119-132.
- Blais, J. D., Filipenko, V., Bi, M., Harding, H. P., Ron, D., Koumenis, C., Wouters, B. G. & Bell, J. C. (2004). Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 7469-7482.
- Botini, F. F., Suzuki-Kemmelmeier, F., Nascimento, É. A., Ide, L. T. & Bracht, A. (2005). Zonation of alanine metabolism in the bivascularly perfused rat liver. *Liver International*, 25, 861-871.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. & Werner, T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 21, 2933-2942.
- Cullinan, S. B. & Diehl, J. A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38, 317-332.
- Dieterle, P., Brawand, F., Moser, U. K. & Walter, P. (1978). Alanine metabolism in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem*, 88, 467-473.
- Dufour, D. R., Lott, J. A., Nolte, F. S., Gretch, D. R., Koff, R. S. & Seeff, L. B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clinical Chemistry*, 46, 2050-2068.
- Glinghammar, B., Rafter, I., Lindström, A. K., Hedberg, J. J., Andersson, H. B., Lindblom, P., Berg, A. L. & Cotgreave, I. (2009). Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med*, 23, 621-631.
- Gray, S., Wang, B., Orihuela, Y., Hong, E.-G., Fisch, S., Haldar, S., Cline, G. W., Kim, J. K., Peroni, O. D., Kahn, B. B. & Jain, M. K. (2007). Regulation of Gluconeogenesis by Krppel-like Factor 15. *Cell Metabolism*, 5, 305-312.
- Hanley, A. J. G., Williams, K., Festa, A., Wagenknecht, L. E., D'Agostino Jr, R. B., Kempf, J., Zinman, B. & Haffner, S. M. (2004). Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: The insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*, 53, 2623-2632.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M. & Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, 11, 619-633.
- Iacobellis, G., Moschetta, A., Buzzetti, R., Ribaudo, M. C., Baroni, M. G. & Leonetti, F. (2007). Aminotransferase activity in morbid and uncomplicated obesity: Predictive

- role of fasting insulin. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17, 442-447.
- Jadhao, S. B., Yang, R. Z., Lin, Q., Hu, H., Anania, F. A., Shuldiner, A. R. & Gong, D. W. (2004). Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology*, 39, 1297-1302.
- Kilberg, M. S., Shan, J. & Su, N. (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20, 436-443.
- Lenartowicz, E. & Wojtczak, A. B. (1988). Significance of the alanine aminotransferase reaction in the formation of alpha-ketoglutarate in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 260, 309-319.
- Lindblom, P., Rafter, I., Copley, C., Andersson, U., Hedberg, J. J., Berg, A.-L., Samuelsson, A., Hellmold, H., Cotgreave, I. & Glinghammar, B. (2007). Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum--Differential tissue expression using novel antibodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 466, 66-77.
- Lopez, A. B., Wang, C., Huang, C. C., Yaman, I., Li, Y., Chakravarty, K., Johnson, P. F., Chiang, C. M., Snider, M. D., Wek, R. C. & Hatzoglou, M. (2007). A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochemical Journal*, 402, 163-173.
- Matsuzawa, T., Kobayashi, T., Ogawa, H. & Kasahara, M. (1997). Microheterogeneity and intrahepatic localization of human and rat liver cytosolic alanine aminotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1340, 115-122.
- Nathwani, R. A., Pais, S., Reynolds, T. B. & Kaplowitz, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41, 380-382.
- Pan, Y., Chen, H., Siu, F. & Kilberg, M. S. (2003). Amino Acid Deprivation and Endoplasmic Reticulum Stress Induce Expression of Multiple Activating Transcription Factor-3 mRNA Species That, When Overexpressed in HepG2 Cells, Modulate Transcription by the Human Asparagine Synthetase Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38402-38412.
- Salgado, M. C., Metón, I., Egea, M. & Baanante, I. V. (2004). Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33, 783-795.
- Salgado, M. C., Metón, I., Anemaet, I., González, J., Fernández, F. & Baanante, I. (2011). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Transactivates the Mitochondrial Alanine Aminotransferase Gene in the Kidney of *Sparus aurata*. *Marine Biotechnology*, 1-17.
- Sato, H., Nomura, S., Maebara, K., Sato, K., Tamba, M. & Bannai, S. (2004). Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 109-116.
- Sattar, N., McConnachie, A., Ford, I., Gaw, A., Cleland, S. J., Forouhi, N. G., McFarlane, P., Shepherd, J., Cobbe, S. & Packard, C. (2007). Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study: Specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes*, 56, 984-991.
- Schindhelm, R. K., Dekker, J. M., Nijpels, G., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D. A., Heine, R. J. & Diamant, M. (2007). Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: A 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis*, 191, 391-396.
- Shan, J., Örd, D., Örd, T. n. & Kilberg, M. S. (2009). Elevated ATF4 Expression, in the Absence of Other Signals, Is Sufficient for Transcriptional Induction via CCAAT Enhancer-binding Protein-activating Transcription Factor Response Elements. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 21241-21248.

- Siu, F., Bain, P. J., Leblanc-Chaffin, R., Chen, H. & Kilberg, M. S. (2002). ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 24120-24127.
- Sohocki, M. M., Sullivan, L. S., Harrison, W. R., Sodergren, E. J., Elder, F. F. B., Weinstock, G., Tanase, S. & Daiger, S. P. (1997). Human Glutamate Pyruvate Transaminase (GPT): Localization to 8q24.3, cDNA and Genomic Sequences, and Polymorphic Sites. *Genomics*, 40, 247-252.
- Swick, R. W., Barnstein, P.L., Stange, J.L. (1965). The metabolism of mitochondrial proteins. I. Distribution and characterization of the isozymes of alanine aminotransferase in rat liver. *J Biol Chem*, 240, 3334-3340.
- Takashima, M., Ogawa, W., Hayashi, K., Inoue, H., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Sakaue, H., Wataoka, Y., Emi, A., Senga, Y., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R. & Kasuga, M. Role of KLF15 in Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Metformin Action. *Diabetes*, 59, 1608-1615.
- Thulin, P., Rafter, I., Stockling, K., Tomkiewicz, C., Norjavaara, E., Aggerbeck, M., Hellmold, H., Ehrenborg, E., Andersson, U., Cotgreave, I. & Glinghammar, B. (2008). PPAR[alpha] regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231, 1-9.
- Tischler, M. E., Friedrichs, D., Coll, K. & Williamson, J. R. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.*, 181, 222-236.
- Vozarova, B., Stefan, N., Lindsay, R. S., Saremi, A., Pratley, R. E., Bogardus, C. & Antonio Tataranni, P. (2002). High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51, 1889-1895.
- Wannamethee, S. G., Shaper, A. G., Lennon, L. & Whincup, P. H. (2005). Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care*, 28, 2913-2918.
- West, J., Brousil, J., Gazis, A., Jackson, L., Mansell, P., Bennett, A. & Aithal, G. P. (2006). Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *QJM*, 99, 871-876.
- Yang, R.-Z., Blaileanu, G., Hansen, B. C., Shuldiner, A. R. & Gong, D.-W. (2002b). cDNA Cloning, Genomic Structure, Chromosomal Mapping, and Functional Expression of a Novel Human Alanine Aminotransferase. *Genomics*, 79, 445-450.