

Estudi de la lipoproteïna lipasa mitjançant eines proteòmiques. Possible participació de l'òxid nítric en la seva regulació

Albert Casanovas Torrequebrada

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.tesisenxarxa.net) 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.tesisenred.net) 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.tesisenxarxa.net) 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.

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**ESTUDI DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA
MITJANÇANT EINES PROTEÒMIQUES.
POSSIBLE PARTICIPACIÓ DE L'ÒXID
NÍTRIC EN LA SEVA REGULACIÓ**

ALBERT CASANOVAS TORREQUEBRADA

Barcelona, 2009

**ESTUDI DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA MITJANÇANT EINES PROTEÒMIQUES.
POSSIBLE PARTICIPACIÓ DE L'ÒXID NÍTRIC EN LA SEVA REGULACIÓ**

Memòria presentada per **Albert Casanovas Torrequebrada**, llicenciat en Biologia, per optar al grau de **Doctor per la Universitat de Barcelona**. Programa de Doctorat en Biomedicina (bienni 2003-2005).

Tesi Doctoral realitzada al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona sota la direcció de la Dra. M. Dolores López Tejero i el Dr. Miquel Llobera i Sande.

L'interessat,

Albert Casanovas Torrequebrada

Vist i plau dels directors,

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

Dr. Miquel Llobera i Sande
Catedràtic d'Universitat
Dept. Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Barcelona, Desembre de 2009

A la Núria

We shall not cease from exploration,
and the end of all our exploring
will be to arrive where we started
and know the place for the first time.

T. S. Eliot

AGRAÏMENTS

Amb l'escriptura de la tesi pràcticament enllestida, només em resta escriure els agraïments. Aquest apartat, segurament el més llegit de qualsevol Tesi Doctoral, trenca la rigidesa del text científic i obre una escletxa per conèixer les persones que han participat, d'una manera o altra, en aquest treball. Sou moltes les persones que m'heu acompanyat en aquesta experiència i per això vull donar-vos les gràcies.

En primer lloc vull donar les gràcies als meus directors de tesi, la Dolores i el Miquel (o el Miquel i la Dolores, com preferiu), per brindar-me l'oportunitat de fer recerca i per acollir-me en el vostre grup. Vull agrair-vos el vostre interès per la docència i especialment al Miquel per haver encès, amb les seves classes de *Regulació del metabolisme*, la guspira que m'ha portat fins aquí. També us vull donar les gràcies per la confiança, pel que m'heu ensenyat, pel vostre rigor, per oblidar-vos de les jerarquies, per ser tan propers, tan humans, tan bona gent i per fer tan fàcil treballar amb vosaltres. Ha estat un plaer treballar al vostre costat.

També tinc molt a agrair al Joaquín i a la Montse, del Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB, per haver-me donat l'oportunitat de treballar amb vosaltres i fer que termes com LPL i proteòmica siguin menys distants. Crec que la col·laboració establerta en aquest treball ha estat enormement profitosa per a la meva formació. Gràcies al Joaquín pels consells, per la crítica dels resultats i per l'objectivitat que has aportat quan ha estat necessari. A la Montse, gràcies pel teu interès, per la teva dedicació, per les moltíssimes coses que m'has ensenyat, per gaudir amb la teva feina i per contagiar l'entusiasme pel que fas. Tinc molts motius per donar-te les gràcies, però els resumiré dient que aquesta tesi mai hauria arribat fins on ha arribat sense la teva immensa contribució.

Tornant al meu grup, vull donar-li les gràcies a la Julia, per haver-me ensenyat tantes coses dins del laboratori, especialment la valoració d'activitat LPL, i per estar sempre disposada a resoldre els dubtes i a donar un cop de mà.

Al David, gràcies per ser el meu mestre i referent en el laboratori, per tot el que m'has ensenyat, per la teva infinita paciència, per les innumerables preguntes que responies i que encara avui respons i per haver revisat la penúltima versió d'aquesta tesi.

A l'Eva, per interessar-te pels resultats, per la teva disposició a ajudar i per treballar per la qualitat al laboratori.

Gràcies als que esteu començant, Míriam, Raquel, Pere, Gerard i Artur, per l'aire fresc que heu portat al laboratori. A tots, espero que aprofiteu i, sobretot, gaudiu molt amb el vostre treball amb l'LPL. A la Míriam, gràcies per donar continuïtat a la recerca desenvolupada en aquesta tesi.

Entre els que ja no hi són vull donar-li les gràcies especialment a la Núria i a l'Olga, per haver iniciat aquest camí plegats i per haver compartit els primers interrogants en el laboratori, al Víctor, per la qualitat i el rigor en el treball i per totes les coses que m'has ensenyat, a la Gemma, per compartir sensacions en els primers anys de doctorat i al Guillem, pel teu interès incansable en els resultats i per l'ajut en el laboratori. A tots vosaltres i a la resta d'antics membres del grup (Ferran, Anna, Jose, Núria Jané, Rafa Llamas, Rafa Castaño, Marta, Cristina,

David Sala, Natàlia, Vanessa i Alba) gràcies pel temps compartit, per ajudar-me sempre que ho he necessitat i pels bons moments viscuts dins i fora del laboratori.

Del grup veí d'EGF vull donar les gràcies especialment a l'Ignasi per aportar la llum necessària, en forma de consells sobre la cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose*, per continuar endavant en el moment més fosc d'aquesta tesi. A la Maria i a la gent del laboratori (Genís, Jordi, Olga, Meri, Albert, Míriam, Elena, Salva, Rosa, Irma, Miguel i Ramon) per ser un complement excel·lent al nostre grup i per compartir àpats, dubtes, reactius i converses.

Tornant al laboratori de proteòmica CSIC/UAB, vull donar les gràcies a la Marina, a la Vanessa i al Miguel, per la bona feina que heu fet i feu, i per ser una part indispensable en aquest treball. A la Cristina, a la Maite i a la Rebeca, pels consells i l'ajut amb l'electroforesi en dues dimensions. Al David, per resoldre dubtes de bioinformàtica i per la teva col·laboració en les cerques. A tots vosaltres i a la resta del grup (Ignasi, Rafa, Mario, Anna, Marina Gorga i Pau) per tots els moments compartits i per haver-me fet sentir com a casa la infinitat de dies que he viscut entre vosaltres.

Al Joan López Hellín, de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron, per cedir-nos l'ús del seu equip d'isoelectroenfocament i per guiar-me en els meus inicis amb l'electroforesi en dues dimensions.

Al Dr. T. Olivecrona, de la Universitat d'Umeå, i al Dr. J. D. Brunzell, de la Universitat de Washington, per cedir-nos alguns dels anticossos emprats en aquest estudi.

Deixant de banda l'entorn estrictament científic, també vull agrair a les secretàries del departament, especialment a la Georgina i a la Pili, per fer-nos la vida més fàcil encarregant-vos de les gestions administratives. També a la Teresa, per l'assessorament formal en la preparació d'aquesta tesi. A l'equip de tècnics del departament, Raquel, Toni i Roser, per vetllar pel bon funcionament dels equips comunitaris i per preocupar-vos perquè mai ens falti res al laboratori.

Igualment, vull donar les gràcies a la Carmen Benito, responsable del Servei de Radioisòtops de la facultat, i al Jordi Guinea, responsable de la Unitat d'Experimentació Animal de la facultat (i a la resta de personal de la Unitat), per la vostra feina i per la bona predisposició per resoldre qualsevol eventualitat.

Als amics de la facultat (Olga, Enric, Neus, Noelia, Antònia, Fina, Mario, Xavi, Maria, Gemma, Estíbaliz, Àfrica i Laia), vull donar-vos les gràcies per tants moments inoblidables dins i fora de les aules i per poder compartir amb vosaltres les experiències d'iniciar una carrera investigadora.

Fora de la facultat, vull donar les gràcies als amics de tota la vida (Marc, Alberto, Mata, Ricky, Sergi i Laura) i a les parelles (Laia, Masé, Anabel, Janieke, Isabel i Manolo) que amb el temps també ho sereu, per haver crescut plegats, per compartir tota una vida i, tornant a la tesi, per interessar-vos de tant en tant per la meva feina.

Als pares de la Núria, la Maria i el Joan, i també a la Meri i a l'Àlex, pel suport rebut i l'interès i, especialment al Joan, per l'ajut i l'assessorament en l'edició i impressió de la tesi.

Als meus pares, us vull donar les gràcies per tot el que m'heu donat i per tot allò que heu cregut millor no donar-me, pel vostre amor, pels vostres valors, per la vostra manera d'entendre el món i pel vostre suport incondicional.

A la Núria, la meva companya de viatge, vam iniciar aquest camí plegats i si avui he arribat fins aquí és gràcies a tu. Gràcies per poder compartir amb tu els moments difícils de la recerca i per brindar plegats pels bons. Gràcies per la teva energia, per les tantíssimes experiències viscudes aquí i arreu i per totes les que viurem junts.

Finalment et vull agrair a tu, lector, per tenir aquesta tesi a les mans. Per interessar-te en el meu treball. Espero que llegeixis més enllà d'aquestes línies i que aquesta tesi et serveixi per plantejar algun experiment, per aplicar algun mètode, per ajudar-te a trobar algunes respostes i, sobretot, per obrir-te nous camins.

Moltes gràcies a tots!

ÍNDEX

Abreviatures	XVII
---------------------	-------------

Índex de figures	XIX
-------------------------	------------

Índex de taules	XX
------------------------	-----------

1. Introducció	1
-----------------------	----------

1.1 Lipoproteïna lipasa	3
1.1.1 Descobriment	3
1.1.2 Localització i funció	3
1.1.3 Síntesi, processament intracel·lular, secreció i degradació	6
1.1.4 Característiques moleculars	10
1.1.5 Regulació	14
1.1.6 Patologies relacionades amb la lipoproteïna lipasa	17
1.2 Models experimentals per a l'estudi de la lipoproteïna lipasa	19
1.2.1 Estrès	19
1.2.1.1 Estrès i lipoproteïna lipasa	21
1.2.2 Factor de necrosi tumoral alfa	21
1.2.2.1 Factor de necrosi tumoral alfa i lipoproteïna lipasa	23
1.2.3 Lipopolisacàrid	24
1.2.3.1 Lipopolisacàrid i lipoproteïna lipasa	25
1.3 Òxid nítric	26
1.3.1 Òxid nítric sintasa	26
1.3.2 Síntesi de l'òxid nítric	27
1.3.3 Funcions fisiològiques de l'òxid nítric i mecanismes d'acció	28

2. Objectius	31
---------------------	-----------

3. Material i mètodes	35
------------------------------	-----------

3.1 Procediments experimentals <i>in vivo</i>	37
3.1.1 Estrès agut per immobilització	37
3.1.2 Administració de factor de necrosi tumoral alfa	38
3.1.3 Administració de lipopolisacàrid	39
3.1.4 Obtenció de plasma postheparínic	40
3.1.5 Obtenció de cors de rata control	40

3.2	Determinació de metabòlits en plasma	41
3.2.1	Determinació de glucosa	41
3.2.2	Determinació d'àcids grassos no esterificats	42
3.2.3	Determinació de glicerol	43
3.2.4	Determinació de triacilglicerols	44
3.2.5	Determinació de β -hidroxibutirat	45
3.2.6	Determinació de proteïnes	46
3.2.7	Determinació de nitrat	47
3.3	Determinació d'activitat lipoproteïna lipasa	48
3.4	Anàlisi estadística	52
3.5	Purificació parcial de la lipoproteïna lipasa	53
3.5.1	Immunoprecipitació	53
3.5.2	Cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	56
3.6	Electroforesi i detecció de proteïnes	59
3.6.1	Electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS	59
3.6.2	Electroforesi en dues dimensions	60
3.6.3	Tinció amb plata de proteïnes en gels de poliacrilamida	63
3.6.4	Immunodetecció de proteïnes per <i>western blot</i>	64
3.6.4.1	<i>Western blot</i> de lipoproteïna lipasa	65
3.6.4.2	<i>Western blot</i> de nitrotirosina	66
3.6.4.3	<i>Western blot</i> d'òxid nítric sintasa induïble	67
3.7	Aproximacions a l'anàlisi de modificacions posttraduccionals	67
3.7.1	Defosforilació <i>in vitro</i> de proteïnes	67
3.7.2	Deglicosilació <i>in vitro</i> de proteïnes	68
3.7.3	Nitració <i>in vitro</i> de pèptids i proteïnes amb peroxinitrit	69
3.8	Anàlisi i identificació de proteïnes per espectrometria de masses	70
3.8.1	Digestió de proteïnes en gel	71
3.8.2	Identificació de proteïnes per mapatge peptídic	72
3.8.3	Seqüenciació de pèptids per cromatografia líquida capil·lar acoblada a espectrometria de masses en tàndem en trampa iònica	74
3.8.4	Cerca en bases de dades	78
3.8.4.1	Cerca en base de dades per a la identificació de proteïnes per mapatge peptídic	78
3.8.4.2	Cerca en base de dades per a la seqüenciació i identificació de proteïnes	79
3.8.5	Seqüenciació <i>de novo</i>	79

5. Resultats	85
Article 1: <i>Retroperitoneal white adipose tissue lipoprotein lipase activity is rapidly down-regulated in response to acute stress</i>	87
Resum	89
Article	91
Resultats complementaris	97
Article 2: <i>Application of proteomic tools to detect the nonspecificity of a polyclonal antibody against lipoprotein lipase</i>	99
Resum	101
Article	103
Resultats complementaris	109
Article 3: <i>Discovery of lipoprotein lipase pI isoforms and contributions to their characterization</i>	121
Resum	123
Article	125
Resultats complementaris	139
Article 4: <i>Lipoprotein lipase is nitrated in vivo after lipopolysaccharide challenge</i>	145
Resum	147
Article	149
Resultats complementaris	161
6. Resum global	167
7. Conclusions	177
8. Bibliografia	181

ABREVIATURES

2DE: electroforesi en dues dimensions (*2-Dimensional Electrophoresis*)
ACN: acetonitril
Apo: apolipoproteïna
BSA: albúmina sèrica bovina (*Bovine Serum Albumin*)
Da: Dalton
DO: densitat òptica
dpm: desintegracions per minut
DTT: ditiotreitol
EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
eNOS: òxid nítric sintasa endotelial (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*)
ESI: ionització per electroesprai (*Electrospray Ionization*)
HDL: lipoproteïna d'alta densitat (*High Density Lipoprotein*)
HEPES: àcid 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etansulfònic
HL: lipasa hepàtica (*Hepatic Lipase*)
HPLC: cromatografia líquida d'alta resolució (*High Performance Liquid Chromatography*)
HS: heparina-Sepharose
HPSG: proteoglicans de tipus heparan sulfat (*Heparan Sulfate Proteoglycans*)
IEF: isoelectroenfocament (*Isoelectrofocusing*)
IF: increment de fluescencia
IMMO: immobilització
iNOS: òxid nítric sintasa induïble (*Inducible Nitric Oxide Synthase*)
IPG: gradient immobilitzat de pH (*Immobilized pH Gradient*)
IT: Trampa iònica (*Ion Trap*)
LC: cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*)
LDL: lipoproteïna de baixa densitat (*Low Density Lipoprotein*)
LPL: lipoproteïna lipasa
LPS: lipopolisacàrid
MALDI: desorció/ionització per làser assistida per matriu (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)
MS: espectrometria de masses (*Mass Spectrometry*)
MS/MS: espectrometria de masses en tàndem
NEFA: àcid gras no esterificat (*Non-Esterified Fatty Acid*)
nNOS: òxid nítric sintasa neuronal (*Neuronal Nitric Oxide Synthase*)
NO: òxid nítric (*Nitric Oxide*)
NOS: òxid nítric sintasa (*Nitric Oxide Synthase*)
pI: punt isoelèctric
PMF: Mapatge peptídic (*Peptide Mass Fingerprinting*)

RNS: espècies reactives del nitrogen (*Reactive Nitrogen Species*)

SDS: dodecil sulfat sòdic (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-PAGE: electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

TAB: teixit adipós blanc

TAG: triacilglicerol

TCA: àcid tricloroacètic (*Trichloroacetic Acid*)

TFA: àcid trifluoroacètic (*Trifluoroacetic Acid*)

TNF α : factor de necrosi tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

TOF: temps de vol (*Time Of Flight*)

VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat (*Very Low Density Lipoprotein*)

ÍNDIX DE FIGURES

1.	Metabolisme dels quilomicrons i les VLDL	4
2.	Localització de l'LPL	5
3.	Reaccions implicades en la síntesi i el processament dels oligosacàrids de les N-glicoproteïnes en el reticle endoplasmàtic i el complex de Golgi	7
4.	Síntesi, processament i translocació de l'LPL	8
5.	Model molecular del dímer de l'LPL humana	12
6.	Representació esquemàtica de les vies implicades en la resposta neuroendocrina a l'estrès	20
7.	Activació d'NF- κ B per TNF α	22
8.	Activació d'NF- κ B per LPS	25
9.	Síntesi d'NO	28
10.	Nitració de l'aminoàcid tirosina	29
11.	Representació esquemàtica dels grups experimentals en l'experiment d'estrès agut per immobilització	38
12.	Representació esquemàtica dels grups experimentals en l'experiment d'administració <i>in vivo</i> de TNF α	38
13.	Representació esquemàtica dels grups experimentals en el primer experiment d'administració <i>in vivo</i> d'LPS	39
14.	Representació esquemàtica del segon experiment d'administració <i>in vivo</i> d'LPS	40
15.	Sistema emprat per a la cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i> en columna gran	58
16.	Procediment seguit per a l'electroforesi en dues dimensions	62
17.	Representació del procés d'ionització amb una font d'ionització/desorció per làser assistida per matriu	73
18.	Representació del procés d'ionització amb electroesprai	75
19.	Nomenclatura dels ions fragment obtinguts per MS/MS	76
20.	Representació esquemàtica del sistema de cromatografia líquida capil·lar acoblat a l'espectròmetre de masses	77
21.	Sistema de cromatografia líquida i espectròmetre de masses emprats en l'estudi	78
22.	Efecte de l'estrès sobre els nivells de nitrat a plasma	97
23.	<i>Western blot</i> anti-nitrotirosina i anti-LPL amb mostres de plasma de rates sotmeses a estrès agut per IMMO	98
24.	Assaig per a la immunodetecció d'LPL emprant l'anticòs 5D2 o l'anticòs GB1	109
25.	Purificació d'immunoglobulines Y a partir de GB1 (extracte proteic obtingut de rovell d'ou de la gallina immunitzada)	110

26.	Ús de les IgY purificades a partir de GB1 com a anticòs primari per a la immunodetecció per <i>western blot</i> d'LPL en plasma post-heparínic de rata .	111
27.	Immunoprecipitació d'LPL emprant l'eluït de la purificació d'IgY o l'anticòs GB1	112
28.	Comparació de diferents procediments de pretractament de la mostra (plasma postheparínic de rata) per a la immunoprecipitació de l'LPL emprant l'anticòs GB1	112
29.	Immunoprecipitació amb l'anticòs GB1	113
30.	Anàlisi mitjançant electroforesi en dues dimensions de l'eluït de la immunoprecipitació amb l'anticòs GB1	114
31.	Immunoprecipitació amb l'anticòs P66	115
32.	Anàlisi mitjançant electroforesi en dues dimensions de l'eluït de la immunoprecipitació amb l'anticòs P66	116
33.	Cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i> en mini-columna	117
34.	Cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i> en columna gran	118
35.	Efecte de la incubació amb fosfatasa alcalina sobre una barreja estàndard de pèptids fosforilats	139
36.	Detecció de modificacions en lisines (+28 Da) de l'LPL de cor de rata	140
37.	Purificació parcial de l'LPL de plasma postheparínic de rata mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina- <i>Sepharose</i>	142
38.	Efecte de la incubació amb anticossos sobre l'activitat lipasa en fraccions recollides en el procés de purificació de l'LPL	143
39.	Efecte de l'administració de TNF α sobre l'expressió d'iNOS a diferents teixits	161
40.	Detecció de nitrotirosina i d'LPL en fraccions recollides durant la purificació parcial de l'LPL de cor de rates tractades amb LPS	163
41.	Comparació del patró d'isoformes de pI de l'LPL de cor de rates control i de rates tractades amb LPS	163
42.	Anàlisi per espectrometria de masses de pèptids nitrats <i>in vitro</i>	164

ÍNDIX DE TAULES

1.	Efecte de diferents hormones sobre l'activitat LPL en teixits	15
2.	Característiques de les diferents isoformes de la NOS	27
3.	Programes emprats per a l'isoelectroenfocament	62
4.	Proteïnes identificades per mapatge peptídic en el gel de la figura 30A	114
5.	Proteïnes identificades per mapatge peptídic en el gel de la figura 32A	116
6.	Efecte de l'administració de TNF α sobre paràmetres plasmàtics i l'activitat LPL	162

1. INTRODUCCIÓ

1.1. LIPOPROTEÏNA LIPASA

1.1.1 Descobriment

L'enzim lipoproteïna lipasa (LPL) (EC 3.1.1.34) és una glucoproteïna membre de l'anomenada família gènica de les lipases, a la qual pertanyen també la lipasa pancreàtica, la lipasa hepàtica i la lipasa endotelial [1]. El primer indici de l'existència de l'LPL que trobem a la literatura fou aportat per Hahn l'any 1943 quan, en un experiment per estudiar la massa d'eritròcits circulants en gossos, trobà fortuïtament que la lipèmia que presentaven alguns individus desapareixia quan se'ls administrava heparina o plasma postheparínic d'altres gossos [2]. L'interès de la troballa conduí a Hahn a intentar reproduir, sense èxit, aquest fenomen d'aclariment en assajos *in vitro*. Fou Anderson qui finalment va aconseguir, l'any 1950, reproduir *in vitro* el fenomen d'aclariment tractant un plasma lipèmic amb plasma extret d'altres animals immediatament després d'administrar-los heparina [3]. Aquests resultats van portar Anderson a concloure que l'administració d'heparina activava o estimulava la producció d'una substància en plasma amb propietats antiqulomiconèmiques.

Estudis posteriors van suggerir la naturalesa enzimàtica d'aquest factor d'aclariment, que va passar a anomenar-se "factor d'aclariment lipasa" [4]. Korn fou el primer en demostrar que aquesta activitat lipasa, fins aleshores només detectada a plasma postheparínic, també es troba en teixits com el cor [5] o el teixit adipós blanc [6] apuntant la possible participació d'aquest enzim en la distribució dels lípids en l'organisme. A més, Korn també fou el primer en emprar el terme lipoproteïna lipasa per referir-se a aquest enzim [5], en referència a l'especificitat i al tipus de reacció que catalitza. En efecte, Korn va observar una activitat catalítica preferent sobre les lipoproteïnes enfront d'altres substrats com emulsions lipídiques artificials que no contenien lipoproteïnes sèriques [7]. Estudis posteriors van reforçar aquesta idea, en demostrar un efecte activador de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) sobre l'enzim [8] que es concretà amb la identificació de l'apolipoproteïna (apo) C-II com a cofactor activador de l'LPL [9].

1.1.2 Localització i funció

Les lipoproteïnes constitueixen el vehicle de transport dels lípids a la sang i estan formades per un nucli hidròfob, que conté triacilglicerols (TAG) i èsters de colesterol, envoltat per una superfície formada per fosfolípids, colesterol no esterificat i proteïnes especialitzades anomenades apolipoproteïnes. Els quilomicros són les lipoproteïnes més grans i de menor densitat i la seva funció és el transport dels lípids provinents de la dieta. Aquestes lipoproteïnes es sintetitzen a l'intestí després de la ingesta i, a més de TAG, el seu nucli conté, en menor quantitat, èsters de colesterol i altres substàncies liposolubles absorbides amb la dieta, com vitamines i carotenoides [10]. Les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), que també són riques en TAG, són secretades principalment pel fetge i la seva funció és el transport dels TAG de síntesi endògena. La destinació metabòlica

de les lipoproteïnes està determinada en gran mesura pel seu contingut en apolipoproteïnes, que poden actuar com a lligands a receptors de superfície cel·lular o com a cofactors dels enzims del metabolisme de les lipoproteïnes [11].

El transport en forma de lipoproteïnes condiciona l'accessibilitat dels lípids als teixits ja que les lipoproteïnes riques en TAG, quilomicrons i VLDL, són massa grans per creuar l'endoteli capil·lar de la majoria de teixits [11]. En aquest context, l'LPL desenvolupa un paper principal en el metabolisme lipoproteic, essent responsable de la hidròlisi dels TAG presents al nucli dels quilomicrons i de les VLDL circulants (figura 1). L'LPL es localitza de manera funcional a la superfície luminal de l'endoteli capil·lar, ancorada a les cèl·lules endotelials mitjançant proteoglicans de tipus heparan sulfat (HSPG) [14], i això li permet accedir a les lipoproteïnes circulants (figura 2). L'LPL activa es troba en forma homodimèrica i requereix l'apo C-II com a cofactor específic [15]. L'acció de l'LPL sobre els TAG genera diacilglicerols i 2-monoacilglicerols, així com àcids grassos no esterificats (NEFA) que poden ser captats pels teixits subjacents al lloc d'acció de l'enzim [16]. L'LPL només actua sobre els àcids grassos en posició 1 i 3 i, malgrat que no s'ha descrit una preferència marcada de l'LPL per uns tipus d'àcids grassos concrets, sembla que la catàlisi es produeix més lentament quan es tracta d'àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga enfront d'àcids grassos saturats o

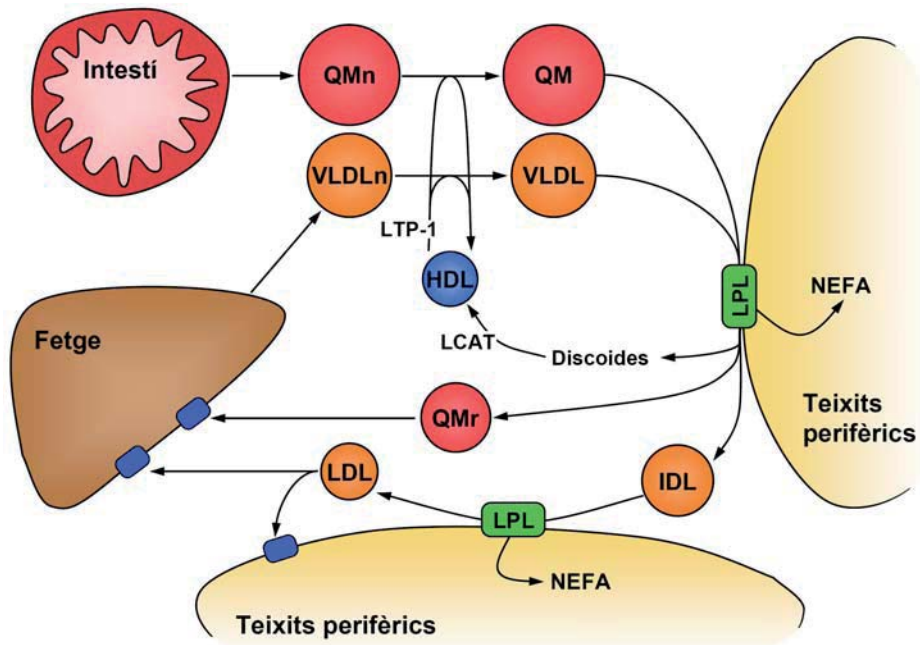


Figura 1. Metabolisme dels quilomicrons (QM) i les VLDL. Els quilomicrons naixents (QMn) i les VLDL naixents (VLDLn) maduren mitjançant l'acció de la proteïna de transferència de lípids 1 (LTP-1). Els TAG dels quilomicrons i les VLDL són hidrolitzats per l'LPL (en teixits extrahepàtics) alliberant NEFA que són captats pel propi teixit. Els discoides generats per aquesta hidròlisi són transformats a HDL mitjançant l'enzim lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT). Els romanents de quilomicró (QMr) i les LDL són captats pel fetge i altres teixits mitjançant receptors específics. (Adaptat de Vilaró i col. [12].)

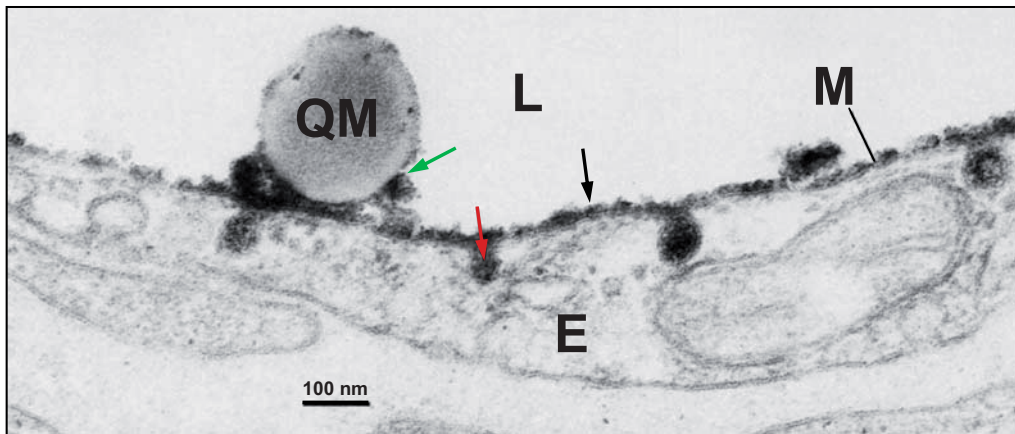


Figura 2. Localització de l'LPL. Imatge obtinguda per microscòpia electrònica, mitjançant un assaig immunocitoquímic, que mostra la localització funcional de l'LPL a l'endoteli capil·lar. L'enzim es detecta a la superfície luminal de l'endoteli (fletxa negra), a invaginacions de la membrana plasmàtica (fletxa vermella) i associat a una partícula lipídica de la mida d'un quilomicro (QM) (fletxa verda). E, Endoteli capil·lar; L, Llum del capil·lar; M, Membrana plasmàtica. (Adaptat de Pedersen i col. [13].)

monoinsaturats [17]. Scow i Egelrud van ser els primers a demostrar que l'LPL, a més de l'activitat triacilglicerol hidrolasa, presenta activitat fosfolipasa [18]. Aquesta activitat, tot i ser quantitativament menys important [19,20], permet hidrolitzar els fosfolípids de la superfície de la lipoproteïna [18] i facilita l'accés de l'enzim al nucli de la partícula. L'activitat fosfolipasa de l'LPL presenta la mateixa especificitat posicional que s'observa en els TAG i només talla l'enllaç èster en posició 1 [17,18]).

Amb la catàlisi enzimàtica de l'LPL les lipoproteïnes hidrolitzades es converteixen en partícules més petites i denses. Així, la hidròlisi dels quilomicros genera romanents de quilomicro, que seran captats pel fetge [21], i la hidròlisi de les VLDL genera partícules amb un menor contingut en TAG, que es van enriquint progressivament en èsters de colesterol. Les partícules derivades de la hidròlisi inicial de les VLDL s'anomenen lipoproteïnes de densitat intermèdia (IDL) i la seva concentració en plasma és relativament baixa ja que aquestes partícules continuen essent hidrolitzades fins que perden totes les apolipoproteïnes excepte l'apo B, donant lloc a les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) (figura 1). Amb la hidròlisi dels components del nucli de les lipoproteïnes disminueix la seva mida i es genera un excés de superfície en la partícula lipoproteica (fosfolípids, colesterol lliure i apolipoproteïnes) que es separa de la lipoproteïna donant lloc a unes partícules precursors de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) anomenades discoides. Aquest procés comporta la pèrdua de l'apo C-II de les lipoproteïnes i fa que aquestes deixin de ser un bon substrat per l'LPL.

D'altra banda, de manera independent a la seva activitat catalítica, l'LPL pot actuar com a pont i estimular la captació cel·lular de lipoproteïnes en unir-se, de manera simultània, a lipoproteïnes i a elements específics de la superfície cel·lular com els HSPG, la proteïna relacionada amb el receptor d'LDL (LRP), el receptor de VLDL, el receptor d'LDL o el receptor 2 de l'apo E [11].

1.1.3 Síntesi, processament intracel·lular, secreció i degradació

Malgrat que el lloc fisiològic d'acció de l'LPL és a la cara luminal de l'endoteli dels capil·lars sanguinis, l'endoteli vascular no sintetitza LPL. Camps i col. [22,23] van observar, mitjançant tècniques d'immunocitoquímica, la presència d'LPL a la superfície endotelial dels vasos sanguinis de diferents teixits, però no van poder detectar mRNA d'LPL a les cèl·lules endotelials mitjançant tècniques d'hibridació *in situ*. Per contra, sí que es va trobar mRNA d'LPL a les cèl·lules parenquimàtiques dels teixits estudiats indicant que la proteïna LPL de l'endoteli es sintetitza a les cèl·lules parenquimàtiques i es transloca posteriorment al seu lloc d'acció. En una aproximació a la localització subcel·lular de l'LPL mitjançant experiments d'immunolocalització, Blanchette-Mackie i col. [24] van detectar l'enzim al reticle endoplasmàtic, a les cisternes del Golgi i a vesícules de secreció de cardiomiòcits.

La síntesi de l'LPL s'inicia amb la transcripció del gen de l'LPL al nucli de les cèl·lules parenquimàtiques, l'exportació de l'mRNA i la traducció d'aquest mRNA al reticle endoplasmàtic rugós. De manera simultània a la traducció s'inicia l'N-glicosilació de la proteïna naixent. Aquest procés suposa la transferència en bloc d'un oligosacàrid (Glc₃-Man₉[GlcNAc]₂) a un residu d'asparagina que forma part de la seqüència consens Asn-X-Ser/Thr [25]. Aquest oligosacàrid es veu modificat en successives etapes a mesura que la proteïna és transportada per diferents compartiments intracel·lulars (figura 3). La maduració d'aquests carbohidrats s'inicia al reticle endoplasmàtic rugós amb la hidròlisi de les tres glucoses terminals per acció de les glucosidases I i II, seguida de l'eliminació d'una mannososa per l' α -mannosidasa, obtenint-se una estructura rica en mannososa que serà transferida al complex de Golgi. Per descriure la modificació dels oligosacàrids a mesura que la proteïna progressa per les cisternes del complex de Golgi, diferenciarem tres regions: el *cis*-Golgi, el Golgi mig i el *trans*-Golgi. Al *cis*-Golgi, l'acció de la mannosidasa I allibera 3 mannososes. Al Golgi mig s'afegeix una N-acetilglucosamina i s'alliberen dos residus addicionals de mannososa per acció de la mannosidasa II. L'estructura resultant és posteriorment modificada en el *trans*-Golgi, amb l'addició d'N-acetilglucosamina, galactosa i residus d'àcid siàlic generant una varietat de cadenes d'oligosacàrid complexes [25]. En espècies com la rata o el ratolí s'ha descrit que l'LPL madura presenta dues cadenes d'oligosacàrids complexes, mentre que en altres espècies com el pollastre o el conill porquí s'han descrit tres N-glicosilacions, dues cadenes d'oligosacàrids complexes i una rica en mannososa [25].

La glicosilació s'ha descrit com un procés essencial per a l'activitat de l'enzim, ja que el tractament de cèl·lules amb tunicamicina, un inhibidor de l'N-glicosilació, fa que es sintetitzi LPL inactiva i amb baixa afinitat a heparina [27]. En aquest mateix sentit, estudis de mutagènesi dirigida sobre les Asn 43 i 359, dos llocs potencials d'N-glicosilació de l'LPL humana, demostren que l'LPL mutada en l'Asn 43 és inactiva i s'acumula al reticle endoplasmàtic [28,29], mentre que si la mutagènesi es fa sobre l'Asn 359 l'activitat de l'enzim no es veu afectada de manera significativa [28].

Pel que fa a la identificació del pas clau en l'activació de l'enzim i a la primera localització de l'LPL activa, diverses aproximacions experimentals indiquen

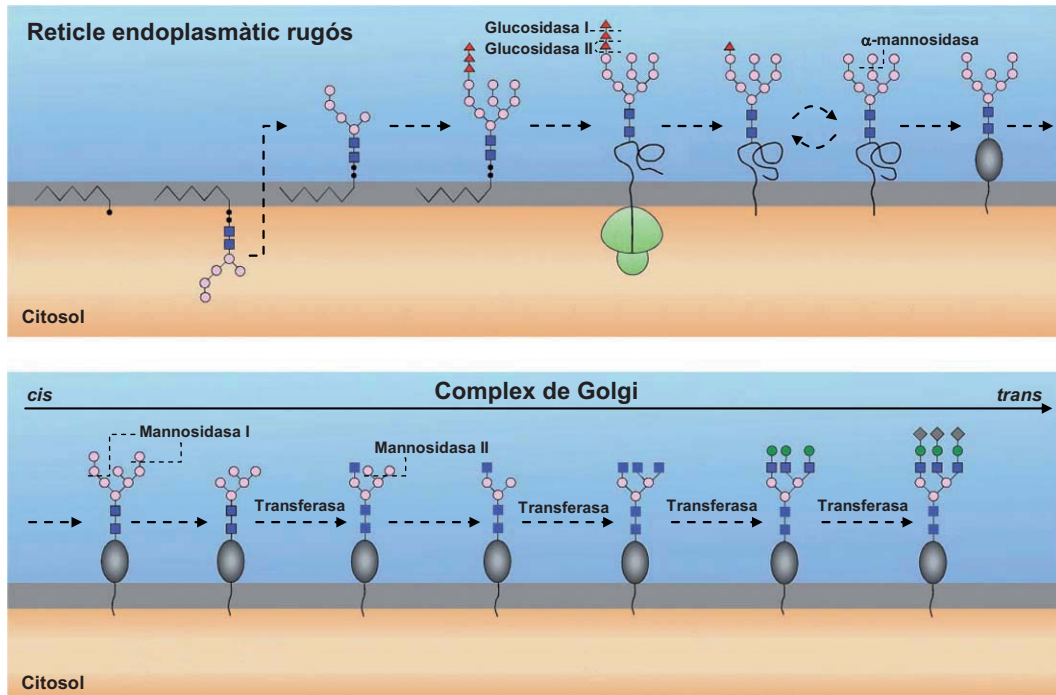


Figura 3. Reaccions implicades en la síntesi i el processament dels oligosacàrids de les N-glicoproteïnes en el reticle endoplasmàtic i el complex de Golgi. La biosíntesi dels oligosacàrids implicats en les N-glicosilacions s'inicia a la cara citosòlica del reticle endoplasmàtic amb l'addició de sucres, d'un en un, a un dolícol fosfat. Quan s'han afegit dues N-acetilglucosamines i cinc mannosos, l'oligosacàrid és transferit a la cara luminal de la membrana del reticle i s'hi afegeixen set residus més procedents de precursors lipídics. Seguidament es transfereix l'oligosacàrid, en bloc, a un residu d'asparagina de la proteïna naixent, es tallen diverses glucoses i mannosos i la proteïna es transfereix al Golgi on continua el processament dels sucres, que conclou amb l'addició de sucres terminals com N-acetilglucosamina, àcid siàlic, o galactosa. El nombre de ramificacions és variable i es poden generar diferents oligosacàrids depenent del nombre i tipus de sucres afegits. (■, N-acetilglucosamina; ▲, glucosa; ●, mannosos; ◆, àcid siàlic; ●, galactosa). (Adaptat de Braun i Severson [25] i d'Helenius i Aebi [26].)

que l'activació ja es produeix al reticle endoplasmàtic. Així, diferents estratègies que bloquegen el trànsit de la proteïna del reticle endoplasmàtic al complex de Golgi (tractament amb brefeldina A, unió del tetrapèptid KDEL a l'extrem C-terminal de l'LPL o incubació de les cèl·lules a 16°C) demostren que l'LPL s'acumula al reticle ja en forma activa [30]. Com que l'LPL funcional és dimèrica, sembla que l'LPL dimeritza i assoleix la seva conformació funcional al reticle endoplasmàtic [31]. A més, mitjançant estudis d'inhibició dels enzims mannosidasa I i II del complex de Golgi [32,33] i de la glucosidasa I del reticle endoplasmàtic [34,35] es va concloure que les modificacions dutes a terme per la glucosidasa I són essencials per a l'activació i secreció de l'enzim [35], mentre que l'acció de les mannosidas del Golgi no ho és [33]. D'altra banda, al reticle endoplasmàtic també es troben agregats d'LPL inactiva i mal plegada que es degraden en aquest mateix orgànu [31].

Després del processament al complex de Golgi l'enzim s'incorpora a vesícules de secreció i pot ser: (i) enviat als lisosomes per a la degradació de l'enzim

o (ii) transportat a la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques, on s'uneix a HSPG [11] (figura 4). D'aquesta manera, la seva taxa de secreció dependrà de la proporció d'LPL que s'allibera i la que es degrada. La funció de la degradació intracel·lular de l'LPL de nova síntesi encara està poc definida, si bé sembla que podria explicar les diferències que existeixen entre teixits en les velocitats de

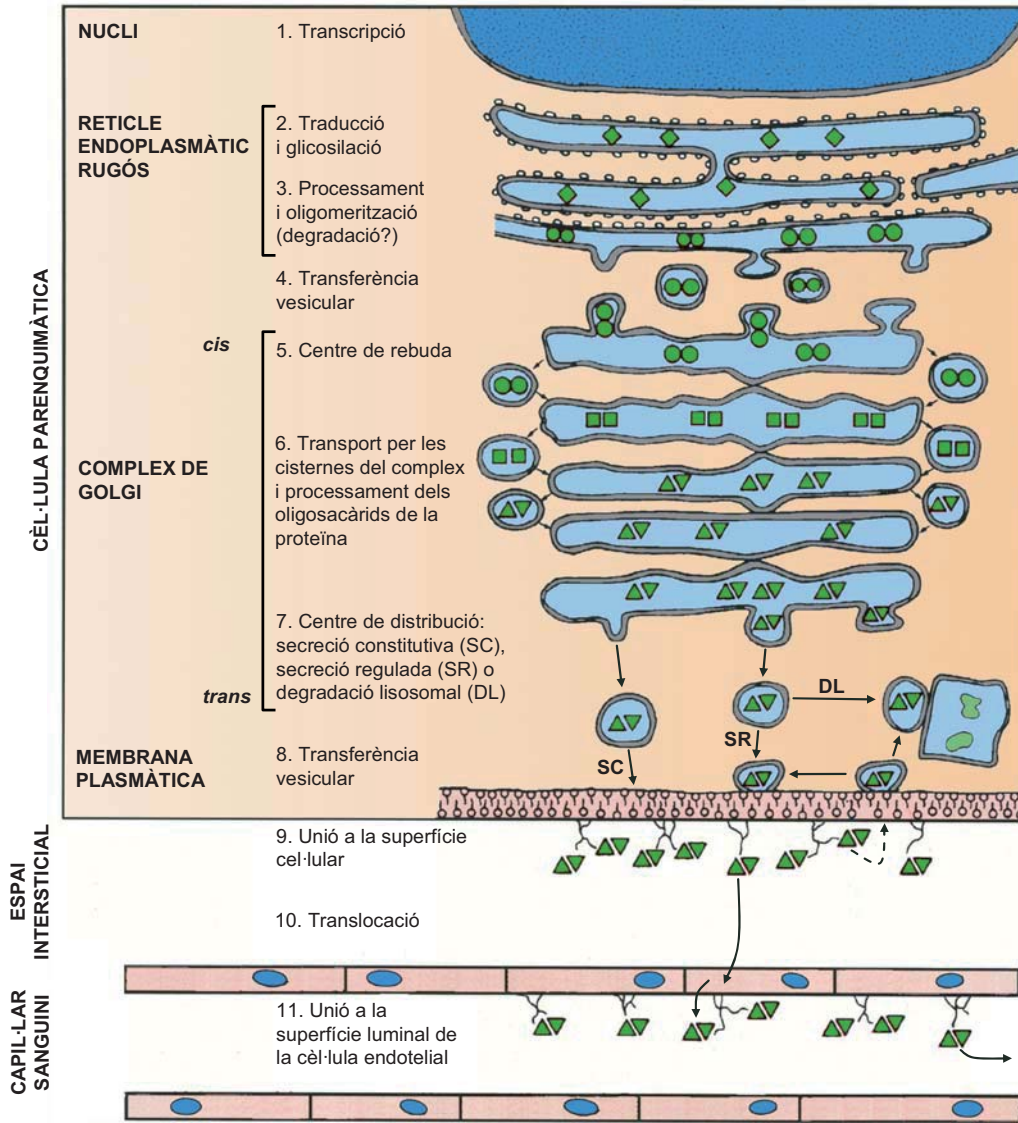


Figura 4. Síntesi, processament i translocació de l'LPL. Després de la transcripció del gen de l'LPL al nucli de la cèl·lula parenquimàtica, l'LPL es sintetitza i es glicosila al reticle endoplasmàtic (◆). L'eliminació de les glucoses terminals dels oligosacàrids fa que l'enzim adquireixi activitat catalítica després de la formació del dímer (●●). Una part de l'LPL de nova síntesi es pot degradar en aquest punt. L'LPL activa és transferida al complex de Golgi i processada (■) fins a la formació de cadenes d'oligosacàrids complexes (▲). La forma madura de l'enzim (▲) és incorporada en vesícules de secreció i enviada a degradació lisosomal o a la superfície de la cèl·lula parenquimàtica –mitjançant la via de secreció constitutiva o la regulada– on s'uneix a HSPG. Finalment, l'enzim és translocat per mecanismes poc coneguts, a la cara luminal de l'endoteli des d'on podrà hidrolitzar les lipoproteïnes circulants. (Adaptat de Braun i Severson [25]) i de Vilella i Joven [36].)

recanvi de l'LPL [11]. Vannier i col. [37] van determinar en adipòcits en cultiu que, en condicions basals, aquesta degradació afecta un 80% del total d'LPL de nova síntesi.

Pel que fa a la secreció de l'LPL s'han descrit dues vies: la constitutiva i la regulada [25,37] (figura 4). En la via de secreció constitutiva la proteïna és secretada a mesura que es sintetitza, sense acumulació intracel·lular, i la velocitat d'aquesta secreció es pot regular a nivell pretraduccional; mentre que en la via de secreció regulada, l'enzim s'acumula en vesícules de secreció fins que la cèl·lula rep l'estímul necessari per alliberar-lo. És sabut que incrementar la velocitat de síntesi d'una proteïna és un procés lent. Però mantenir una elevada velocitat de síntesi, compensada parcialment per una elevada velocitat de degradació, permet incrementar ràpidament la velocitat de secreció, simplement inhibint la degradació. Les LPL de secreció constitutiva i regulada són processades seguint una via de secreció comuna que divergeix a nivell del *trans*-Golgi [25]. S'ha proposat que, en determinades situacions, l'LPL que va a degradació lisosomal podria canviar la seva destinació i passar a la via de secreció regulada. En aquest sentit, l'alliberament de l'LPL al medi que provoca l'heparina sembla que podria reduir la degradació intracel·lular de l'LPL de nova síntesi [37]. S'ha descrit que tots els tipus cel·lulars segueixen la via de secreció constitutiva, mentre que només alguns tipus cel·lulars presenten ambdues vies de secreció [25].

L'LPL unida a HSPG de la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques pot reinternalitzar-se, i ser degradada o tornar a ser secretada [38] (figura 4). Després de la secreció, l'LPL es transloca al seu lloc funcional, a la cara luminal de l'endoteli dels capil·lars. Encara que els mecanismes implicats en aquesta translocació són poc coneguts, estudis en cor han proposat que l'LPL viatja cap a la cèl·lula endotelial per cadenes d'HSPG que comuniquen la superfície cel·lular dels miòcits amb les cèl·lules endotelials [24]. El transport des de la cara basal fins a la cara luminal de les cèl·lules endotelials es dona per transcitosi i en aquest procés participen els HSPG i els receptors de VLDL [39,40].

De manera anàloga a la reinternalització de l'LPL unida a la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques, també s'han descrit processos de reinternalització i reexportació de l'LPL unida a les cèl·lules endotelials [41].

La regulació de l'LPL funcional unida a l'endoteli és necessària per controlar el catabolisme dels TAG i l'aport d'àcids grassos a les cèl·lules del teixit. Així, com que les cèl·lules endotelials no degraden l'LPL, la quantitat d'enzim funcional ve determinada pel balanç entre la quantitat d'enzim que es transloca a l'endoteli des de les cèl·lules en què es sintetitza, i l'alliberament de l'LPL endotelial a la circulació [25]. Després d'una vida mitjana relativament curta (d'uns 30 minuts) [42], l'LPL s'allibera a la sang i és transportada, majoritàriament en forma inactiva i monomèrica, associada a lipoproteïnes circulants –sobretot LDL i HDL– [43], fins al fetge on és captada i degradada [44].

1.1.4 Característiques moleculars

La seqüència aminoacídica completa de l'LPL només s'ha determinat mitjançant l'anàlisi directa de la proteïna en el cas de l'LPL bovina [45]. Tanmateix, s'ha determinat de manera indirecta a partir de la seqüència del seu cDNA en diferents espècies de mamífers (entre les quals s'inclouen l'humà, la vaca, l'ovella, la rata, el ratolí i el conill porquí) [46], en pollastre [47] i, més recentment, en alguns peixos [48,49]. L'anàlisi filogenètica demostra un elevat grau de conservació de la seqüència aminoacídica de l'LPL entre espècies, amb homologies superiors al 90% entre mamífers (a excepció del conill porquí, que presenta una homologia del 80%) i de prop del 70% entre mamífers i pollastre [46]. Considerant l'alt grau d'homologia entre espècies, la descripció de les característiques moleculars de l'enzim es centrarà en l'LPL humana ja que es tracta de l'espècie estudiada amb més detall.

El gen de l'LPL humana s'ha mapat a la regió p22 del cromosoma 8, comprèn unes 30 kb i conté 10 exons i 9 introns [36]. L'exó 10 és notablement més gran que els altres i s'ha observat que, en les espècies estudiades, és fins i tot més gran que tots els altres exons junts [46]. Aquest exó no es tradueix als mamífers mentre que el seu inici sí que es tradueix al pollastre i als peixos [46,48,49]. Un element destacable d'aquesta regió 3' no traduïda de l'mRNA de l'LPL és la presència de dos senyals de poliadenilació (en l'ovella se n'han descrit 3 [50]) que porten a la formació de dos mRNA de mides diferents, d'unes 3,35 i 3,75 kb en el cas dels humans [51]. Malgrat que inicialment es va proposar un ús aleatori d'aquests dos senyals de poliadenilació i, en conseqüència, una proporció semblant de cadascun dels trànscrips, posteriorment es va demostrar una distribució heterogènia entre teixits en les diferents espècies. D'aquesta manera, en algunes espècies, com la rata, tots els teixits estudiats expressen el trànscrit llarg; en altres, com el ratolí, tots els teixits expressen els dos trànscrips; i en altres, com l'humà i la vaca, es troben un o dos trànscrips depenent del teixit. Les diferències funcionals entre aquests dos mRNA encara són poc conegudes si bé s'ha descrit una eficiència de traducció més alta per al trànscrit llarg [52].

L'mRNA de l'LPL humana codifica una proteïna precursora de 475 aminoàcids (474 en el cas de la rata), que en perdre els 27 residus corresponents al pèptid senyal, dona una proteïna madura de 448 aminoàcids amb un pes molecular calculat de 50,4 kDa (447 aminoàcids i 50,3 kDa, per la rata). A aquest pes teòric cal afegir-li un increment de pes per glicosilació, d'aproximadament un 8% [53], resultant un pes molecular estimat proper al descrit experimentalment, d'uns 55-60 kDa [54]. El punt isoelèctric (pI) teòric calculat a partir de la seqüència aminoacídica és de 8,23 per a l'LPL humana (8,22 en la rata). Aquesta dada contrasta amb la diversitat de valors descrits experimentalment. En aquest sentit, trobem que Sato i col. [55] han descrit que l'LPL de teixit adipós de rata i de pollastre té un pI de 4, Augustin i col. [56] han descrit un pI de 4,5 per a l'LPL de plasma postheparínic humà, Soteriou i Cryer [57] van purificar LPL de diferents teixits de rata i van determinar uns valors de pI propers a 7,5, mentre que Bengtsson i Olivecrona [58] van descriure un pI de 9 per a l'LPL bovina en condicions desnaturalitzants.

Malgrat que no s'ha aconseguit cristal·litzar l'LPL, s'ha proposat un model molecular d'estructura tridimensional per a l'LPL humana [59] basat en l'estructura de la lipasa pancreàtica, que sí ha estat determinada per cristal·lografia de raigs X [60]. La lipasa pancreàtica pertany a la mateixa família gènica que l'LPL [1] i presenta una identitat de seqüència amb l'LPL propera al 30%, que suggereix una estructura terciària semblant entre ambdues proteïnes [59]. Aquest model ha representat una eina útil per mapar les mutacions descrites en humans i per especular sobre la importància estructural i funcional dels dominis mutats. Més recentment, Kobayashi i col. [61] han proposat un model d'estructura per al dímer d'LPL i han demostrat que les subunitats estan orientades de manera inversa constituint un homodímer cap-cua (figura 5).

A partir d'aquest model, i de manera anàloga a la lipasa pancreàtica, s'han definit dos dominis estructurals per a l'LPL: el domini amino-terminal, que comprèn els residus 1-312 i conté elements essencials per a l'activitat catalítica com la tríada catalítica i residus implicats en la unió a apo C-II, i el domini carboxi-terminal, que comprèn els aminoàcids 313-448 i conté residus que participen en la unió a lípids i en la unió a heparina [1].

Altres aproximacions experimentals com la construcció de proteïnes quimera amb dominis estructurals de diferents membres de la família gènica de les lipases, estudis de mutagènesi dirigida, l'anàlisi de variants truncades o l'estudi de mutacions en pacients que presenten alteracions en la funció de l'LPL han contribuït a l'obtenció d'informació d'estructura-funció de la proteïna [1,12,16]. A partir d'aquesta informació i del model molecular d'estructura proposat per a l'LPL humana s'han descrit diversos dominis funcionals de l'enzim:

- **Domini d'unió a heparina:** Mitjançant aquest domini l'LPL s'uneix, per interaccions electrostàtiques, als HSPG de les cèl·lules endotelials. A nivell experimental, habitualment s'ha avaluat la unió a heparina com a anàloga de la unió als HSPG [1]. Els HSPG són glicoproteïnes formades per llargues cadenes de glicosaminoglicans unides a un nucli proteic. La presència de sulfats en els glicosaminoglicans confereix una càrrega negativa a aquestes molècules i permet la interacció amb molècules carregades positivament [25]. Així, s'ha descrit que els residus de l'LPL implicats en aquesta interacció són grups d'aminoàcids bàsics. En efecte, diversos estudis suggereixen la implicació dels 50 residus de l'extrem C-terminal en la unió a heparina (entre els quals destaquen l'arginina 405 i les lisines 403, 407, 413 i 414) [11]. No obstant, estudis de mutagènesi dirigida evidencien que les regions 279-282 i 292-304 [11] també contenen aminoàcids bàsics imprescindibles per a la unió a heparina, demostrant d'aquesta manera que ambdós dominis estructurals contribueixen a aquesta funció. Alguns autors apunten que la importància del domini carboxi-terminal en la unió es veu reforçada pel fet que l'LPL de pollastre i de peixos, que presenta alguns aminoàcids més a l'extrem C-terminal que en els mamífers, té una afinitat més gran per l'heparina [48]. Tot i així, encara que s'han descrit dominis concrets implicats en la unió a heparina, l'afinitat de l'LPL per l'heparina ve determinada per l'estructura conformacional de l'enzim que deixa més o menys accessibles determinats residus [12]. En aquest sentit, també s'ha descrit que el dímer d'LPL té 6.000 vegades més

afinitat per l'heparina que el monòmer i que aquesta interacció es dona mitjançant diversos dominis d'ambdues subunitats que actuarien de manera cooperativa [62].

- **Centre actiu:** En l'activitat lipolítica de l'LPL participen tres residus que conformen l'anomenada tríada catalítica: serina 132, aspartat 156 i histidina 241 [63]. Aquests residus es troben en una de les regions més conservades entre membres de la família de les lipases [59]. Estudis de mutagènesi dirigida han demostrat que l'alteració de qualsevol dels tres residus porta a l'obtenció d'un enzim catalíticament inactiu [63].
- **Domini "tapa":** Com la lipasa pancreàtica, l'LPL conté una nansa que tapa la regió catalítica i modula l'accessibilitat del substrat al centre actiu de l'enzim [16] (figura 5). L'anàlisi de l'estructura secundària de la nansa ha determinat l'existència d'un motiu hèlix-gir-hèlix amb dues hèlix amfipàtiques curtes que contenen dominis hidròfobs [16]. Aquesta regió comprèn 22 aminoàcids i està delimitada per l'enllaç disulfur que formen les cisteïnes 216 i 239 [12]. En base al model d'estructura tridimensional proposat per a

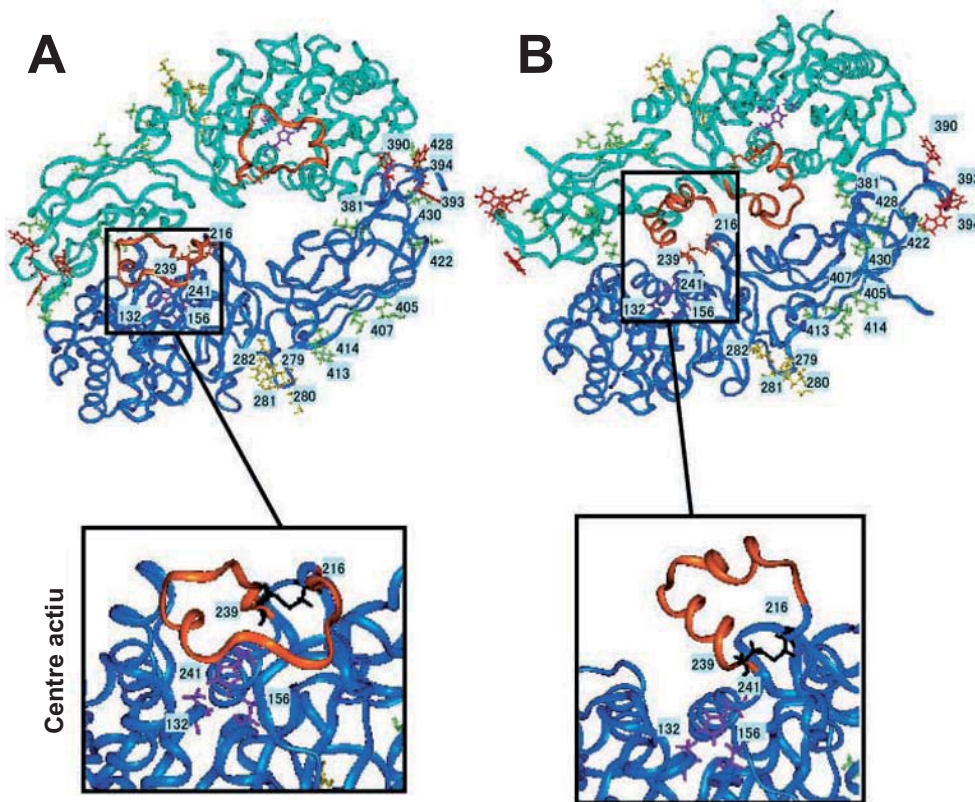


Figura 5. Model molecular del dímer de l'LPL humana. Cada subunitat es representa amb un color diferent (blau i verd). Es mostra la conformació de l'enzim amb el domini "tapa" tancat (A) i obert (B). En groc i en verd s'indiquen diversos residus implicats en la unió a heparina i en vermell alguns residus hidròfobs del domini d'unió a lípids. En l'ampliació es destaquen els residus 132, 156 i 241 que constitueixen la tríada catalítica i les cisteïnes 216 i 239 que formen un pont disulfur que delimita el domini "tapa" (en vermell). (Adaptat de Kobayashi i col. [61].)

l'LPL i al mecanisme d'acció demostrat per a la lipasa pancreàtica per cristal·lografia de raigs X [64], s'ha proposat un model de mecanisme d'acció per a l'LPL. Segons aquest model, en estat inactiu, l'LPL tindria la cara hidròfoba del domini "tapa" no exposada a l'exterior i la interacció inicial amb els seus substrats lipoproteics provocaria un canvi conformacional que comportaria l'obertura de la "tapa" i l'exposició dels residus hidròfobs d'aquesta regió, en un procés que es coneix com a activació interfacial [16]. A més de la importància de la "tapa" en el control de l'activitat catalítica, altres estudis apunten que aquest domini contribueix a determinar l'especificitat de substrat [65].

- **Domini d'unió a lípids:** El domini carboxi-terminal de l'LPL juga un paper essencial en la unió als seus substrats lipídics [1]. Concretament, els triptòfans 390, 393 i 394 podrien participar en la unió a lipoproteïnes, ja que la mutació d'aquests residus hidròfobs anul·la la capacitat del domini carboxi-terminal d'unir VLDL [61]. S'ha proposat que, en el procés catalític, els substrats lipoproteics s'uneixen al domini carboxi-terminal d'una subunitat del dímer i són presentats al centre catalític de l'altra subunitat [1]. En aquest sentit, Kobayashi i col. [61] han determinat que la distància entre el centre actiu i el lloc de reconeixement del substrat en una mateixa subunitat és de 59.2 Å, mentre que la distància entre el centre actiu d'una subunitat i el lloc de reconeixement de substrat de l'altra subunitat és de 29.3 Å.
- **Domini d'unió a apo C-II:** La unió de l'LPL al cofactor apo C-II és essencial per a l'activació òptima de l'enzim [15]. S'ha suggerit una interacció iònica entre l'enzim i el cofactor ja que un excés de sals redueix la unió [66]. Malgrat que no s'ha establert de manera definitiva el domini d'interacció amb l'apo CII, alguns estudis descriuen la participació de les lisines 147 i 148 (del domini amino-terminal) en la unió amb el cofactor [16]. També s'ha observat la unió de l'apo C-II a regions del domini carboxi-terminal i, en el dímer d'LPL, s'ha proposat una interacció complementària amb regions del domini amino-terminal d'una subunitat i del carboxi-terminal de l'altra [61].
- **Domini d'interacció entre monòmers:** La forma activa de l'enzim és un homodímer cap-cua no covalent i la dissociació d'aquest dímer comporta la inactivació de l'enzim [11]. Tot i que encara no es coneixen els dominis implicats en la interacció entre monòmers s'ha descrit que els aminoàcids Ala176, Gly188, Gly195 i els residus 414-438, són essencials per a la dimerització i per a l'estabilitat del dímer [11,12].
- **Domini d'unió a LRP:** mitjançant aquest domini d'unió a la proteïna relacionada amb el receptor d'LDL (LRP), l'LPL pot facilitar la unió i la captació de les lipoproteïnes a les quals estigui associada. S'ha demostrat que el domini carboxi-terminal de l'LPL (residus 313-448) pot unir-se de manera simultània a l'LRP i a VLDL suggerint que aquest domini és responsable de la unió de lipoproteïnes a LRP mitjançada per l'LPL [67]. Com s'ha comentat anteriorment, sembla que els triptòfans 390, 393 i 394 poden participar en la unió a lipoproteïnes [61] mentre que el domini que comprèn els residus 378-423 estaria implicat en la unió a LRP [67].

Altres residus importants des del punt de vista estructural són les 10 cisteïnes implicades en la formació de 5 enllaços disulfur (Cys27-Cys40, Cys216-Cys239, Cys264-Cys283, Cys275-Cys278, Cys418-Cys438) [11] i les asparagines que representen els llocs potencials d'N-glicosilació. A l'LPL humana trobem tres llocs potencials de glicosilació (4 en el cas de la rata) a les Asn 43, 257 i 359 (que formen part de la seqüència consens Asn-X-Ser/Thr). No obstant, la seqüència que flanqueja l'Asn 257 és Asn-Pro-Ser, que rarament es glicosila en eucariotes [11].

1.1.5 Regulació

L'LPL es sintetitza a nombrosos teixits i es presenta amb activitats elevades en els teixits adiposos (blanc i marró), el cor, el múscul esquelètic i la glàndula mamària durant l'alletament [11]. Tot i que amb nivells inferiors, també s'ha observat activitat LPL en el pulmó, la glàndula adrenal, el ronyó, el cervell, la melsa, l'aorta toràctica, l'ovari, els testicles, la placenta, l'intestí prim, les cèl·lules β del pàncrees i els macròfags [11,25,68]. L'LPL també s'expressa en fetge de nouat però no en l'adult [69], excepte en processos de regeneració hepàtica [70]. Així, l'LPL es considera un enzim extrahepàtic [11] malgrat que es detecten nivells baixos d'activitat LPL en aquest teixit comunament atribuïts a la petita quantitat d'LPL activa que viatja per sang i és captada de la circulació en el procés habitual de degradació de l'enzim [44]. Aquesta àmplia distribució atorga a l'LPL un paper central en el metabolisme lipídic i en el repartiment dels TAG circulants. Depenent de la naturalesa de cada teixit els NEFA generats per l'acció lipolítica de l'LPL poden ser, principalment, utilitzats com a substrat energètic –en el múscul esquelètic o el cor–, emmagatzemats com a reserva –en el teixit adipós blanc–, consumits en la termogènesi –en el teixit adipós marró– o bé reesterificats i reexportats –en la glàndula mamària alletant– [71,72]. Un aspecte essencial des del punt de vista fisiològic és que l'LPL està sotmesa a una regulació específica de teixit, la qual cosa permet dirigir la distribució dels substrats lipídics entre els diferents teixits i adaptar-la al context metabòlic de l'organisme [68].

En aquest sentit, s'ha descrit que després d'una ingesta el teixit adipós blanc presenta nivells elevats d'activitat LPL que afavoreixen la captació de NEFA i l'acúmulo de TAG en aquest teixit [73] mentre que, en el dejuni, l'activitat LPL disminueix en el teixit adipós blanc però augmenta en el cor [74] i el múscul esquelètic [75] redirigint d'aquesta manera el flux de TAG per satisfer les demandes metabòliques d'aquests teixits. En altres situacions fisiològiques, l'exercici físic provoca un augment de l'expressió de l'LPL en múscul esquelètic sense alterar els nivells de l'enzim en el teixit adipós blanc [76]; l'estrès crònic induïx un augment d'activitat i d'mRNA d'LPL a cor i múscul i una baixada de l'activitat al teixit adipós blanc [77]; mentre que l'exposició al fred estimula selectivament l'LPL del teixit adipós marró [78]. Durant l'alletament també s'observa un augment molt pronunciat de l'activitat LPL a la glàndula mamària, i una disminució en el teixit adipós blanc, que dirigeix així la utilització dels TAG circulants cap a la síntesi de llet [79]. Més enllà d'aquestes variacions fisiològiques, cal destacar la implicació patològica que pot tenir una alteració d'aquesta regulació específica de teixit de

l'LPL. Així, un desequilibri en aquesta funció podria ser l'origen d'una acumulació excessiva de lípids en el teixit adipós o en els macròfags i participar, d'aquesta manera, en processos patològics com l'obesitat o l'aterosclerosi [68].

La literatura descriu que l'expressió i l'activitat LPL són sensibles a un ampli ventall d'hormones –entre les quals hi ha la insulina, el glucagó, els glucocorticoides i les catecolamines– i nombrosos antecedents demostren la seva implicació en la regulació diferencial de l'enzim (taula 1) en algunes de les situacions fisiològiques que acabem de descriure. Paral·lelament, també s'ha descrit la implicació que poden tenir altres factors –com citoquines, diversos factors de creixement, lipopolisacàrid, NEFA o LDL oxidades– en la regulació de l'activitat LPL [11].

Hormona	Teixit	Efecte sobre l'activitat LPL
Catecolamines	Teixit adipós blanc	Disminució
	Teixit adipós marró	Augment
	Cor	Augment
	Múscul	Augment
Insulina	Teixit adipós blanc	Augment
	Teixit adipós marró	Augment
	Múscul	Disminució
Glucagó	Teixit adipós blanc	Augment
	Cor	Augment
Glucocorticoides	Teixit adipós blanc	Augment
	Cor	Augment
Prolactina	Teixit adipós blanc	Disminució
	Glàndula mamària	Augment

Taula 1. Efecte de diferents hormones sobre l'activitat LPL en teixits. (La informació que presenta aquesta taula s'ha extret de les referències: 11,80-85.)

Els mecanismes que regulen els nivells d'activitat LPL actuen a diferents nivells del complex procés de síntesi, secreció i degradació de l'enzim:

- **Regulació de la transcripció:** L'activitat del promotor de l'LPL s'ha estudiat a bastament mitjançant assajos de transfecció *in vitro* unint el promotor de l'LPL a diferents gens reporters. La regió reguladora de la transcripció s'extén 4 kb en sentit 5' del lloc d'inici de la transcripció i s'han identificat diferents elements reguladors, positius i negatius, que actuen en *cis* [68]. Entre els elements bàsics del promotor s'ha descrit una caixa TATA (-27 a -22), un octàmer (ATTTGCAT) –que interactua amb el domini POU de les proteïnes Oct 1 i Oct 2– i una caixa CCAAT que uneix el factor nuclear Y [68]. S'ha demostrat que els llocs d'unió d'Oct 1 i del factor nuclear Y són essencials per a l'activitat basal del promotor. De la mateixa manera, altres regions conservades, com l'element CT (-91 a -83) al qual s'uneixen els factors de transcripció Sp 1 i Sp 3, també són importants en aquesta activitat basal [11].

A més d'aquests elements que participen en la maquinària bàsica de transcripció, trobem altres elements de resposta que participen en la regulació de l'expressió de l'LPL en diferents condicions. En primer lloc, trobem l'element de resposta a esterols (-90 a -81) (SRE), que comprèn diversos nucleòtids de l'element CT. En aquest cas, s'ha descrit que els nivells cel·lulars d'esterols podrien regular l'enzim a través de proteïnes d'unió a l'element de resposta a esterol (SREBP) que, en adipòcits 3T3-L1, estimulen la transcripció del gen de l'LPL quan disminueixen els nivells cel·lulars de colesterol [86]. Altres factors de transcripció que regulen l'expressió de l'LPL en diferents teixits són els receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR) que formen heterodimers amb el receptor X de l'àcid retinoic (RXR) i s'uneixen a uns elements de resposta específics (PPRE). Els PPAR indueixen l'expressió d'LPL en teixit adipós, fetge i macròfags, en resposta a determinats àcids grassos, a glucosa, a fibrats o a tiazolidinediones (un agent anti-diabètic), malgrat que això no sempre suposa un augment de l'activitat LPL [11]. També s'ha descrit un element de resposta a LXR (receptor X hepàtic) localitzat a l'intró 1 del gen de l'LPL. A aquest element de resposta s'uneix un heterodímer LXR/RXR que és responsable de la inducció mitjançada per colesterol de l'expressió del gen de l'LPL en fetge i macròfags [68]. S'ha caracteritzat un element de resposta a interferó- γ que comprèn la regió -31 a +187. A aquesta regió s'uneixen normalment els factors de transcripció Sp 1 i Sp 3 però en els macròfags aquesta unió es veu disminuïda en presència d'interferó- γ i es suprimeix l'expressió de l'LPL [87]. Finalment, també s'han descrit elements silenciadors a la regió -225 a -81 del promotor del gen de l'LPL humana. La unió d'un complex proteic, no caracteritzat, a aquesta regió comporta una inhibició de la transcripció [68].

- **Regulació de la traducció:** La síntesi de l'LPL pot estar regulada a nivell traduccional mitjançant proteïnes repressores que interactuen amb seqüències específiques de la regió 3' no traduïda de l'mRNA i inhibeixen la síntesi de l'enzim. Així, s'ha descrit aquest mecanisme d'inhibició de la traducció en adipòcits en resposta a adrenalina [88] i a hormones tiroïdals [89], i en rates diabètiques [90]. Estudis recents han identificat les subunitats catalítica i reguladora de la proteïna quinasa A i la proteïna d'ancoratge de la quinasa A (AKAP) 121/149 com a integrants del complex proteic que s'uneix a l'mRNA de l'LPL per inhibir la seva traducció [91,92]. Ranganathan i col. [91] han proposat que l'expressió específica de teixit de la proteïna AKAP 121/149 podria explicar algunes de les diferències en la regulació específica de teixit de l'LPL.
- **Regulació posttraduccional:** S'han definit diversos punts del procés de maduració i secreció de l'LPL en els quals pot regular-se l'activitat de l'enzim. Doolittle i col. [74] han descrit un mecanisme de regulació posttraduccional de l'LPL del teixit adipós blanc en alimentació i dejuni en què la taxa de síntesi de l'enzim es manté constant i l'enzim és secretat en situació d'alimentació o desviat a la via de degradació lisosomal en situació de dejuni. També s'ha suggerit que els nivells d'LPL fisiològicament activa a la cara luminal de l'endoteli poden modular-se mitjançant una regulació del procés de transitosi

pel qual l'LPL és transportada de la cara basal a la cara luminal de la cèl·lula endotelial [39]. Altres autors han descrit recentment, també en la situació d'alimentació i dejuni, que l'activitat LPL pot regular-se, sense alterar els seus nivells d'mRNA ni de proteïna, per l'acció d'una proteïna repressora que actua a nivell extracel·lular. Així, Sukonina i col. [93] han proposat que, durant el dejuni, disminueix l'activitat LPL en el teixit adipós per la unió transitòria de la proteïna ANGPTL 4 (proteïna 4 semblant a angiopoetina) a l'LPL, que fa que la forma dimèrica activa de l'enzim passi a monòmers inactius. Posteriorment, s'ha proposat que l'LPL del cor, i probablement la del múscul, podrien inhibir-se durant la ingesta per un mecanisme semblant [94]. També s'ha suggerit que els nivells d'LPL activa a l'endoteli podrien regular-se per un mecanisme d'inhibició competitiva per producte, segons el qual, una concentració elevada de NEFA podria competir en la unió de l'LPL als HSPG provocant l'alliberament de l'LPL a la sang [95]. D'altra banda, en els darrers anys també s'ha descrit que el calci pot induir *in vitro* la dimerització i reactivació de monòmers inactius d'LPL i s'ha especulat amb que aquest control de la dimerització podria estar implicat en la regulació posttraduccional normal de l'enzim [96].

D'altra banda, alguns autors han suggerit l'existència de variants de l'LPL específiques de teixit [97], malgrat que no s'ha aprofundit en la seva caracterització ni en la possible implicació en la regulació específica de teixit de l'enzim.

1.1.6 Patologies relacionades amb la lipoproteïna lipasa

La deficiència d'LPL és una patologia hereditària autosòmica recessiva que es caracteritza per uns elevats nivells circulants de lipoproteïnes riques en TAG [98]. L'acumulació excessiva d'aquestes lipoproteïnes –anomenada hiperlipoproteïnèmia de tipus I si només s'acumulen quilomicrons o hiperlipoproteïnèmia de tipus V si també s'acumulen VLDL [72]– confereix al plasma dels pacients un aspecte lletós característic. Altres manifestacions clíniques associades a la síndrome derivada d'aquesta deficiència, coneguda com a **síndrome quilomicronèmica**, són dolor abdominal, pancreatitis, xantomes, hepatomegàlia, esplenomegàlia i lipèmia retinal [11,98].

S'han descrit més de 100 mutacions en el gen de l'LPL que provoquen una disminució de l'expressió de l'enzim o porten a la síntesi d'LPL inactiva [12,98]. La deficiència d'LPL es presenta en individus que són homozigots o heterozigots compostos per aquestes mutacions i té una prevalença d'1:1.000.000 en la població general [72]. No obstant, en determinades àrees geogràfiques –com el Quebec– pot presentar una prevalença d'1:5.000, probablement com a conseqüència de l'efecte fundador [98]. D'altra banda, els individus heterozigots presenten uns nivells d'activitat i de concentració d'LPL disminuïts [99] i un patró lipídic lleument alterat que pot contribuir a l'aparició d'hiperlipèmies en presència de factors secundaris com l'abús d'alcohol o determinats fàrmacs [11,72].

El diagnòstic habitual de la deficiència d'LPL requereix un assaig per a la determinació específica de l'activitat LPL en plasma postheparínic [12]. Després de detectar una activitat LPL nul·la o disminuïda en pacients, cal descartar que es

tracti d'una alteració en la síntesi o la funció de l'apo C-II –el cofactor activador de l'enzim– o d'un inhibidor autosòmic dominant de l'LPL [12] i determinar, mitjançant un estudi genètic, la mutació que presenta el gen de l'LPL.

El tractament de la deficiència familiar d'LPL es basa en un control estricte del contingut de greixos en la dieta per disminuir els nivells de TAG circulants i evitar l'aparició de la síndrome quilomicronèmica. El tractament farmacològic en pacients deficients en LPL s'ha mostrat molt poc efectiu malgrat que alguns fàrmacs, com els fibrats o els derivats de l'àcid nicotínic, poden contribuir a millorar el perfil lipídic reduint la síntesi hepàtica de VLDL [11,72]. En els darrers anys s'han desenvolupat diverses aproximacions per restablir l'expressió d'LPL en individus deficients en aquest enzim mitjançant teràpia gènica. En la teràpia gènica s'ha emprat una variant natural del gen de l'LPL, l'LPL S447X, que ha estat associada amb uns efectes beneficiosos sobre el perfil lipídic –amb nivells de TAG circulants més baixos i nivells elevats d'HDL– i amb una disminució del risc de patologies cardiovasculars [100]. En fase preclínica s'ha aplicat aquesta estratègia amb bons resultats en ratolins [101] i gats [102], i a finals de 2008 es van publicar els resultats del primer assaig en humans, on es demostra una inducció de l'expressió d'LPL i una disminució transitòria dels TAG circulants en resposta a la teràpia gènica [103].

A més de la hiperlipèmia causada per la deficiència d'LPL s'han associat alteracions en el patró d'expressió de l'LPL amb altres patologies:

- **Obesitat:** Malgrat que l'obesitat és una patologia multifactorial associada a diversos factors genètics, metabòlics i ambientals alguns autors han proposat que l'LPL pot jugar un paper clau en l'etiologia de la malaltia [104,105]. En base a que la distribució de lípids en l'organisme està regulada per l'expressió específica de teixit d'aquest enzim, s'ha plantejat que un desequilibri entre els nivells d'LPL del teixit adipós blanc i del múscul en favor del teixit adipós blanc pot contribuir al desenvolupament de l'obesitat en portar a un acúmulo excessiu de lípids en aquest teixit [104,105].
- **Aterosclerosi:** La detecció d'activitat LPL a lesions ateroscleròtiques va portar a pensar que l'enzim podia promoure la deposició de lípids a la paret arterial [68]. Es considera que l'aterosclerosi s'inicia per una lesió a les cèl·lules endotelials de l'artèria que provoca la infiltració de limfòcits T i monòcits a la matriu subendotelial [106]. Els monòcits es transformen posteriorment en macròfags, que importen lipoproteïnes i acaben convertint-se en cèl·lules escumoses [106]. L'LPL participa en aquesta transformació mitjançant la seva activitat catalítica –que facilita la captació dels substrats lipídics pels macròfags– i mitjançant la seva funció no catalítica –que promou l'acumulació de lipoproteïnes a la paret vascular i afavoreix la ràpida captació per part dels macròfags– [107,108]. Així, l'LPL juga un paper important en la patogènesi de l'aterosclerosi com ho demostra l'associació d'uns nivells elevats d'expressió d'LPL en macròfags amb un risc més alt de desenvolupar aterosclerosi [109]. No obstant, l'acció proaterogènica de l'LPL no es limita a la seva capacitat per facilitar la captació de lípids, sinó que inclou altres funcions com l'estimulació de la proliferació de

les cèl·lules musculars llises, l'afavoriment de l'adhesió dels monòcits a les cèl·lules endotelials i la regulació de l'expressió gènica [11].

En contrast, nombrosos autors també descriuen que l'activitat normal de l'LPL en teixits com el múscul esquelètic, el cor o el teixit adipós desenvolupa un paper antiaterogènic ja que contribueix a disminuir els nivells de TAG circulants i a augmentar els d'HDL, afavorint així un perfil lipídic menys aterogènic [107,108]. En favor d'aquest argument trobem que la sobreexpressió ubiqua d'LPL confereix un efecte protector davant l'aterosclerosi [68].

- **Malaltia d'Alzheimer:** l'LPL s'expressa en cervell i, presumiblement, participa en l'aport de components de membrana a les neurones, contribuint a la funció d'aquestes cèl·lules [110]. S'ha proposat que l'LPL pot jugar un paper important en la prevenció de la malaltia d'Alzheimer ajudant a la captació de proteïna amiloide –mitjançant la seva interacció amb l'apo E i l'LRP– i disminuint la formació de plaques amiloides [111]. Diversos estudis han avaluat una possible correlació entre aquesta malaltia i determinades mutacions del gen de l'LPL, però es requereixen més estudis per aclarir aquest aspecte [111-113].

1.2. MODELS EXPERIMENTALS PER A L'ESTUDI DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA

1.2.1 Estrès

L'estrès s'ha definit com un estat que amenaça l'homeòstasi de l'organisme [114]. Els estímuls estressants són aquells agents que posen en perill, de forma simbòlica o real, la integritat de l'organisme i provoquen l'activació d'una sèrie de respostes adaptatives orientades a resoldre i superar la situació estressant. Els estímuls estressants tenen un component físic i un component psicològic i, d'acord amb Herman i Cullinan [115], poden classificar-se en: estímuls sistèmics (quan suposen una amenaça fisiològica immediata), estímuls emocionals o de processament (quan no provoquen un dany real però són interpretats com a potencialment perillosos) o mixtes (quan es tracta d'estímuls físics que poden tenir un component emocional). Dependent de la durada i la freqüència de l'estímul estressant es pot diferenciar entre un estrès agut (que pot ser puntual o amb repeticions al llarg d'un dia) o crònic (que pot presentar-se de manera intermitent o contínua) [114].

El processament de l'estímul estressant comporta l'activació de dues vies principals de la resposta neuroendocrina: l'eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal (HPA) i el sistema eferent simpàtic-medul·loadrenal (SMA) (figura 6). A l'eix HPA, les neurones del nucli paraventricular de l'hipotàlem sintetitzen i secreten hormona alliberadora de corticotropina (CRH) i vasopressina en resposta a l'estímul estressant. Aquests neuropèptids arriben pel sistema vascular portal a la hipòfisi, o glàndula pituitària, on estimulen la síntesi i la secreció d'hormona adrenocorticotropa (ACTH). Aquesta ACTH viatja per sang i actua al còrtex de les glàndules adrenals on estimula la síntesi i l'alliberament de glucocorticoides, com el cortisol en humans i la

corticosterona en rates [116]. Aquests glucocorticoïdes intervenen en la finalització de la resposta de l'eix HPA mitjançant un mecanisme de retroinhibició sobre els components del sistema nerviós central [115]. D'altra banda, els estímuls estressants també activen les neurones catecolaminèrgiques del locus ceruli que porten a l'activació de l'eix SMA. Aquesta activació provoca l'alliberament de noradrenalina des dels terminals sinàptics del sistema nerviós simpàtic i la secreció d'adrenalina i noradrenalina des de la medulla adrenal [117]. Malgrat que tots els estímuls estressants provoquen l'activació del sistema nerviós central, el grau d'activació de les diferents vies de senyalització i, en conseqüència, la resposta final de l'organisme varia depenent de l'estímul que provoca l'estrès [117].

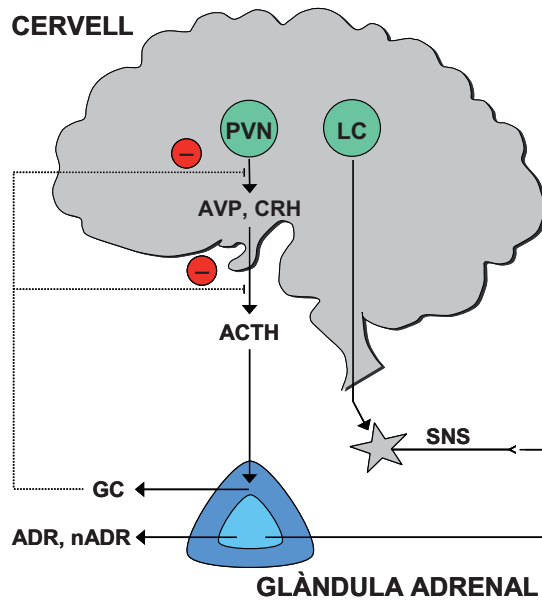


Figura 6. Representació esquemàtica de les vies implicades en la resposta neuroendocrina a l'estrès. ACTH, hormona adrenocorticotropa; ADR, adrenalina; AVP, arginina-vasopressina; CRH, hormona alliberadora de corticotropina; GC, glucocorticoïdes; LC, locus ceruli; nADR, noradrenalina; PVN, nucli paraventricular de l'hipotàlem; SNS, sistema nerviós simpàtic.

La resposta de “lluita o fugida” és una resposta clàssica associada a una exposició aguda a un estímul estressant que permet a l'individu enfrontar-se, disminuir o evitar l'exposició a l'estímul estressant. Aquesta resposta aguda es caracteritza per un augment de la freqüència cardíaca i la pressió sanguínia [118] i un increment de la disponibilitat de substrats energètics [119,120]. A nivell metabòlic, les hormones alliberades en resposta a l'estrès antagonitzen l'acció de la insulina i provoquen un increment de la glucèmia i l'activació de la lipòlisi i la proteòlisi [120,121]. L'augment de glucèmia és degut a la hidròlisi del glicogen hepàtic que, en alguns casos, pot venir acompanyada de l'activació de la gluconeogènesi a partir d'aminoàcids alliberats com a conseqüència de l'activació de la degradació proteica [121,122]. Pel que fa al metabolisme lipídic, les catecolamines estimulen la lipòlisi i l'alliberament a la circulació de NEFA que serveixen com a substrat energètic per teixits com el múscul o el cor. A més, els

NEFA poden redirigir-se al fetge on, a més d'oxidar-se per produir energia, poden ser emprats com a substrat per a la síntesi de cossos cetònics, que serviran com a substrat energètic a teixits com el cervell, el cor o el múscul [120].

S'han definit nombrosos models experimentals en animals per estudiar la resposta a l'estrès. L'estrès per immobilització (IMMO) fou inicialment descrit per Kvetnansky i col. [123] i ha estat emprat anteriorment en diversos estudis en el nostre grup [77,120]. La IMMO es considera un estímul estressant de tipus mixt i, a diferència d'altres models, aquest estrès no suposa cap altra alteració en l'animal que pugui interferir en els paràmetres metabòlics, com succeeix en l'estrès per dejuni, per natació forçada o per lluita. A més, l'estrès per IMMO estimula de manera eficient les diferents vies de senyalització de la resposta neuroendocrina [117].

1.2.1.1. Estrès i lipoproteïna lipasa

Les catecolamines intervenen en la regulació de l'LPL i tenen efectes contraris en els diferents teixits. En aquest sentit, s'ha descrit que l'administració d'adrenalina provoca una disminució de l'activitat d'aquest enzim al teixit adipós [124] i un increment al múscul [84]. En estudis previs desenvolupats en el nostre grup de recerca, Ballart i col. [125] van mostrar que l'administració *in vivo* d'adrenalina o d'isoproterenol (un agonista β -adrenèrgic) provoca en la rata una disminució de l'activitat LPL del teixit adipós blanc i un increment en plasma. Posteriorment, cercant una situació fisiològica en què es produís la secreció endògena d'adrenalina, va plantejar-se un model de resposta a estrès per IMMO, també en rata. En aquest cas, l'estrès crònic per IMMO (2 h diàries durant 10 dies) disminueix l'activitat LPL en el teixit adipós blanc mesentèric i epididimal i l'augmenta en múscul, cor i glàndules adrenals [77]. En contrast, l'estrès agut per IMMO (30 minuts) provoca baixada d'activitat LPL en el teixit adipós blanc retroperitoneal. Mentre que l'activitat LPL en plasma augmenta en l'estrès agut i en el crònic [77], reproduint així un perfil d'activitat similar a l'observat amb l'administració *in vivo* d'adrenalina. Aquest conjunt de canvis s'han relacionat amb l'adaptació metabòlica a l'estrès, que permet redirigir la distribució dels substrats energètics entre teixits.

Pel que fa al nivell de regulació de l'enzim, s'ha descrit que les catecolamines i l'isoproterenol poden inhibir selectivament l'activitat LPL del teixit adipós blanc, reduint la transcripció del gen de l'LPL [126], regulant la traducció [91] i la maduració posttraduccional de l'enzim [127], o induint la seva degradació [128].

1.2.2 Factor de necrosi tumoral alfa

El factor de necrosi tumoral alfa (TNF α) és una citoquina proinflamatòria que juga un paper central en la cascada de senyalització implicada en el control de la resposta immunitària. El TNF α deu el seu nom a l'activitat antitumoral que se li va associar quan fou descobert, en identificar la seva capacitat d'induir la necrosi hemorràgica d'alguns tumors *in vivo* [129].

El $\text{TNF}\alpha$ s'expressa com una proteïna transmembrana de tipus II –amb l'extrem N-terminal intracel·lular– que pot ser processada, mitjançant proteòlisi, cap a una forma soluble. La forma soluble del $\text{TNF}\alpha$ és un homotrimer no covalent constituït per subunitats de 17 kDa. Aquesta proteïna té funcions en la senyalització tant en la seva forma integrada a la membrana com en la seva forma soluble. Existeixen dos receptors de $\text{TNF}\alpha$: el TNFR1 , que es troba a la majoria de cèl·lules de l'organisme, i el TNFR2 , que principalment s'expressa a cèl·lules hematopoètiques [130]. El TNFR1 s'activa mitjançant el $\text{TNF}\alpha$ soluble, mentre que el TNFR2 uneix principalment el $\text{TNF}\alpha$ transmembrana. Els receptors de $\text{TNF}\alpha$ també poden alliberar-se a la circulació i actuar com a proteïnes solubles d'unió al $\text{TNF}\alpha$, neutralitzant d'aquesta manera l'activitat biològica de la citoquina en competir amb els receptors de la superfície cel·lular.

Els dominis intracel·lulars dels receptors de $\text{TNF}\alpha$ no presenten cap activitat enzimàtica intrínseca. Així, la transducció del senyal es duu a terme mitjançant proteïnes citosòliques amb activitat enzimàtica que interaccionen amb els receptors mitjançant proteïnes adaptadores [131]. En aquest sentit, la unió del $\text{TNF}\alpha$ al seu receptor comporta el reclutament de proteïnes adaptadores intracel·lulars que activen diverses vies de transducció de senyal. Depenent del context cel·lular, l'activació de TNFR1 pot portar a dues respostes diferents: induir l'expressió de gens implicats en la resposta inflamatòria i en la supervivència cel·lular o induir l'apoptosi.

El receptor TNFR1 té un domini de mort a la regió intracel·lular que permet la interacció amb altres proteïnes que presentin aquest mateix domini. En estat

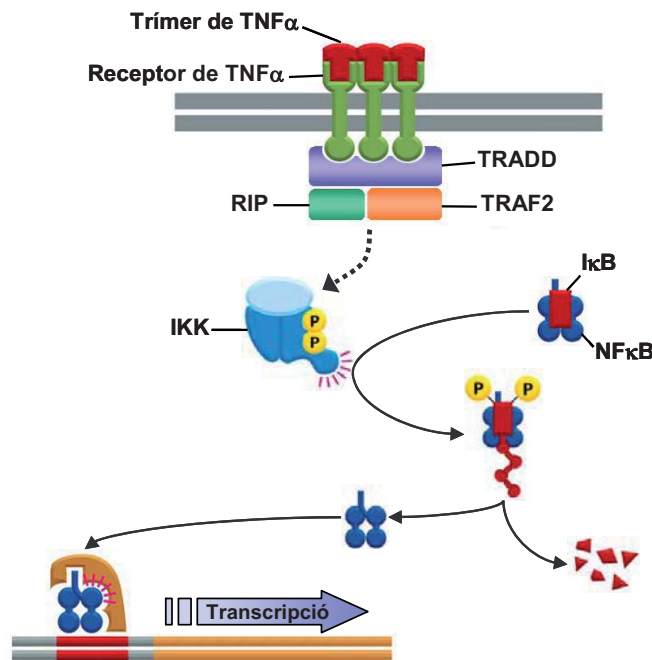


Figura 7. Activació d'NF- κ B per $\text{TNF}\alpha$. La unió del $\text{TNF}\alpha$ al seu receptor recluta diverses proteïnes de senyalització que activen la quinasa d'I κ B (IKK). La IKK fosforila I κ B alliberant el factor de transcripció NF- κ B que es transloca al nucli per estimular la transcripció dels seus gens diana. (Adaptat d'Alberts i col . [132].)

basal, el TNFR1 està associat a través del seu domini de mort a la proteïna silenciadora de dominis de mort (SODD). Quan el TNF α s'uneix al receptor TNFR1 el receptor trimeritza, la proteïna inhibidora SODD es dissocia i permet la unió de la proteïna adaptadora TRADD (proteïna amb domini de mort associada al receptor de TNF α) al mateix domini. El complex TNFR1-TRADD recluta dues proteïnes, TRAF2 (factor 2 associat al receptor de TNF α) i RIP (proteïna d'interacció amb el receptor), que presenten un domini TRAF necessari per les interaccions proteïna-proteïna. Aquest complex porta, en darrer terme, a l'activació de la quinasa d'I κ B (IKK) (figura 7). La fosforilació d'I κ B fa que aquest deixi d'inhibir el factor nuclear κ B (NF- κ B), que es transloca al nucli i activa la transcripció de gens que participen en la resposta immunitària i inflammatòria (entre els quals s'inclouen diferents citoquines i l'òxid nítric sintasa induïble) [133,134].

A diferència de TNFR1, el receptor TNFR2 no conté cap domini de mort però també pot induir una via de transducció que porta a l'activació d'NF- κ B. En aquest cas, el receptor TNFR2 uneix un heterocomplex de proteïnes TRAF: TRAF1 i TRAF2. En aquest complex de senyalització participen altres proteïnes, com c-IAP1 i c-IAP2, presumiblement implicades en la inhibició de l'apoptosi [131].

A nivell metabòlic, l'administració de TNF α indueix una sèrie de canvis caracteritzats per una mobilització general de les reserves energètiques. En aquest sentit, s'ha descrit que, entre altres efectes, el TNF α activa la lipòlisi al teixit adipós blanc [135], la lipogènesi hepàtica [136], la proteòlisi al múscul [137] i la gluconeogènesi [138].

1.2.2.1. Factor de necrosi tumoral alfa i lipoproteïna lipasa

Diversos autors han explorat l'efecte del TNF α sobre l'activitat LPL. En relació amb els canvis metabòlics descrits a l'apartat anterior, Kawakami i col. [139] mostren que el TNF α inhibeix l'activitat LPL i estimula la lipòlisi en cèl·lules 3T3, mentre que altres estudis també descriuen una baixada d'activitat LPL en teixit adipós blanc en resposta a l'administració *in vivo* de TNF α [140,141]. Uchida i col. [142] proposen que l'òxid nítric intervé com a mediador de la baixada d'activitat LPL que provoca el TNF α en adipòcits marrons en cultiu, ja que l'ús d'inhibidors de l'òxid nítric sintasa reverteix els efectes de la citoquina. D'altra banda, Semb i col. [140] descriuen que en rata i ratolí l'administració de TNF α també provoca un augment de l'activitat LPL en plasma i en teixits com el cor, el pulmó o el fetge.

D'altra banda, a més d'aquests treballs que avaluen la resposta a l'administració de TNF α , estudis posteriors indiquen que la producció endògena d'aquesta citoquina pot participar com a mediadora en la regulació de l'activitat LPL en situacions fisiològiques, com ara la baixada d'activitat LPL que s'observa al teixit adipós en la transició d'alimentació a dejuni [143].

En relació als mecanismes de regulació, s'ha proposat que el TNF α pot regular l'activitat LPL del teixit adipós blanc a nivell transcripcional –disminuint la unió de determinats factors de transcripció al promotor del gen de l'LPL– i a nivell posttranscripcional [144]. En aquest sentit, alguns autors plantegen que el TNF α pot regular l'activitat LPL induint l'alliberament de l'LPL des de l'endoteli [145] o

estimulant l'expressió d'alguna proteïna que fa que l'LPL de nova síntesi passi a forma inactiva [143].

1.2.3 Lipopolisacàrid

El lipopolisacàrid (LPS), també conegut com a endotoxina bacteriana, és un component principal de la membrana externa dels bacteris gram negatius emprat habitualment en recerca per mimetitzar els efectes d'una infecció bacteriana. La membrana externa dels bacteris gram negatius està formada per una bicapa lipídica asimètrica, amb una cara interna constituïda per fosfolípids i una cara externa integrada principalment per LPS que té un paper essencial en el manteniment de la integritat estructural de la membrana.

Les molècules d'LPS estan constituïdes per un glucofosfolípid, anomenat lípid A, i una estructura de polisacàrid [146]. L'LPS s'integra a la membrana del bacteri mitjançant el lípid A i exposa el polisacàrid a l'exterior. La fracció de polisacàrid consta de dues parts: un oligosacàrid més intern i conservat, anomenat nucli de l'LPS, i una cadena de polisacàrid més externa i variable anomenada antigen O. Així, els dominis estructurals poden presentar variacions entre espècies i entre soques de la mateixa espècie i això fa que el grau de resposta de l'organisme pugui variar en funció de l'origen de l'LPS [146].

La resposta de l'organisme a l'endotoxina s'inicia quan l'LPS arriba al torrent circulatori, amb la unió de l'endotoxina a una proteïna sèrica anomenada proteïna d'unio a LPS (LBP). L'LBP és una proteïna de fase aguda secretada pel fetge [147] que facilita la unió de l'LPS al receptor de membrana CD14 (mCD14), que es troba en monòcits i macròfags, o a la forma soluble del mateix receptor (sCD14), que possibilita l'activació d'altres cèl·lules, com les cèl·lules endotelials, que no expressen el receptor CD14 cel·lular [147,148]. El receptor mCD14 es troba ancorat a la membrana plasmàtica però no presenta cap domini intracel·lular de manera que requereix un altre receptor de membrana per a la transducció de senyal. Així, el receptor mCD14 facilita la unió de l'LPS al complex format pel receptor 4 semblant a Toll (TLR4) i la proteïna adaptadora extracel·lular MD-2 (proteïna de diferenciació mieloide 2). Després de la unió de l'LPS, el receptor TLR4 oligomeritza i recluta proteïnes adaptadores que intervenen en la transducció del senyal. La proteïna MyD88 (Factor 88 de diferenciació mieloide) actua com a proteïna adaptadora i s'uneix al domini citoplasmàtic de TLR4 i a IRAK-4 (quinasa 4 associada al receptor d'interleukina-1). D'aquesta manera s'inicia una cascada de fosforilacions que condueixen a l'activació de la IKK, que fosforila κB , alliberant el factor de transcripció NF- κB [149] (figura 8). Com s'ha descrit a l'apartat 1.2.2, el factor de transcripció NF- κB activa l'expressió, entre d'altres, de gens que codifiquen citoquines proinflamatòries (com el TNF α o la interleukina-6) o enzims com l'òxid nítric sintasa induïble [133,134].

La resposta metabòlica a l'administració d'LPS es caracteritza per una mobilització de les reserves energètiques [150,151]. A nivell del metabolisme lipídic, l'endotoxèmia provoca un augment dels TAG circulants [147]. Feingold i col. [152] descriuen que, depenent de la dosi d'LPS, aquesta hipertrigliceridèmia pot estar

provocada per un augment de la síntesi hepàtica de VLDL (amb dosis baixes d'LPS) o per una disminució en la degradació de les VLDL circulants (amb dosis d'LPS elevades). Alguns autors han proposat que les lipoproteïnes riques en TAG poden participar en la immunitat innata unint l'LPS i neutralitzant la seva toxicitat, i afavorint la seva degradació al fetge [147,153].

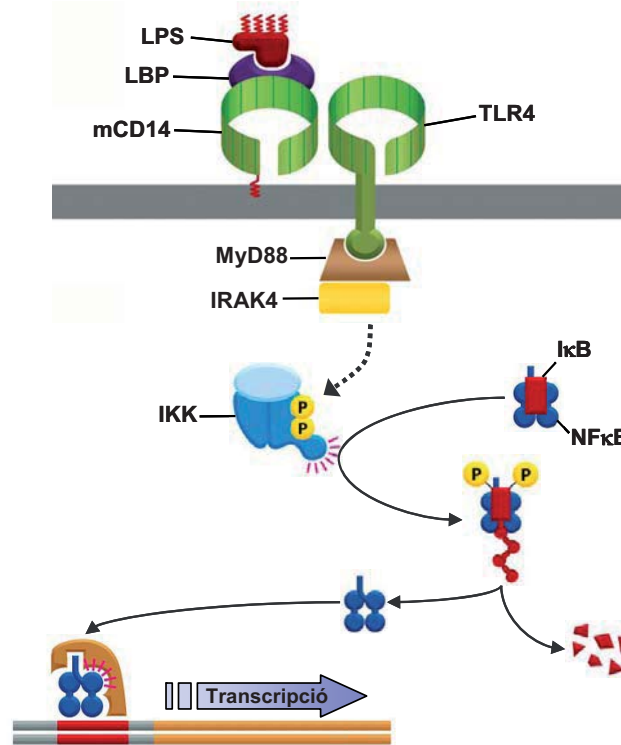


Figura 8. Activació d'NF-κB per LPS. L'LPS en sang és reconegut per l'LBP que facilita la unió al receptor mCD14. Aquest complex s'uneix al receptor TLR4 activant diverses vies de senyalització intracel·lular. Una d'aquestes vies provoca la fosforilació d'IκB i l'alliberament del factor de transcripció NF-κB que es transloca al nucli estimulant la transcripció dels seus gens diana. (Adaptat d'Alberts i col. [132].)

1.2.3.1. Lipopolisacàrid i lipoproteïna lipasa

Diversos estudis descriuen que l'administració *in vivo* d'LPS provoca una baixada d'activitat LPL en teixits com el teixit adipós blanc, el cor o el múscul [154-157]. Alguns d'aquests treballs proposen que la regulació de l'LPL en resposta a LPS es dona a nivell posttranscripcional, ja que no s'observen diferències en els nivells d'mRNA de l'enzim [156,157]. Picard i col. [157] proposen que l'augment en la producció d'òxid nítric, que resulta de l'activació de l'expressió de l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS), participa en la inhibició de l'activitat LPL en el múscul (però no en el teixit adipós blanc) ja que l'ús d'inhibidors de la iNOS reverteixen la baixada d'activitat LPL induïda per LPS en aquest teixit.

1.3. ÒXID NÍTRIC

L'òxid nítric (NO) és un radical lliure que es genera en diversos teixits de l'organisme mitjançant una reacció complexa catalitzada per l'òxid nítric sintasa. Aquesta molècula s'ha associat amb nombroses funcions biològiques, tant fisiològiques com patològiques, i se li han atribuït efectes beneficiosos i deleteris [158]. La complexitat de la seva síntesi, les diferents reaccions bioquímiques en què pot participar i les nombroses dianes amb què pot interactuar multipliquen els seus possibles efectes i han portat a la descripció d'efectes contraris per a aquesta molècula [158]. L'efecte final de l'NO depèn en gran mesura dels nivells d'NO sintetitzat i del medi intern en la cèl·lula diana [159].

1.3.1 Òxid nítric sintasa

L'NO està produït per l'òxid nítric sintasa (NOS). La NOS actua en forma homodimèrica i cada monòmer presenta un domini reductasa a l'extrem C-terminal, que conté llocs d'unió a NADPH, a flavina adenina dinucleòtid (FAD) i a flavina mononucleòtid (FMN); i un domini hemo a l'N-terminal, on es troba un grup hemo i els llocs d'unió a L-arginina i a tetrahidrobiopterina (BH₄) [160]. S'han caracteritzat tres isoformes de la NOS: NOS neuronal (nNOS o NOS-I), NOS induïble (iNOS o NOS-II) i NOS endotelial (eNOS o NOS-III). Es tracta de tres isoenzims amb una homologia propera al 50% [159] que presenten importants diferències en relació a la seva localització en la cèl·lula, al patró d'expressió en teixits i al nivell predominant de regulació (transcripcional, traduccional o posttraduccional) (taula 2).

L'nNOS i l'eNOS s'expressen de manera constitutiva i poden modular la seva activitat en funció dels nivells de Ca²⁺, mitjançant la unió de calmodulina a l'enzim. En contrast, la iNOS actua de manera independent a la concentració intracel·lular de Ca²⁺ i es regula mitjançant la síntesi de l'enzim, que s'indueix per citoquines (com ara el TNF α o l'interferó- γ) o per LPS [133]. Tot i així, la iNOS també presenta el mateix domini d'unió a calmodulina que les altres isoformes però té una afinitat més alta que fa que sempre hi hagi calmodulina unida de forma independent dels nivells de Ca²⁺ [161].

L'nNOS i l'eNOS tenen uns nivells de producció d'NO baixos i de curta durada, mentre que la iNOS, quan s'expressa, produeix nivells alts d'NO de manera continuada [159]. També existeixen diferències en relació a la localització intracel·lular de l'enzim, l'nNOS i la iNOS es presenten al citosol (tot i que l'nNOS també s'ha trobat associada a membrana en cèl·lules musculars [159]), mentre que l'eNOS es presenta unida a membrana. En aquest sentit, només l'eNOS presenta una miristil·lació que pot participar en la unió de l'enzim a la membrana [160].

Pel que fa a la distribució de les diferents isoformes en els teixits, l'expressió d'nNOS, iNOS i eNOS s'observà inicialment al cerebel, als macròfags i a l'endoteli vascular, respectivament [160,162]. No obstant, estudis posteriors han demostrat una distribució més àmplia de les tres isoformes en descriure expressió d'nNOS a cervell, medul·la espinal, nervis perifèrics i múscul esquelètic; expressió d'iNOS en

hepatòcits i cèl·lules de la musculatura llisa vascular, entre d'altres; i expressió d'eNOS en teixits com el fetge o el pulmó [162,163].

També s'ha descrit que l'eNOS i l'nNOS es poden fosforilar provocant un augment de la producció d'NO en el cas de l'eNOS [164] i una inhibició en el cas de l'nNOS [165]. A més, existeixen altres característiques que augmenten la complexitat de la regulació d'aquests enzims com són l'existència d'isoformes de l'nNOS, com a conseqüència de la maduració alternativa de l'mRNA [166], o la interacció de l'eNOS amb altres proteïnes que poden actuar activant o inhibint aquest enzim [167].

	nNOS (NOS I)	iNOS (NOS II)	eNOS (NOS III)
Pes molecular (kDa)	160	130	133
Funció principal	Missatger neuronal	Immunotoxicitat	Relaxació vascular
Localització subcel·lular	Principalment citosòlica (excepte a múscul, on es troba unida a membrana)	Citosòlica	Unida a membrana
Regulació de l'expressió	Constitutiva (s'estimula per hormones sexuals i després de dany neuronal)	Normalment no s'expressa. L'expressió s'indueix per citoquines i endotoxines	Constitutiva (s'estimula per hormones sexuals i fregament per cisalla)
Activitat dependent de la concentració de Ca ²⁺ intracel·lular	Sí, s'activa per increments en la concentració de Ca ²⁺	No	Sí, s'activa per increments en la concentració de Ca ²⁺
Nivells de producció d'NO	pmol-nmol	nmol-µmol	pmol-nmol

Taula 2. Característiques de les diferents isoformes de la NOS. nNOS, NOS neuronal; iNOS, NOS induïble; eNOS, NOS endotelial. (Adaptat de Pagliaro [158] i de Lincoln [159].)

1.3.2 Síntesi de l'òxid nítric

S'ha proposat que les tres isoformes de la NOS sintetitzen l'NO pel mateix mecanisme ja que requereixen els mateixos cofactors [168]. L'NO es sintetitza a partir d'L-arginina i O₂ mitjançant dues reaccions de monooxigenació que requereixen NADPH com a donador d'electrons (figura 9). La primera reacció comporta la hidroxilació d'un nitrogen del grup guanidino de l'L-arginina generant el metabòlit intermediari N^ω-hidroxi-L-arginina que és posteriorment oxidat donant L-citrul·lina i NO [168].

En la síntesi de l'NO, s'ha proposat que l'NADPH s'uneix a l'extrem C-terminal de la NOS, on redueix el cofactor FAD que està unit molt a prop. A continuació, la forma reduïda de FAD, redueix FMN i, d'aquesta manera, les flavines dirigeixen el flux d'electrons de l'extrem C-terminal a l'N-terminal de la NOS, on es localitza el domini hemo [159].

Cadascuna de les dues reaccions de monooxigenació implicades en la síntesi d'NO pot subdividir-se en dues reaccions de reducció. El desacoblament d'aquestes dues reaccions de reducció comporta la producció d'anió superòxid (O₂⁻). La BH₄ és

un cofactor implicat en l'acceleració de la segona reducció de manera que limita l'anomenat desacoblament de la NOS [167]. Així, quan els nivells de BH₄ són inferiors als normals es produeix O₂⁻ com a conseqüència del desacoblament entre la reducció de l'oxigen i l'oxidació de l'L-arginina [158].

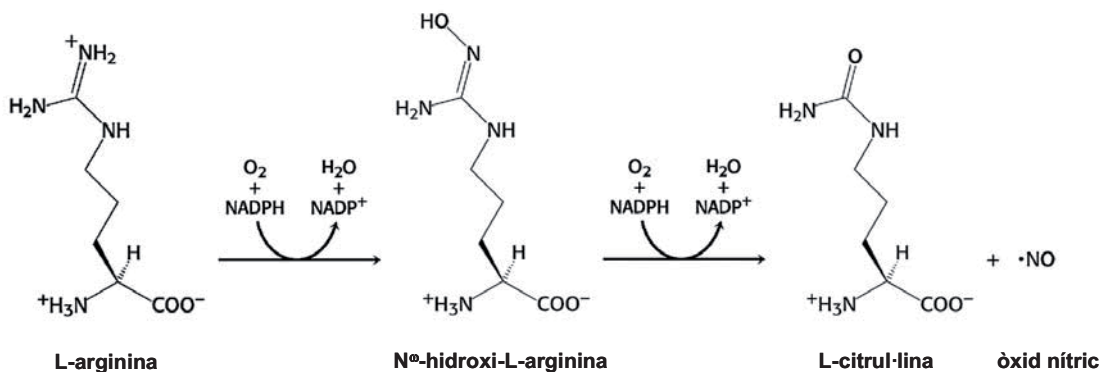


Figura 9. Síntesi d'NO. L'NO es sintetitza a partir d'L-arginina mitjançant l'acció de la NOS.

1.3.3 Funcions fisiològiques de l'òxid nítric i mecanismes d'acció

L'NO difon lliurement a través de membranes i pot participar en el control de diversos processos fisiològics com ara la regulació del to vascular, la inhibició de l'agregació de les plaquetes o la neurotransmissió [160]. A més d'aquestes funcions, a concentracions elevades l'NO pot actuar com a agent citotòxic inhibint diversos processos metabòlics i induint dany directe en el DNA; la qual cosa pot provocar una disminució dels recursos energètics, citòstasi i, en darrer terme, la mort cel·lular [159].

S'han definit dues vies de senyalització de l'NO: una depenent de GMP cíclic (cGMP) i una altra, independent de cGMP, mitjançada per la modificació posttraduccional de proteïnes induïda per l'NO o els seus derivats [167]. La via depenent de cGMP participa en la regulació de processos fisiològics com la vasodilatació, l'agregació plaquetària i la neurotransmissió. En aquest cas, els nivells baixos d'NO produïts per l'eNOS i l'nNOS activen la guanilat ciclasa soluble (sGC) i estimulen així la síntesi de cGMP a partir de GTP. Aquest cGMP és un segon missatger que intervé, mitjançant proteïnes quinases activades per cGMP, en la regulació de proteïnes contràctils (provocant vasodilatació) o en l'activació de vies de regulació de l'expressió gènica [167].

D'altra banda, en el cas de l'NO produït per la iNOS, el cGMP no té una implicació crítica en la via de senyalització, sinó que hi participa un ampli ventall de dianes i mecanismes d'acció [167]. En aquest context, cal destacar que l'NO és una molècula inestable que reacciona amb altres molècules generant diversos compostos anomenats col·lectivament espècies reactives del nitrogen (RNS). Les RNS són compostos derivats de l'NO entre els quals s'inclouen el catió nitrosoni (NO⁺), l'anió nitroxil (NO⁻) –que coexisteixen amb el propi NO i poden passar d'una

forma a l'altra depenent de les condicions redox- i el peroxinitrit (ONOO^-), una molècula molt reactiva que es forma a partir d' NO i O_2^- [158,167].

Les RNS poden interaccionar, entre d'altres, amb el DNA, amb lípids i amb residus aminoacídics (principalment serines i tirosines) i induir, en aquest darrer cas, modificacions posttraduccionals en proteïnes que poden portar a una alteració de la seva funció. Aquestes modificacions, a diferència d'altres modificacions posttraduccionals com la fosforilació, no estan catalitzades per enzims específics sinó que es donen per la reacció química d'RNS amb proteïnes. S'ha proposat que alguna d'aquestes modificacions, especialment l'S-nitrosilació de cisteïnes, pot participar en processos de transducció de senyal [169]. En favor d'aquesta idea, s'ha descrit que l'S-nitrosilació és un procés reversible i s'han identificat diversos enzims implicats en reaccions de denitrosilació [167], tot i que –en condicions fisiològiques– aquesta modificació és làbil i pot revertir sense la intervenció d'enzims específics [169]. Així, pel seu caràcter reversible i per la selectivitat dels residus modificats, alguns autors han comparat l'S-nitrosilació amb la fosforilació com a sistema de regulació de proteïnes [167,169].

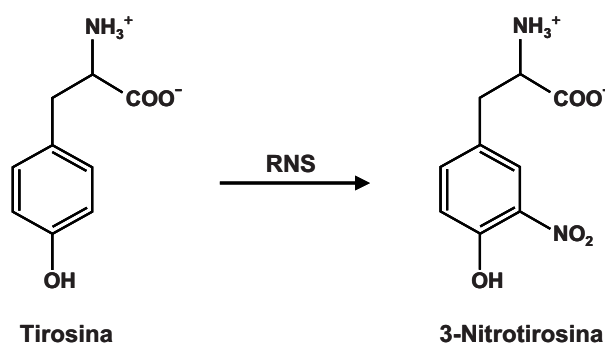


Figura 10. Nitració de l'aminoàcid tirosina. La nitrotirosina es forma per l'addició d'un grup nitro ($-\text{NO}_2$) en un dels dos carbonis *orto* de l'anell aromàtic de la tirosina. RNS, espècies reactives del nitrogen.

Una altra modificació posttraduccionals induïda per RNS és la incorporació d'un grup nitro ($-\text{NO}_2$) a l'anell fenòlic d'un residu de tirosina formant una 3-nitrotirosina (figura 10). La nitració de tirosines es va definir inicialment com un marcador de la interacció de proteïnes amb RNS [170]. No obstant, alguns autors també li han atorgat un possible paper en la regulació de la funció de proteïnes en base a la selectivitat de les tirosines que es nitren i a una potencial reversibilitat d'aquesta modificació [171,172]. En aquest sentit, a diferència del que succeeix amb l'S-nitrosilació, alguns estudis suggereixen l'existència d'una possible activitat denitrasa [173,174] però aquesta activitat enzimàtica no s'ha caracteritzat amb detall.

2. OBJECTIUS

Estudis anteriors desenvolupats en el nostre grup de recerca, van mostrar que l'administració *in vivo* d'adrenalina provoca en la rata una disminució de l'activitat lipoproteïna lipasa (LPL) del teixit adipós blanc i un increment en plasma [125]. Posteriorment, es va estudiar, també en rata, la resposta a un estrès per immobilització com un model de secreció endògena d'adrenalina i es va observar que l'estrès agut (30 minuts) també provoca una baixada d'activitat en el teixit adipós blanc i un augment en plasma [77]. A més, altres resultats obtinguts en el nostre grup anticipaven que aquesta resposta podria produir-se a temps més curts [175]. Per això, el primer objectiu que ens vam plantejar va ser:

- **Estudiar *in vivo* l'evolució de l'activitat LPL, en plasma i en diversos teixits, durant un estrès agut per immobilització de 30 minuts.**

Els resultats obtinguts en aquest primer estudi, juntament amb antecedents del nostre grup [176,177] i d'altres autors [142,157] que suggerien una possible participació de l'òxid nítric (NO) en la regulació de l'LPL, ens van portar a plantejar el segon objectiu d'aquest treball:

- **Estudiar una possible modificació química de l'LPL produïda per l'NO o per espècies reactives del nitrogen *in vivo*.** Per això ens vàrem proposar:
 - Reproduir un model experimental en rata que induís la producció endògena d'uns nivells elevats d'NO i caracteritzar el perfil d'activitat LPL en aquest model.
 - Estudiar en aquest model, mitjançant eines proteòmiques, la possible nitració de l'LPL.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS *IN VIVO*

Animals i condicions d'estabulació

L'estudi es va realitzar en rates mascle de la soca Wistar (Harlan Interfauna Ibèrica, Barcelona) amb un pes de 220-250 g en el moment d'arribada. Per a l'experiment d'estrès agut per immobilització (vegeu 3.1.1), el d'administració d'LPS (vegeu 3.1.3) i per a l'obtenció de cors control (vegeu 3.1.5) les rates es van estabular per parelles durant una setmana en una cabina insonoritzada amb condicions controlades de llum (període de llum de 8 a 20 h), temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) i humitat relativa ($50 \pm 5\%$), i es van alimentar *ad libitum* amb pinso estàndard (A04, Panlab, Cornellà) i aigua. Per a l'experiment d'administració de TNF α (vegeu 3.1.2) i per a l'obtenció de plasma post-heparínic (vegeu 3.1.4) les rates es van mantenir durant una setmana a la Unitat d'Experimentació Animal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona en condicions controlades de llum (període de llum de 8 a 20 h), temperatura i humitat relativa, i es van alimentar *ad libitum* amb pinso estàndard (A04, Panlab, Cornellà) i aigua.

Tots els procediments d'experimentació emprats en aquest treball han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona i pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

3.1.1. Estrès agut per immobilització

Els animals es van sotmetre a un estrès agut per immobilització (IMMO) seguint un procediment descrit inicialment per Kvetnansky i col. [123], adaptat per Armario i col. [178] i emprat en estudis anteriors en el nostre grup [77,120]. Breument, les rates es van col·locar sobre una planxa de fusta en posició prona, es va introduir el seu cap en un tub de metacrilat per restringir-ne el moviment i es van lligar les seves extremitats a uns suports metàl·lics amb cinta adhesiva.

Disseny experimental

Els animals es van assignar aleatòriament a un dels 5 grups experimentals (6 animals per grup) (figura 11):

- Control (animals no estressats, expressat com a 0 minuts d'IMMO).
- 5 minuts d'IMMO.
- 15 minuts d'IMMO.
- 25 minuts d'IMMO.
- 30 minuts d'IMMO seguits de 2 minuts de repòs.

Obtenció de les mostres

Els experiments es van dur a terme entre les 14 i les 16 h per minimitzar l'efecte del ritme circadiari sobre l'activitat LPL descrit prèviament [179]. Les rates es van sacrificar per decapitació immediatament després de finalitzar el període

d'immobilització corresponent. La sang es va recollir en un vas que contenia EDTA i es va conservar en gel fins al moment de la centrifugació per a l'obtenció del plasma (2000 g, 15 minuts, 4°C). Després de recollir la sang es van extreure, pesar i congelar immediatament en nitrogen líquid diferents teixits: teixit adipós blanc (epididimal, retroperitoneal i mesentèric), teixit adipós marró interescapular, múscul esquelètic (paquet muscular de la part superior de les extremitats posteriors) i cor. Finalment, el plasma i els teixits obtinguts es van conservar a -80°C.

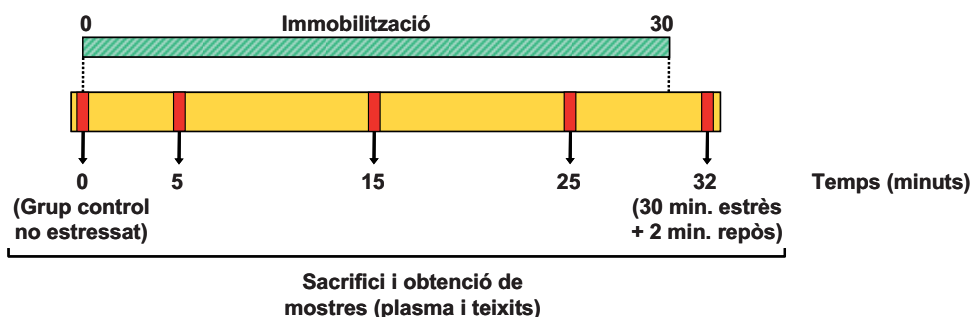


Figura 11. Representació esquemàtica dels grups experimentals en l'experiment d'estrès agut per immobilització.

3.1.2. Administració de factor de necrosi tumoral alfa

Sota anestèsia amb isoflurà (Inibsa, Rhodia Organique Fine, Bristol, Regne Unit. Dosi d'inducció: 4% v/v en O₂; dosi de manteniment: 2,5-3% v/v en O₂) i seguint les indicacions descrites en publicacions anteriors [140,141], es van administrar per vena caudal 20 µg (90 µg/kg p. c.) de TNFα recombinant de rata (Peprotech, Londres, Regne Unit) resuspesos en 200 µL de salí estèril, NaCl 0,9% p/v (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Als individus del grup control es van administrar 200 µL de salí estèril en les mateixes condicions.

Disseny experimental

Els animals es van assignar aleatòriament a un dels 4 grups experimentals (3-4 animals per grup) (figura 12):

- Administració de TNFα i sacrifici 6 hores després.
- Administració de salí i sacrifici 6 hores després (grup control).
- Administració de TNFα i sacrifici 24 hores després.
- Administració de salí i sacrifici 24 hores després (grup control).

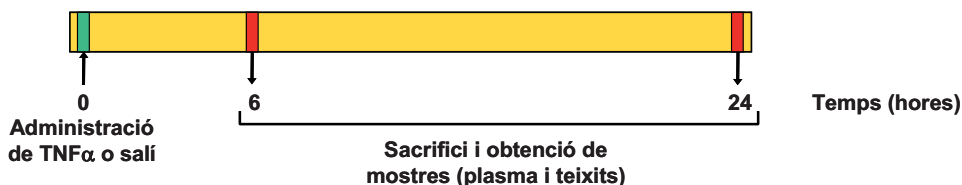


Figura 12. Representació esquemàtica dels grups experimentals en l'experiment d'administració *in vivo* de TNFα.

Obtenció de les mostres

Els animals van ser sacrificats per decapitació 6 ó 24 hores després de l'administració de TNF α o salí. La sang es va recollir en un vas que contenia EDTA i es va conservar en gel fins al moment de la centrifugació per a l'obtenció del plasma (2000 g, 15 minuts, 4°C). Seguidament, es van extreure, pesar i congelar en nitrogen líquid diversos teixits: teixit adipós blanc (epididimal i retroperitoneal), cor i fetge. Finalment, el plasma i els teixits obtinguts es van conservar a -80°C.

3.1.3. Administració de lipopolisacàrid

Experiment 1

D'acord amb treballs anteriors [180,181], es va administrar LPS (de *Salmonella abortus equi*; 10 mg/kg p. c.) per injecció intraperitoneal. La solució d'LPS (5 mg/mL) es va preparar en salí estèril, NaCl 0,9% p/v (l'LPS i el salí van ser adquirits a Sigma, Saint Louis, MO, EUA). En els individus del grup control es va administrar un volum equivalent de salí estèril, en les mateixes condicions.

Disseny experimental

Els animals es van assignar aleatòriament a un dels 4 grups experimentals (6 animals per grup) (figura 13):

- Administració d'LPS i sacrifici 6 hores després.
- Administració de salí i sacrifici 6 hores després (grup control).
- Administració d'LPS i sacrifici 24 hores després.
- Administració de salí i sacrifici 24 hores després (grup control).

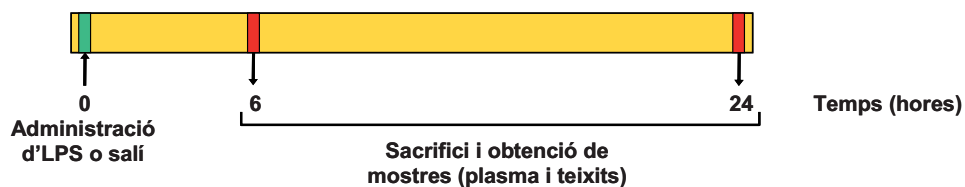


Figura 13. Representació esquemàtica dels grups experimentals en el primer experiment d'administració *in vivo* d'LPS.

Obtenció de les mostres

Els animals van ser sacrificats per decapitació 6 ó 24 hores després de l'administració d'LPS o salí. Es va recollir la sang en un vas que contenia EDTA i es va conservar en gel fins al moment de la centrifugació per a l'obtenció del plasma (2000 g, 15 minuts, 4°C). Seguidament, es van extreure, pesar i congelar en nitrogen líquid diversos teixits: teixit adipós blanc (epididimal, retroperitoneal i mesentèric), teixit adipós marró interescapular, múscul esquelètic (paquet muscular de la part superior de les extremitats posteriors) i cor. Finalment, el plasma i els teixits obtinguts es van conservar a -80°C.

Experiment 2

A partir dels resultats obtinguts a l'experiment 1, de caràcter prospectiu, es va desenvolupar un segon experiment amb l'objectiu d'estudiar mitjançant eines proteòmiques la possible nitració de l'LPL. En aquest cas, es va administrar LPS a 29 animals en les condicions descrites anteriorment.

Obtenció de les mostres

Els animals van ser sacrificats per decapitació 6 hores després de l'administració d'LPS (figura 14). La sang es va recollir en un vas que contenia EDTA i es va centrifugar (2000 g, 15 minuts, 4°C) per a l'obtenció del plasma. Seguidament, es va extreure, pesar i congelar en nitrogen líquid el cor. Finalment, les mostres obtingudes es van conservar a -80°C.

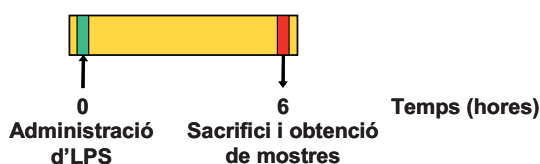


Figura 14. Representació esquemàtica del segon experiment d'administració *in vivo* d'LPS.

3.1.4. Obtenció de plasma postheparínic

L'administració intravenosa d'heparina provoca l'alliberament a la sang de l'LPL ancorada als heparan i dermatan sulfat de l'endoteli dels capil·lars sanguinis i ha estat àmpliament utilitzada en l'estudi de l'LPL tant en humans com en models animals [182,183].

Obtenció de les mostres

Sota anestèsia amb isoflurà (Inibsa, Rhodia Organique Fine, Bristol, Regne Unit; dosi d'inducció: 4% v/v en O₂; dosi de manteniment: 2,5-3% v/v en O₂) es van injectar 50 U/kg p. c. d'heparina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) per vena caudal (emprant una solució d'heparina 50 U/mL preparada en salí estèril, NaCl 0,9% p/v -Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Es va deixar recuperar els animals de l'anestèsia i 15 minuts després de l'administració, anestesiats-los en les mateixes condicions, es va extreure la sang per l'artèria aorta amb una xeringa pretractada amb una solució d'EDTA 80 mM. La sang es va mantenir en gel fins al moment de la centrifugació (2000 g, 15 minuts, 4°C). El plasma obtingut es va conservar a -80°C.

3.1.5. Obtenció de cors de rata control

Per a l'obtenció de cors de rata control, es van sacrificar per decapitació animals no sotmesos a cap tractament i estabulats en una cabina insonoritzada, se'ls va

extreure el cor, i aquest es va congelar immediatament en nitrogen líquid i es va conservar a -80°C .

3.2. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS EN PLASMA

3.2.1. Determinació de glucosa

Breu descripció i fonament

Per a la determinació de glucosa en plasma es va utilitzar un sistema enzimàtic colorimètric comercial basat en el mètode descrit per Trinder [184]. La glucosa present a la mostra és oxidada a àcid glucònic per la glucosa oxidasa generant-se peròxid d'hidrogen, que permet a la peroxidasa catalitzar la condensació oxidativa de la 4-aminofenazona i el fenol presents a la barreja de reacció generant 4-(p-benzoquinonamonoimino)-fenazona, un producte amb un màxim d'absorbància a 500 nm. La concentració de glucosa és proporcional a la densitat òptica (DO) final de la mostra.

Reactius

- Reactiu comercial per a la quantificació de glucosa (Glucose PAP CP, Horiba ABX, Montpellier, França). El reactiu conté 4-aminofenazona, fenol i els enzims glucosa oxidasa i peroxidasa.
- Solució mare de glucosa 10 mM.

Procediment

Operacions prèvies

Es va preparar l'estàndard a partir de la solució mare de glucosa 10 mM fent un banc de dilucions en aigua Milli-Q per obtenir els punts 0; 0,061; 0,125; 0,25; 0,5; 1 i 2 mM. Aquesta patró podia conservar-se a -20°C i emprar-se en diferents valoracions.

Anàlisi de les mostres

Es van aplicar inicialment 4 μL d'estàndard per triplicat o mostra per duplicat en una placa multipou. Es van afegir 300 μL del reactiu a cada pou, es va incubar la placa, protegida de la llum, 15 minuts a temperatura ambient en agitació suau i, finalment, es va llegir l'absorbància a 500 nm mitjançant un lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan, Salzburg, Àustria).

Càlculs i expressió dels resultats

Per obtenir la concentració de glucosa de les mostres es va interpolar el valor de DO de cada mostra a la recta patró. En mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.2.2. Determinació d'àcids grassos no esterificats

Breu descripció i fonament

Per a la determinació d'àcids grassos no esterificats (NEFA) es va utilitzar un sistema enzimàtic colorimètric comercial basat en el mètode descrit per Shimizu i col. [185]. Els NEFA presents a la mostra són convertits als seus respectius acil-CoA per acció de l'acil-CoA sintetasa, en una reacció dependent d'ATP. Els acil-CoA produïts són oxidats als respectius enoil-CoA per l'acil-CoA oxidasa generant-se peròxid d'hidrogen. Aquest peròxid d'hidrogen fa possible, en presència de la peroxidasa, la condensació oxidativa de la 4-aminofenazona i la 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina, presents a la barreja de reacció, que genera un producte amb un màxim d'absorbància a 550 nm. La concentració d'aquest producte és proporcional al contingut de NEFA de la mostra.

Reactius

- Kit NEFA C (Wako Chemicals, Neuss, Alemanya). Components del kit:
 - Reactiu A: conté ATP, CoA, 4-aminofenazona i l'enzim acil-CoA sintetasa.
 - Reactiu B: conté 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina i els enzims acil-CoA oxidasa i peroxidasa.
 - Solució mare d'àcid oleic 1 mM.

Procediment

Operacions prèvies

- Es va preparar l'estàndard a partir de la solució mare d'àcid oleic 1 mM fent un banc de dilucions en aigua Milli-Q per obtenir els punts 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1 mM. Aquesta patró podia conservar-se a -20°C i emprar-se en diferents valoracions.
- Els reactius A i B del kit es van resuspendre, respectivament, en 10 i 20 mL de les solucions A i B, que conté el propi kit i són de composició no descrita.

Anàlisi de les mostres

Inicialment es van aplicar 5 μL d'estàndard per triplicat o mostra per duplicat en una placa multipou. Seguidament, es van afegir 75 μL de la barreja de reactiu A a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, 10 minuts a 37°C en agitació suau. Després, es van afegir 150 μL de la barreja de reactiu B a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, 10 minuts a 37°C en agitació suau. Finalment es va llegir l'absorbància a 550 nm mitjançant un lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan, Salzburg, Àustria).

Càlculs i expressió dels resultats

Es va determinar la concentració de NEFA de les mostres interpolant el valor de DO

de cada mostra a la recta patró. En mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.2.3. Determinació de glicerol

Breu descripció i fonament

La determinació de glicerol es basa en un mètode enzimàtic fluorimètric descrit per Garland i Randell [186]. El mètode consisteix en la transformació del glicerol a dihidroxiacetona fosfat acoblada a la reducció de NAD^+ a NADH . La transformació es realitza en dos passos en què intervenen dos enzims: la glicerol quinasa que, en presència d'ATP, transforma el glicerol en glicerol-3-fosfat, i la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa, que transforma el glicerol-3-fosfat en dihidroxiacetona fosfat reduint el NAD^+ . Quantifiquem l'increment de fluorescència a 450 nm derivat de la formació de NADH , que serà proporcional al contingut de glicerol de la mostra.

Reactius

- HClO_4 60% p/v.
- Tampó glicina-hidrazina pH 9,8 (glicina 0,2 M; hidrazina 1 M; MgCl_2 2 mM).
- ATP 50 mM.
- NAD^+ 20 mM.
- Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya).
- Glicerol quinasa (Sigma, Saint Louis, MO, EUA).
- Solució mare de glicerol 2,26 mM.

Procediment

Operacions prèvies

- Aquesta determinació requereix la desproteïnitzaació prèvia de les mostres. Per desproteïnitzaar les mostres es va afegir HClO_4 60% p/v a la mostra en proporció 70:3 v/v (mostra: HClO_4), es van agitar els tubs amb vòrtex, es van centrifugar (16000 g, 15 minuts, 4°C) i es van recollir els sobrenedants. Els sobrenedants podien guardar-se congelats fins al moment de la valoració.
- Es va preparar l'estàndard a partir de la solució mare de glicerol 2,26 mM fent un banc de dilucions en tampó glicina-hidrazina per obtenir els punts 0; 3,75; 7,5; 15; 30 i 60 μM . Aquesta patró es podia conservar a -20°C i emprar-se en diferents valoracions.
- Immediatament abans de l'assaig, es va preparar el volum necessari de la barreja de reacció mantenint les següents proporcions: 10 mL de tampó glicina-hidrazina; 330 μL d'ATP 50 mM; 330 μL de NAD^+ 20 mM i 100 μL de glicerol-3-fosfat deshidrogenasa.

Anàlisi de les mostres

L'estàndard i les mostres es van diluir 1/6 en tampó glicina-hidrazina. Es van aplicar 300 µL d'aquesta dilució, per duplicat, en tubs de vidre i s'hi va afegir 1 mL de la barreja de reacció. Després d'agitar es va incubar 5 minuts a temperatura ambient i es va mesurar la intensitat de fluorescència inicial (IF_0) (λ d'excitació: 340 nm i λ d'emissió: 450 nm) en un espectrofluorímetre (RF-5001PC, Shimadzu, Kyoto, Japó). A continuació es van afegir 10 µL de glicerol quinasa diluïda 1/10 en aigua destil·lada i, després d'agitar i incubar 30 minuts a temperatura ambient, es va determinar novament la intensitat de fluorescència (IF_1) en les mateixes condicions. La diferència entre la intensitat de fluorescència final i la inicial (IF_1-IF_0) correspon a la reducció de NAD^+ a NADH.

Càlculs i expressió dels resultats

Es va obtenir la concentració de glicerol de les mostres interpolant l'increment d'IF (IF_1-IF_0) de cada mostra a la recta patró. En mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.2.4. Determinació de triacilglicerols

Breu descripció i fonament

Per a la determinació de triacilglicerols (TAG) en plasma es va utilitzar un sistema enzimàtic colorimètric comercial basat en el mètode descrit per Fossati i Prencipe [187]. Els TAG presents a la mostra són hidrolitzats per acció de la lipoproteïna lipasa generant-se els corresponents àcids grassos lliures i glicerol. Aquest glicerol és fosforilat per la glicerol quinasa a glicerol-3-fosfat, que seguidament és oxidat per la glicerol-3-fosfat oxidasa generant-se dihidroxiacetona fosfat i peròxid d'hidrogen. Aquest peròxid d'hidrogen és utilitzat per la peroxidasa per catalitzar la condensació oxidativa de la 4-aminofenazona i l'N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxanilina presents a la barreja de la reacció generant un producte amb un màxim d'absorbància a 604 nm. La concentració d'aquest compost és proporcional al contingut de TAG de la mostra.

La presència de glicerol a la mostra pot conduir a una lleugera sobreestima de la concentració real de TAG. No obstant, en plasmes la concentració de glicerol és habitualment unes 20 vegades inferior a la de TAG, de manera que la sobreestima pot considerar-se negligible.

Reactius

- Kit Triglyceride L-Type (Wako Chemicals, Neuss, Alemanya). Components:
 - Reactiu 1: conté ATP, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxanilina i els enzims lipoproteïna lipasa i glicerol quinasa.
 - Reactiu 2: conté 4-aminofenazona i els enzims glicerol-3-fosfat oxidasa i peroxidasa.
 - Solució mare de glicerol 2,26 mM.

Procediment

Operacions prèvies

Es va preparar l'estàndard a partir de la solució mare de glicerol 2,26 mM fent un banc de dilucions en aigua Milli-Q per obtenir els punts 0; 0,035; 0,071; 0,141; 0,282; 0,565; 1,13 i 2,26 mM. Aquesta patró es podia conservar a -20°C i emprar-se en diferents valoracions.

Anàlisi de les mostres

Es van aplicar 5 µL d'estàndard per triplicat o mostra per duplicat en una placa multipou. Es van afegir 135 µL del reactiu 1 a cada pou i es va incubar la placa, protegida de la llum, 5 minuts a 37°C en agitació suau. Seguidament, es van afegir 65 µL del reactiu 2 a cada pou, es va incubar la placa, protegida de la llum, 5 minuts a 37°C en agitació suau i es va llegir l'absorbància a 604 nm mitjançant un lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan, Salzburg, Àustria).

Càlculs i expressió dels resultats

Per obtenir el valor de TAG de les mostres es va interpolar el valor de DO de cada mostra a la recta patró. En mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.2.5. Determinació de β -hidroxibutirat

Breu descripció i fonament

Es va determinar la concentració de β -hidroxibutirat en plasma com a estima de la concentració de cossos cetònics circulants, atès que representen, de manera aproximada, més d'un 60% del total de cossos cetònics [79]. Aquesta quantificació es basa en el mètode descrit per Kientsch-Engel i Siess [188]. En aquest mètode fluorimètric el β -hidroxibutirat present a la mostra és transformat en acetoacetat amb la reducció de NAD⁺ a NADH. Aquesta reacció es realitza en un sol pas per l'acció de la β -hidroxibutirat deshidrogenasa. Quantifiquem l'increment de fluorescència a 450 nm derivat de la formació de NADH, que és proporcional al contingut de β -hidroxibutirat de la mostra.

Reactius

- Tampó Tris-HCl 0,1 M pH 8,5.
- Reactiu A: conté hidrat d'hidrazina 140 mM i HCl 48 mM. S'enrasa a 100 mL amb Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 i es comprova que el pH sigui 8,5. Immediatament abans de fer-lo servir, cal afegir NAD⁺ a una concentració final de 220 µM.
- Reactiu B: conté albúmina sèrica bovina (BSA) 0,04% p/v i β -hidroxibutirat deshidrogenasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya).
- Solució mare de β -hidroxibutirat 50 mM.

Procediment

Operacions prèvies

- Aquesta determinació requereix la desproteïnitització prèvia de les mostres. Les mostres es van desproteïnitzar seguint el protocol descrit a les *operacions prèvies* de l'apartat 3.2.3.
- Es va preparar l'estàndard a partir de la solució mare de β -hidroxibutirat 50 mM fent un banc de dilucions en aigua Milli-Q per obtenir els punts 0; 6,2; 12,4; 24,8; 62 i 124 μ M. Aquesta patró podia conservar-se a -20°C i emprar-se en diferents valoracions.

Anàlisi de les mostres

Es van aplicar per duplicat 30 μ L d'estàndard o 90 μ L de mostra en tubs de vidre. Es van afegir 200 μ L d'aigua destil·lada als tubs d'estàndard i 140 μ L als tubs de mostra per tal d'igualar el volum a tots els tubs. A continuació es va afegir 1 mL de reactiu A (després d'afegir el NAD^+), es va agitar i es va determinar la intensitat de fluorescència inicial (IF_0) (λ d'excitació: 340 nm i λ d'emissió: 450 nm) en un espectrofluorímetre (RF-5001PC, Shimadzu, Kyoto, Japó). Seguidament, es van afegir 10 μ L de reactiu B, es van agitar els tubs i es van incubar protegits de la llum durant 1 h a temperatura ambient. Finalment, es va determinar novament la intensitat de fluorescència (IF_1) en les mateixes condicions. La diferència entre la intensitat de fluorescència final i la inicial ($\text{IF}_1 - \text{IF}_0$) correspon a la reducció de NAD^+ a NADH.

Càlculs i expressió dels resultats

Es va obtenir la concentració de β -hidroxibutirat de les mostres interpolant l'increment d'IF ($\text{IF}_1 - \text{IF}_0$) de cada mostra a la recta patró. En mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.2.6. Determinació de proteïnes

Breu descripció i fonament

Per a la valoració de proteïna es va emprar un mètode colorimètric comercial basat en el mètode de Bradford [189]. El colorant Coomassie G-250, present a la barreja de la reacció, s'uneix a les proteïnes de la mostra en medi àcid formant un complex amb un màxim d'absorbància a 595 nm.

Reactius

- Reactiu comercial per a la quantificació de proteïnes (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, EUA).
- Solució mare d'albúmina sèrica bovina (BSA) (2 mg/mL).

Procediment

Operacions prèvies

Es va preparar l'estàndard a partir de la solució mare de BSA fent un banc de dilucions en aigua Milli-Q per obtenir els punts 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 i 1,2 mg/mL. Aquesta patró podia conservar-se a -20°C i ser utilitzada en diferents valoracions.

Anàlisi de les mostres

Es van aplicar 5 µL d'estàndard per triplicat o mostra per duplicat en una placa multipou. A continuació, es van afegir 300 µL del reactiu comercial a cada pou, es va incubar la placa 15 minuts a temperatura ambient en agitació suau, protegida de la llum, i es va llegir l'absorbància a 595 nm mitjançant un lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan, Salzburg, Àustria).

Càlculs i expressió dels resultats

Per obtenir la concentració de proteïna de les mostres es va interpolar el valor de DO de cada mostra a la recta patró. En mostres diluïdes es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.2.7. Determinació de nitrat

Breu descripció i fonament

L'òxid nítric que arriba al plasma, passa ràpidament a nitrat per acció de l'oxihemoglobina i altres factors oxidants. El sistema per a la quantificació de nitrat en plasma és una adaptació de Ricart-Jané i col. [190] del mètode descrit per Griess [191], que permet quantificar nitrit en solució. Considerant que el mètode de Griess permet la quantificació de nitrit, cal aplicar un pas previ de reducció del nitrat, que es duu a terme emprant l'enzim nitrat reductasa. El mètode de Griess es basa en la reacció del nitrit amb la sulfanilamida en medi àcid, generant un catió diazoni que reacciona amb l'N-(1-Naftil)etilendiamina portant a la formació d'un colorant azo amb un màxim d'absorbància a 540 nm.

Reactius

- Tampó fosfats 50 mM pH 7,4.
- Tampó fosfats 20 mM pH 7,4 (per a la resuspensió de l'enzim i el cofactor).
- Reactius de Griess:
 - Reactiu de Griess A: N-(1-Naftil)etilendiamina 0,2% p/v.
 - Reactiu de Griess B: Sulfanilamida 2% p/v en H₃PO₄ al 5% v/v.
- Nitrat reductasa (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EUA).
- Cofactor de la nitrat reductasa (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EUA).
- Solució mare de NaNO₃ 0,2 M.

Procediment

Operacions i consideracions prèvies

- Per a la determinació de nitrat en plasma es van emprar mostres obtingudes utilitzant EDTA com a anticoagulant ja que altres anticoagulants, com el citrat o l'heparina, poden portar a subestimar o sobreestimar la mesura [190]. De cada mostra es va fer un blanc, que contenia tots els reactius excepte l'enzim i el cofactor, i una recuperació, que a més de la mostra i tots els reactius contenia una quantitat addicional de nitrat de sodi coneguda.
- Es preparà l'estàndard a partir d'una solució mare de NaNO_3 0,2 M fent un banc de dilucions en aigua Milli-Q per obtenir els punts 0; 5; 10; 15; 40; 100 i 200 μM . Aquesta patró podia conservar-se a -20°C i emprar-se en diferents valoracions.

Anàlisi de les mostres

Es van aplicar inicialment 50 μL de tampó fosfats 50 mM pH 7,4 en una placa multipou i, a continuació, 50 μL d'estàndard o mostra a cada pou. Als pous destinats a determinar la recuperació de cada mostra es van afegir 50 μL d'una solució de NaNO_3 de concentració coneguda i a la resta de pous es van afegir 50 μL d'aigua Milli-Q per corregir la diferència de volum. Després de reconstituir la nitrat reductasa i el cofactor seguint les indicacions del fabricant, es van aplicar 20 μL de l'enzim i 20 μL del cofactor a tots els pous excepte els destinats al blanc de cada mostra. Novament, es va corregir la diferència de volums afegint, en aquest cas, 40 μL de tampó fosfats 20 mM pH 7,4 en els pous destinats al blanc de cada mostra i es va incubar la placa 3 h a temperatura ambient, protegint-la de la llum. Es va preparar el volum requerit del reactiu de Griess complet barrejant els dos components, A i B, en proporció 1:1 v/v i es van afegir 100 μL del reactiu de Griess complet a cada pou. Finalment, es va incubar la placa 10 minuts a temperatura ambient, protegint-la de la llum, i es va llegir l'absorbància a 540 nm mitjançant un lector espectrofotomètric de plaques (Sunrise, Tecan, Salzburg, Àustria).

Càlculs i expressió dels resultats

Per representar l'estàndard es va restar primerament la mitjana de les DO del punt 0 de l'estàndard a les DO obtingudes amb els diferents punts de la patró. Es van ajustar els valors resultants a una recta mitjançant una regressió lineal. El valor de nitrat de les mostres es va obtenir restant a la DO de cada mostra el valor de DO del seu propi blanc, i interpolant el valor resultant a la recta patró. En mostres diluïdes, es va corregir la concentració obtinguda pel factor de dilució.

3.3. DETERMINACIÓ D'ACTIVITAT LIPOPROTEÏNA LIPASA

Breu descripció i fonament

Per a la determinació de l'activitat LPL vàrem basar-nos en una modificació [192] del mètode radioquímic posat a punt per Ramírez i col. [193]. El mètode de valoració quantifica l'activitat triacilglicerol hidrolasa de la lipoproteïna lipasa de les

mostres. Per determinar aquesta activitat enzimàtica s'utilitza un substrat que conté trioleïna (TO) marcada amb ^3H en els seus àcids grassos (glicerol tri[9,10-(n)- ^3H] oleat). D'aquesta manera, s'incuba la mostra amb el substrat i, posteriorment, els àcids grassos que s'han alliberat com a conseqüència del procés catalític es separen dels TAG no hidrolitzats mitjançant un sistema de repartició líquid-líquid. Per aturar la reacció primerament s'utilitza una barreja de dissolvents orgànics i, a continuació, s'hi afegeix un tampó bàsic que afavoreix l'extracció dels àcids grassos no esterificats (àcid oleic). La centrifugació d'aquesta barreja afavoreix l'aparició de dues fases: una d'inferior, on es troben els dissolvents orgànics amb el substrat radioactiu no hidrolitzat, i una de superior aquosa, on es troben els àcids grassos no esterificats. Finalment, s'extreu un volum d'aquesta fase superior i se'n quantifica la radioactivitat mitjançant un sistema de cintil·lació líquida que emet una radiació lumínica d'intensitat proporcional a les desintegracions dels isòtops que conté el líquid analitzat.

Reactius

- Tampó EDH (àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) 1 mM; ditiotreitòl (DTT) 1 mM; àcid 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etansulfònic (HEPES) 10 mM; heparina 5 U/mL) pH 7,5.
- Tampó LPL (àcid 1,4-piperazindietansulfònic (PIPES) 28,88 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 57,76 mM; BSA lliure d'àcids grassos 0,6 mg/mL) pH 7,5.
- Solució d'aturada de la reacció (metanol, cloroform i heptà en proporció 1,41:1,25:1; v/v/v, respectivament).
- Tampó borat-carbonat (es prepara una solució de K_2CO_3 0,1 M i, a continuació, s'ajusta el pH a 10,5 amb H_3BO_3 0,1 M).
- Sèrum de rata preescalfat (durant 30 minuts a 55°C).

Procediment

Operacions prèvies

Preparació de l'estoc de trioleïna radioactiva

L'estoc de trioleïna que vam utilitzar per preparar el substrat en cada valoració estava format majoritàriament per trioleïna freda (sense marcatge radioactiu) i per una petita part de trioleïna marcada radioactivament: 245,5 mg de trioleïna freda (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) i 600 μL de trioleïna marcada (glicerol tri[9,10-(n)- ^3H] oleat), 5 mCi/mL, 21 Ci/mmol (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Regne Unit). Utilitzant un tub de vidre graduat d'ús específic per a la preparació de l'estoc, s'enrasà fins a 8 mL amb toluè, de forma que la concentració final de trioleïna freda i marcada va ser de 34,65 mM i de 17,75 μM , respectivament.

Determinació de l'activitat específica

Després de preparar l'estoc, es van omplir 6 vials amb 4 mL de líquid de cintil·lació i a cadascun d'ells es van afegir 5 μL d'estoc. A partir de les desintegracions per

minut (dpm) obtingudes amb aquestes 6 rèpliques, es va determinar l'activitat específica de l'estoc. Els càlculs per obtenir aquest valor són els següents:

1. Es calcula la mitjana de les dpm obtingudes amb les 6 rèpliques (\bar{X}).
2. Es calcula el total de dpm que hi ha en els 8 mL d'estoc que s'ha preparat.

$$\frac{\bar{X} \text{ dpm}}{0,005 \text{ mL}} \times 8 \text{ mL} = A \text{ dpm totals de l'estoc}$$

3. A partir de les dpm totals es calcula l'activitat específica en dpm/nmol d'àcid oleic (OA).

$$\frac{A \text{ dpm totals de l'estoc}}{277,41 \mu\text{mol TO}} \times \frac{1 \mu\text{mol TO}}{10^3 \text{ nmol TO}} \times \frac{1 \text{ nmol TO}}{3 \text{ nmol OA}} = B \text{ dpm/nmol OA}$$

Preparació del substrat radioactiu

El volum de substrat que es va preparar per a l'assaig depenia en cada cas del nombre de tubs que es volia valorar. En general, per cada tub es van utilitzar 1,2 μL d'estoc de trioleïna radioactiva (vegeu més amunt), 58 μL de tampó LPL i 2 μL de sèrum de rata preescalfat, com a font d'apo C-II. Quan es va valorar l'activitat LPL en mostres de plasma, en el substrat no es va incloure el sèrum de rata preescalfat perquè: (1) resultats anteriors obtinguts en el nostre laboratori demostren que el sèrum –tot i estar preescalfat– pot ser una font de degradació no específica de la trioleïna, (2) l'activitat LPL en plasma preheparínic és més baixa que a teixit i això fa que, proporcionalment, la interferència del sèrum sigui més important en aquestes mostres i (3) en tractar-se d'una mostra de plasma la pròpia mostra ja aporta l'apo C-II necessària. Per no alterar la concentració de trioleïna en el substrat, en les determinacions d'activitat LPL a plasma es compensà la manca de sèrum preescalfat amb 2 μL addicionals de tampó LPL per cada tub.

Per a la preparació del substrat es va pipetejar inicialment el volum necessari d'estoc de trioleïna radioactiva en un tub de vidre *Pyrex* i s'evaporà el toluè amb un corrent de nitrogen gas. A continuació, s'afegí el tampó LPL i, mantenint el tub en gel, es sonicà (amplitud 40%, sonicador VC50T, Sonics and Materials, Danbury, CT, EUA) en 4 períodes de 30 segons separats per intervals de 15 segons i es verificà visualment l'homogeneïtat de l'emulsió. Finalment, quan fou necessari, es va afegir el volum corresponent de sèrum de rata preescalfat.

Processament dels teixits

El mètode de valoració d'activitat LPL utilitzat en aquest estudi requereix l'homogeneïtzació prèvia de les mostres de teixit. Els homogenats es van preparar en tampó EDH emprant una relació entre pes del teixit i volum de tampó (expressat en grams i mL, respectivament) d'1:5. L'homogeneïtzació es dugué a terme mitjançant un disruptor de tipus politró (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanya) a màxima potència mantenint en tot moment el tub en gel. Seguidament, la mostra es centrifugà (16000 g , 10 minuts, 4°C) i es recollí el sobrenedant per al posterior assaig d'activitat. Per minimitzar la pèrdua d'activitat que pot derivar-se de la congelació i descongelació de la mostra, aquests

homogenats de teixit es preparaven immediatament abans d'iniciar-se la valoració d'activitat.

Anàlisi de les mostres

Les mostres es van mantenir en gel fins al moment de la valoració. El processament inicial de les mostres fou diferent en funció del tipus de mostra. Així, en mostres que, a més d'LPL, contenen lipasa hepàtica (HL), com el plasma o el fetge, cal incubar prèviament la mostra (2 h a 4°C) amb un antisèrum anti-HL (antisèrum R21, cedit per la Dra. M. Robert, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona) per tal de minimitzar la interferència d'aquesta lipasa en la valoració. Així, la relació de volums en la dilució és 1:1:2 v/v/v de mostra, antisèrum anti-HL i tampó EDH, respectivament. En contrast, en mostres que no contenen lipasa hepàtica (teixits adiposos, múscul i cor) es va ometre la incubació amb l'antisèrum i, simplement, es van diluir les mostres en tampó EDH (1:3 v/v), per mantenir una dilució final d'1/4 en tots els tipus de mostra. A continuació, es van pipetejar, per duplicat, 7 µL de cada mostra diluïda en tubs de vidre. Paral·lelament, a cada valoració es van incloure: (i) 4 tubs amb 7 µL de tampó EDH, que constituïen els blancs de la valoració i (ii) dos controls interassaig: homogenats de cor i de fetge (7 µL d'una dilució 1/4 en EDH, per duplicat). En cas de valorar mostres que contien HL –i requerien l'ús d'antisèrum anti-HL– a la valoració es van incloure: (i) 4 tubs amb 7 µL d'una dilució 1/4 de l'antisèrum anti-HL en EDH (com a blanc de la valoració) i (ii) ambdós controls interassaig (homogenats de cor i de fetge) amb i sense antisèrum (en l'anàlisi dels resultats, la baixada de l'activitat lipasa del fetge va confirmar la inhibició de l'HL per part de l'antisèrum, mentre que el manteniment de l'activitat en cor va permetre avaluar l'especificitat de la inhibició). A continuació, es va preparar el substrat radioactiu (vegeu més amunt) i, després, prenent a la vegada les dues rèpliques de cada mostra, es van afegir 60 µL de substrat a cada tub, es van agitar suaument amb vòrtex i es van incubar 30 minuts a 25°C. Transcorregut aquest temps, es va aturar la reacció afegint a cada tub 1,2 mL de la solució d'aturada de la reacció i 0,33 mL de tampó borat-carbonat. Seguidament, es van agitar els tubs (6 minuts a 1200 rpm) en agitador orbital (Orbital Vibrax, Ovan, Lovango, Badalona). A la barreja resultant van aparèixer dues fases: una d'inferior més tèrbola, que contenia el cloroform i l'heptà i mantenia dissolta la trioleïna no hidrolitzada, i una fase superior transparent que contenia (en un volum calculat de 0,859 mL) el metanol, l'aigua, els soluts iònics (tampó borat-carbonat) i els àcids grassos alliberats durant l'assaig. Per diferenciar més ràpidament i amb millor definició aquestes dues fases, es van centrifugar els tubs (800 g, 10 minuts, 4°C). Es van recollir 0,3 mL de la fase superior i es van afegir a vials de cintil·lació que contien 4 mL de líquid de cintil·lació. Es van preparar també els comptes totals afegint 25 µL del substrat radioactiu a 4 vials que contien 4 mL de líquid de cintil·lació. Finalment, el comptatge de les mostres es duqué a terme en un comptador de radiació β (Tri-Carb 2100TR, Packard Instrument Company, Downers Grove, IL, EUA. Ubicat al Servei de Radioisòtops de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, Barcelona) utilitzant un protocol predefinit per la quantificació de ³H en el qual es compta cada tub durant 3 minuts.

Càlculs i expressió dels resultats

L'activitat LPL d'una determinada mostra es va calcular a partir de les seves dpm netes (obtingudes restant a les dpm de la mostra la mitjana de dpm dels blancs). L'activitat LPL s'expressa habitualment en miliunitats (mU), que es defineixen com la quantitat d'enzim que allibera 1 nmol d'oleat per minut a 25°C.

Per al càlcul de l'activitat enzimàtica es van tenir en compte les següents dades: (a) el volum de mostra diluïda que es va carregar en els tubs de valoració (7 µL), (b) la dilució que es va fer de la mostra (1/4), (c) el volum que es va recollir de fase superior per comptar-ne la radioactivitat (0,3 mL), (d) el volum total de fase superior (FS) (0,859 mL, obtingut calculant el sumatori dels volums de metanol, tampó borat-carbonat, substrat radioactiu i mostra diluïda que hi ha a cada tub), (e) el temps d'incubació de la mostra amb el substrat radioactiu (30 minuts) i (f) l'activitat específica (AE) de l'estoc de trioleïna radioactiva (vegeu més amunt).

Amb això es van determinar les mU/mL mostra, seguint el càlcul:

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

En el cas d'homogenats de teixit, també es pot expressar l'activitat per gram de teixit. Per a això cal tenir en compte el pes del fragment de teixit i el volum de tampó EDH emprats en la preparació de l'homogenat (expressats en grams i mL, respectivament). Reformulant el càlcul anterior, en aquest cas seria:

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

L'activitat LPL en teixit també pot expressar-se com a activitat total. Aquesta dada s'obté multiplicant l'activitat obtinguda per gram de teixit pel pes total del teixit.

3.4. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats estan expressats com a mitjana i error estàndard per cada grup experimental. Per determinar si les diferències entre grups eren significatives, en l'experiment d'estrès agut (vegeu 3.1.1) es va realitzar una anàlisi de la variança (ANOVA) d'un factor (temps d'immobilització) i en els experiments d'administració aguda de TNF α (vegeu 3.1.2) o LPS (vegeu 3.1.3) es va aplicar una ANOVA de dos factors (efecte del tractament i temps transcorregut des del moment de l'administració). A continuació, per determinar les diferències respecte al grup control en cada paràmetre, es va aplicar el test de comparacions múltiples de Tukey per a l'ANOVA d'un factor i el test de comparacions múltiples de Bonferroni

per a l'ANOVA de dos factors. El nivell de significació s'indica amb els símbols: $*(P<0,05)$, $** (P<0,01)$ i $*** (P<0,001)$.

Per a l'anàlisi estadística de les dades es van utilitzar els programes Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, EUA) i GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.5. PURIFICACIÓ PARCIAL DE LA LIPOPROTEÏNA LIPASA

3.5.1. Immunoprecipitació

Breu descripció i fonament

La immunoprecipitació és una tècnica que permet la precipitació selectiva d'una proteïna concreta a partir d'una mescla complexa de proteïnes mitjançant l'ús d'anticossos específics contra la proteïna d'interès. En aquest treball es va emprar aquesta tècnica amb l'objectiu d'immunoprecipitar l'LPL utilitzant els anticossos P66 o GB1 (vegeu més avall). En els processos d'immunoprecipitació és necessari unir l'anticòs a un substrat sòlid. En aquest cas es van acoblar inicialment els anticossos a *Sepharose*. *Sepharose* és el nom comercial d'unes esferes d'agarosa emprades habitualment per unir covalentment anticossos, enzims i altres proteïnes per al seu ús posterior en cromatografies d'afinitat. La *Sepharose* pot estar activada químicament (en aquest treball es va utilitzar *Sepharose* activada amb bromur de cianogen). Per a la recuperació posterior de la proteïna d'interès es va emprar una solució àcida per trencar la interacció antígen-anticòs.

Reactius

Els tampons i solucions es van preparar utilitzant aigua Milli-Q:

- Tampó d'acoblament (NaHCO_3 0,1 M pH 8,3; NaCl 0,5 M).
- Tampó de bloqueig (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0).
- Tampó acetat (acetat sòdic 0,1 M pH 4,0; NaCl 0,5 M).
- Tampó d'incubació (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,15 M; Tritó x-100 0,1% v/v; inhibidors de proteases –*Pefabloc SC* 2 mM i *Complete Mini* a la concentració recomanada pel fabricant, ambdós de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya).
- Solució d'elució (àcid trifluoroacètic (TFA) 0,1% v/v).
- Tampó de rentat I (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,3 M).
- Tampó de rentat II (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,15 M).
- *Sepharose* 4B activada amb bromur de cianogen (GE Healthcare, Uppsala, Suècia).

- Anticòs policlonal P66 obtingut en gallina emprant LPL bovina com a immunogen (cedit pel Dr. T. Olivecrona, Universitat d'Umeå, Umeå, Suècia).
- Anticòs policlonal GB1 obtingut en gallina emprant com a immunogen un pèptid sintètic corresponent als aminoàcids 22-41 de l'LPL de rata (desenvolupat en el nostre laboratori en col·laboració amb l'empresa Eurogentec, Seraing, Bèlgica). Anomenem aquest anticòs com a Gallina Belga 1 (GB1) d'acord amb la nomenclatura emprada en treballs anteriors del nostre grup [194].

Procediment

Operacions prèvies

- El que anomenem anticòs GB1 és un extracte proteic de rovell d'ou de la gallina immunitzada, obtingut com es descriu en treballs anteriors [194]. Per això, com a pas previ a l'ús de l'anticòs GB1 en la immunoprecipitació es va explorar la possibilitat de purificar les immunoglobulines Y (IgY) de l'anticòs GB1 mitjançant una cromatografia d'interacció tiòfila [195]. En la cromatografia es va emprar una columna comercial (*HiTrap IgY Purification HP*, GE Healthcare, Uppsala, Suècia) i es va seguir el procediment descrit pel fabricant. Breument, l'anticòs GB1 es va passar per la columna després d'haver-la equilibrat amb tampó d'equilibrat (fosfats de sodi 20 mM pH 7,5; K₂SO₄ 0,5 M). Seguidament es van passar 10 volums de columna de tampó d'equilibrat, 10 volums de columna de tampó d'elució (fosfats de sodi 20 mM pH 7,5) i 8 volums de columna de tampó de rentat (fosfats de sodi 20 mM pH 7,5; isopropanol 30% v/v).
- Prèviament a l'acoblament dels anticòs a *Sepharose* es van dialitzar 500 µL d'anticòs per intercanviar el seu tampó per tampó d'acoblament. Per a la diàlisi es van emprar cassets de diàlisi comercials (*Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes*, Pierce, Rockford, IL, EUA) de 0,5 mL de capacitat màxima i una mida de porus de la membrana que permetia el pas de molècules de menys de 10 kDa. La diàlisi es va fer a 4°C durant 5 h en un vas de precipitats que contenia 0,5 L de tampó d'acoblament (renovant el tampó cada hora).
- Acoblament dels anticòs a *Sepharose*:
 - Es va pesar la quantitat de *Sepharose* necessària (1 g de *Sepharose* seca dona uns 3,5-4 mL de *Sepharose* rehidratada) en un tub *Falcon*. S'afegí HCl 1 mM, s'agità suaument durant 15 minuts a 4°C, es centrifugà (500 g, 1 minut, 4°C) i es descartà el sobrenedant. Es va repetir el procés fins que es va haver rentat amb un volum equivalent a 200 mL d'HCl 1 mM per cada gram de *Sepharose* inicial.
 - Després de descartar el darrer sobrenedant es va resuspendre la *Sepharose* en tampó d'acoblament en una relació de volums 1:1 (tampó:*Sepharose*). Es van pipetejar 0,5 mL de *Sepharose* a la columna on es feia l'acoblament i, després de rentar la *Sepharose* cinc vegades amb tampó d'acoblament, es va afegir l'anticòs en tampó d'acoblament i es va incubar durant 2 h a temperatura ambient en agitació orbital.

- Després de la incubació s'eluí la solució per gravetat i es rentà dues vegades la *Sepharose* amb tampó de bloqueig, amb una relació de volums 3:1 (tampó:*Sepharose*) en cada rentat. Per bloquejar els llocs d'unió lliures s'incubà la *Sepharose* amb tampó de bloqueig durant la nit a 4°C en agitació orbital.
- Després d'eluir el tampó de bloqueig per gravetat es rentà la *Sepharose* passant alternativament tampó acetat i tampó de bloqueig suplementat amb NaCl (0,5 M, concentració final). Després de rentar 3 vegades amb cada tampó, la *Sepharose* –amb l'anticòs unit– es conservà a 4°C en tampó de bloqueig.
- Pretractament de la mostra

Com s'abordarà més endavant, a l'apartat de Resultats, per al reconeixement de la proteïna per part de l'anticòs va ser necessari el tractament previ de la mostra. Inicialment es va incubar la mostra 45 minuts a temperatura ambient amb DTT (90 mM, concentració final) i *Pefabloc SC* (19 µM, concentració final; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya), després es va afegir iodoacetamida (500 mM, concentració final) i es va incubar 30 minuts a temperatura ambient. A continuació, es va dialitzar la mostra, emprant cassets de diàlisi comercials (*Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes*, Pierce, Rockford, IL, EUA), a 4°C durant 2 h en un vas de precipitats que contenia 0,5 L de tampó Tris-HCl 20 mM pH 7,4; 0,15 M NaCl (renovant el tampó cada hora). Finalment, es va centrifugar la mostra dialitzada (15000 g, 10 minuts, 4°C) i el sobrenedant recollit es va utilitzar immediatament per a la immunoprecipitació.

Processament de les mostres

Per a la immunoprecipitació es van emprar mini-columnnes (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) de 0,7 mL de capacitat amb un filtre a la sortida que permet el pas de les proteïnes però no de la *Sepharose*. Aquestes columnnes poden acoblar-se amb tubs *Eppendorff* per recollir la solució per centrifugació. Es van pipetejar 50 µL de *Sepharose* –amb l'anticòs acoblat– i es va rentar 3 vegades amb tampó d'incubació (després de cada rentat es descartà el tampó centrifugant les columnnes a 500 g, 30 segons, 4°C). Seguidament, es va afegir la mostra (20-60 µL de plasma postheparínic) diluïda en tampó d'incubació (fins a un volum final de 350 µL) i s'incubà en agitació orbital durant 4 h a 4°C. A continuació, es va centrifugar en les condicions especificades anteriorment per recollir les proteïnes no unides a l'anticòs i, després, es van fer tres rentats amb 250 µL de tampó de rentat I, seguits de tres rentats amb tampó de rentat II. Finalment, es van eluir les proteïnes unides a l'anticòs amb 200 µL de solució d'elució i, immediatament, es va reequilibrar la columna fent tres rentats amb tampó de bloqueig. Per a l'anàlisi posterior, la fracció obtinguda amb la solució d'elució es va assecar i reconstituir en el tampó adequat per a la separació electroforètica (vegeu 3.6.1 i 3.6.2).

3.5.2. Cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose*

Breu descripció i fonament

La cromatografia d'afinitat a heparina és un mètode àmpliament utilitzat en els processos de purificació de l'LPL. En aquesta tècnica s'empra una matriu de *Sepharose* amb heparina immobilitzada. L'heparina és un polisacàrid altament sulfatat i l'LPL s'hi uneix mitjançant unions electrostàtiques gràcies a un domini ric en lisines i arginines que funcionalment es coneix com a domini d'unió a heparina. Per trencar la interacció iònica de l'heparina amb les proteïnes es poden utilitzar concentracions creixents de sal en gradient lineal o discontinu. Si es vol determinar l'activitat LPL de les fraccions, cal fer tot el procés a 4°C per tal de preservar l'activitat de l'enzim.

Reactius

Els tampons i solucions es van preparar utilitzant aigua Milli-Q:

- Tampó d'homogeneïtzació (HEPES 10 mM; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; deoxicolat sòdic 0,3% p/v; pH 7,5).
- Tampó d'equilibrat (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; glicerol 30% v/v; NaCl 0,15 M).
- Tampó de rentat I (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; glicerol 30% v/v; NaCl 0,75 M).
- Tampó d'elució (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; glicerol 30% v/v; NaCl 1,5 M).
- Tampó de rentat II (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; glicerol 30% v/v; NaCl 2,5 M).
- Tampó de regeneració 1 (Tris-HCl 0,1 M pH 8,5; NaCl 0,5 M).
- Tampó de regeneració 2 (acetat sòdic 0,1 M pH 5,0; NaCl 0,5 M).
- Tampó de conservació (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; etanol 20% v/v).
- Solució de BSA 50 mg/mL.
- Heparina-*Sepharose* (HS) CL-6B (GE Healthcare, Uppsala, Suècia)

Procediment

Operacions prèvies

Preparació de la columna

Les dimensions de la columna que emprem depèn del tipus i volum de mostra que es vulgui analitzar. En aquest treball, es va preparar la fase estacionària de la cromatografia utilitzant uns suports cilíndrics de vidre (30 cm x 0,7 cm de diàmetre) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). L'heparina-*Sepharose* (HS) CL-6B és comercial (GE Healthcare, Uppsala, Suècia) i, essencialment, es van seguir les instruccions del fabricant per a la rehidratació i rentat de l'HS i per a l'empaquetament de la columna:

- Es va pesar la quantitat d'HS necessària per preparar la columna (uns 3 g, tenint en compte que 1 g d'HS seca dona uns 3,5-4 mL d'HS rehidratada) repartida en dos tubs *Falcon* de 50 mL. S'omplí el tub amb aigua Milli-Q,

s'agità suaument durant 15 minuts a 4°C, es centrifugà (500 *g*, 1 minut, 4°C) i es descartà el sobrenedant. Es va repetir el procés fins que es va haver rentat amb un volum equivalent a 200 mL per cada gram d'HS inicial.

- Després de descartar el darrer sobrenedant es van fer dos rentats addicionals utilitzant Tris-HCl 10 mM pH 7,4 en comptes d'aigua Milli-Q.
- L'empaquetament de la columna es va fer a 4°C abocant l'HS rehidratada a la columna i passant 3 volums de columna de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 a un flux de 30 mL/h utilitzant una bomba peristàltica (Minipuls 2, Gilson, Villiers-le-Bel, França). En acabar es va deixar un volum residual de tampó per damunt de l'HS empaquetada. La columna es va mantenir sempre a 4°C.

Preparació de la mostra

Les mostres de teixit que havien de ser cromatografiades eren homogeneïtzades en tampó d'homogeneïtzació emprant una relació entre pes del teixit i volum de tampó (expressat en grams i mL, respectivament) d'1:5. L'homogeneïtzació es dugué a terme mitjançant un disruptor de tipus politró (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanya) a màxima potència mantenint la mostra en gel. Es deixà l'homogenat 1 h a 4°C, es centrifugà (100.000 *g*, 1 h, 4°C) i el sobrenedant es guardà a -80°C.

Processament de les mostres

Procediment per a columna gran

La cromatografia es dugué a terme a 4°C aplicant un flux de 15 mL/h mitjançant una bomba peristàltica (Minipuls 2, Gilson, Villiers-le-Bel, França) (figura 15). Durant tot el procés es van recollir fraccions en intervals de 7 minuts (que contenien un volum aproximat d'1,75 mL). Inicialment s'equilibrà la columna amb, com a mínim, 7 volums de columna de tampó d'equilibrat. Abans d'aplicar la mostra a la columna s'ajustà a una concentració final de 0,15 M de NaCl. Quan la mostra era plasma postheparínic, a més del NaCl, s'afegí deoxicolat sòdic a una concentració final de 0,1% p/v, d'acord amb treballs anteriors [196]. Després d'aplicar la mostra es van passar, com a mínim, 9 volums de columna de tampó d'equilibrat per descartar les proteïnes no retingudes a la columna. A continuació, es van passar 9 volums de columna de tampó de rentat I per tal d'eluir les proteïnes unides a l'heparina amb baixa afinitat i, seguidament, es va eluir l'LPL de la columna passant el mateix volum de tampó d'elució. De cada fracció recollida, es van fer dues alíquotes (de 50 µL) per valorar-ne la concentració de proteïna (vegeu 3.2.6) i l'activitat LPL (vegeu 3.3). A l'alíquota destinada a la valoració d'activitat LPL s'afegí BSA a una concentració final d'1 mg/mL per preservar l'activitat de l'enzim, d'acord amb Ramírez i col. [193]. Les fraccions recollides i les alíquotes es van conservar a -80°C.

Per fer possible la reutilització de la columna, en acabar el procés es van passar, com a mínim, 9 volums de columna de tampó de rentat II per eluir proteïnes unides a l'heparina amb alta afinitat i, a continuació, es regenerà la columna passant alternativament 3 volums de columna dels tampons de regeneració 1 i 2. La regeneració es completà passant tres vegades cadascun

d'aquests tampons i reequilibrant la columna amb tampó d'equilibrat. Quan la columna no es va utilitzar en un temps inferior a una setmana es va guardar a 4°C en tampó de conservació.

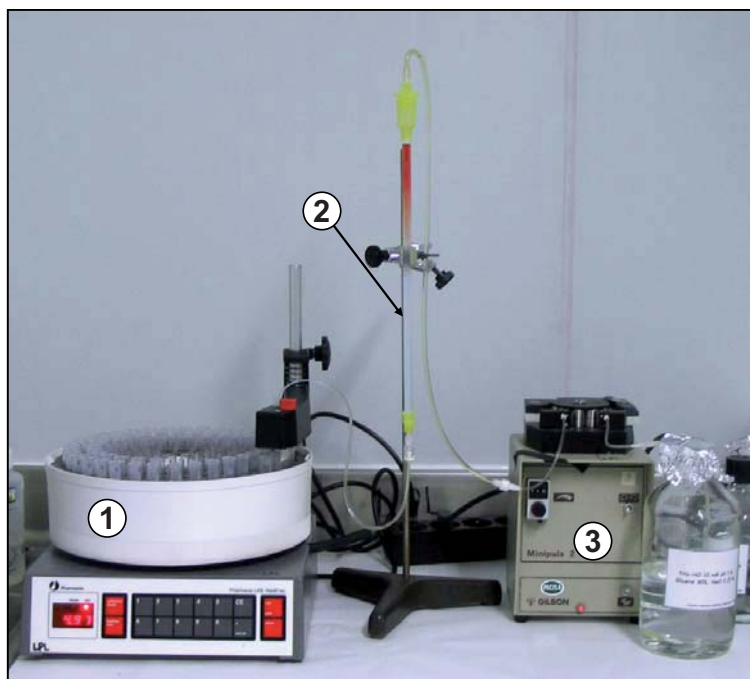


Figura 15. Sistema emprat per a la cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose en columna gran. (1) Col·lector de fraccions; (2) columna d'heparina-Sepharose; (3) bomba peristàltica.

Procediment per a mini-columnnes

Per a la cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose també es van emprar mini-columnnes (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) de 0,7 mL amb un filtre a la sortida que permet el pas de les proteïnes però no de l'heparina-Sepharose. Aquestes columnnes poden acoblar-se amb tubs *Eppendorff* per recollir la fase mòbil de la cromatografia per centrifugació. Inicialment es van pipetejar 100 μL d'heparina-Sepharose rehidratada a la mini-columnna i es van equilibrar afegint 350 μL de tampó d'equilibrat i centrifugant (500 g , 30 segons, 4°C) per descartar el tampó. Es va repetir aquest pas d'equilibrat 2 vegades més. A continuació es va afegir la mostra amb tampó d'equilibrat en proporció 2:33 v/v per a mostres de plasma postheparínic i LPL bovina comercial ó 4:31 v/v per a mostres d'homogenat de cor; en un volum total de 350 μL . Es va incubar la mostra amb l'heparina-Sepharose en agitació orbital durant 2 h a 4°C. Seguidament, es va centrifugar la mini-columnna (500 g , 30 segons, 4°C) per recuperar les proteïnes no retengudes i, seguint el mateix procediment, es van fer 3 rentats amb 250 μL de tampó Tris-HCl 10 mM pH 7,4; glicerol 30% v/v; NaCl 0,5 M; seguits de 3 rentats amb 250 μL de tampó de rentat I. Finalment, es va eluir la proteïna d'interès amb 250 μL de tampó d'elució i es va fer un rentat final amb 250 μL de tampó de rentat II. Les fraccions recollides es van conservar a -80°C i, posteriorment, es va analitzar la presència d'LPL per *western blot* (vegeu 3.6.4.1).

3.6. ELECTROFORESI I DETECCIÓ DE PROTEÏNES

3.6.1. Electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS

Breu descripció i fonament

L'electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) és una tècnica que permet la separació de proteïnes segons el seu pes molecular. La tècnica es basa en l'ús de dodecil sulfat sòdic (SDS), un detergent aniònic que desnatura les proteïnes i s'hi uneix conferint-los una càrrega negativa proporcional a la seva massa (en una relació aproximada d'1,4 grams d'SDS per cada gram de proteïna [197]). Per garantir que les proteïnes només conserven la seva estructura primària, a més de l'SDS cal emprar algun agent reductor, com ara DTT o β -mercaptoetanol, per trencar els enllaços disulfur de la proteïna i evitar que la conformació interfereixi en la seva mobilitat electroforètica. D'aquesta manera, es pot assumir que la distància que recorre la proteïna en el gel està directament relacionada amb el seu pes molecular.

Reactius

Els tampons i solucions es van preparar utilitzant aigua Milli-Q:

- Tampó d'electroforesi (glicina 192 mM; Tris 25 mM; SDS 0,1% p/v)
- Tampó de mostra (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; glicerol 40% v/v, SDS 8% p/v i traces de blau de bromofenol). Immediatament abans de fer-lo servir, cal afegir DTT a una concentració de 600 mM.
- Gel concentrador: acrilamida/bisacrilamida (37,5:1 p/p) 4% p/v; Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 0,1% p/v; N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) 0,2% v/v; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,2% p/v.
- Gel separador: acrilamida/bisacrilamida (37,5:1 p/p) a una concentració del 7,5 ó el 9% p/v depenent de la proteïna que es vulgui estudiar (vegeu 3.6.4.1-3.6.4.3), Tris-HCl 375 mM pH 8,8; SDS 0,1% p/v; TEMED 0,1% v/v; $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,1% p/v.

Procediment

Operacions prèvies

Per a l'SDS-PAGE es van emprar els sistemes *Mini-Protean II* i *Protean II XL* (ambdós de Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Per a la preparació del gel inicialment es van muntar els vidres en el suport per a la polimerització i es va comprovar l'estanquitat. Es va preparar el gel separador d'acord amb la composició indicada més amunt, es va abocar entre els dos vidres fins assolir una alçada equivalent a 3/4 parts del vidre petit i, a continuació, es va afegir lentament 1mL d'isopropanol 83% v/v. Després de deixar polimeritzar el gel durant 1 h es va descartar l'isopropanol 83% v/v, es van fer diversos rentats amb aigua Milli-Q i es va eixugar amb paper de filtre l'excés d'aigua que quedava damunt el gel separador.

A continuació, es va afegir el gel concentrador, es va col·locar la pinta de forma que no quedessin bombolles i es va deixar polimeritzar 1 h. El gel es va fer servir immediatament o fins a 24 h després de preparar-lo, conservant-lo a 4°C.

Anàlisi de les mostres

La quantitat de mostra aplicada en cada cas va variar en funció del tipus de mostra i la seva concentració de proteïna. La mostra es va barrejar amb el tampó de mostra suplementat amb DTT en una proporció 3:1 v/v. Es van bullir les mostres 10 minuts, i es van carregar al gel. Per a la separació electroforètica es van aplicar inicialment 50 V durant 30 minuts i 135 V fins a la sortida del front de blau de bromofenol. En acabar l'electroforesi el gel es va tenyir per a la visualització de les proteïnes (vegeu 3.6.3) o es van transferir les proteïnes a una membrana per a un assaig de tipus *western blot* (vegeu 3.6.4).

3.6.2. Electroforesi en dues dimensions

Breu descripció i fonament

L'electroforesi en dues dimensions (2DE) és un mètode àmpliament utilitzat per a l'anàlisi de mesclures proteiques complexes. Aquesta tècnica permet separar les proteïnes d'acord amb dues propietats independents en dues separacions electroforètiques consecutives: la primera dimensió és l'isoelectroenfocament (IEF), que permet separar les proteïnes en base al seu punt isoelèctric (pI); mentre que la segona dimensió consisteix en una electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (vegeu 3.6.1), que permet separar les proteïnes segons el seu pes molecular.

L'electroforesi bidimensional fou inicialment descrita per O'Farrell [198]. En la tècnica original s'empraven gels que contenien amfòlits portadors en l'IEF. El principal problema associat a aquesta versió inicial del mètode era la inestabilitat en el gradient de pH que es derivava d'una perllongació del temps d'IEF i que provocava el fenomen conegut com a deriva catòdica. Aquest fenomen és conseqüència del flux electroendosmòtic i provoca el desplaçament de les proteïnes de la mostra cap al càtode. El resultat era un patró de proteïnes que depenia del temps d'IEF i de la variabilitat entre lots de preparacions d'amfòlits portadors. Això feia de la 2DE una tècnica poc reproduïble i, per tant, amb resultats poc comparables entre laboratoris. Alguns anys després els problemes d'estabilitat en el gradient de pH i d'irreproducibilitat en l'IEF es van resoldre amb la introducció dels gradients immobilitzats de pH [199]. En aquest cas els amfòlits són copolimeritzats amb la matriu de poliacrilamida i s'evita la deriva catòdica. En aquest estudi s'han emprat tires comercials amb un gradient de pH immobilitzat de 3-10 ó 6-11.

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

Reactius

Els tampons i solucions es van preparar utilitzant aigua Milli-Q:

- Tampó de rehidratació (urea 7 M; tiourea 2 M; 3-[(3-colamidopropil)dimetilamoni]-1-propansulfonat (CHAPS) 2% p/v; *IPG buffer* –GE Healthcare, Uppsala, Suècia– 0,5 % p/v i traces de blau de bromofenol).
- Tampó d'equilibrat (Tris 50 mM; urea 6 M; glicerol 30% v/v; SDS 2% p/v i traces de blau de bromofenol).
- Solució de segellat (agarosa 0,5% p/v; Tris 25 mM; 0,1% p/v SDS; 192 mM glicina i traces de blau de bromofenol).
- Tampó d'electroforesi (glicina 192 mM; Tris 25 mM; SDS 0,1% p/v).
- Tires de gradient immobilitzat de pH (IPG) (rang de pH 3-10 ó 6-11 i llargada 7 ó 18 cm, GE Healthcare, Uppsala, Suècia).
- Oli mineral per cobrir les tires (*Immobiline Drystrip Cover Fluid*, GE Healthcare, Uppsala, Suècia).

Procediment

Operacions prèvies

La composició de la solució de la mostra és especialment rellevant en la 2DE perquè no ha d'afectar el punt isoelèctric de la proteïna ni pot tenir una concentració de sals que interfereixi en l'IEF. En el nostre cas, per a l'anàlisi de fraccions obtingudes en la cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose* (vegeu 3.5.2), es van precipitar les proteïnes amb àcid tricloroacètic (TCA). El procediment emprat va consistir en l'addició inicial de TCA fred (4°C) gota a gota (5% p/v, concentració final) sobre la mostra en agitació. Es va agitar suaument durant 1 h a 4°C, es va centrifugar (15000 *g*, 10 minuts, 4°C) i es va descartar el sobrenedant. Seguidament, es van fer dos rentats addicionals amb TCA fred 5% p/v per eliminar restes de sals, un rentat amb acetona freda (-20°C) per eliminar les restes de TCA i, després de descartar el darrer sobrenedant, es va deixar assecar el precipitat 5 minuts a temperatura ambient. Finalment, el precipitat es va resolubilitzar en tampó de rehidratació (suplementat amb DTT 18 mM, concentració final), es va sonicar en fred alternant –durant un minut– intervals de 5 segons de sonicació (amplitud 30%, sonicador UPH100, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemanya) i intervals de 5 segons de repòs, i es va congelar a -80°C fins al moment de l'IEF.

Anàlisi de les mostres

Es van rehidratar les tires durant 10-15 h aplicant 125 µL ó 350 µL (per tires de 7 ó 18 cm, respectivament) de tampó de rehidratació suplementat amb un 1,2% v/v de reactiu *De Streak* (GE Healthcare, Uppsala, Suècia), en un sarcòfag de ceràmica de la mida adequada, i col·locant la tira d'IPG (amb el gel cap avall) procurant una distribució homogènia del tampó sota la tira (figura 16A). Es va cobrir la tira amb

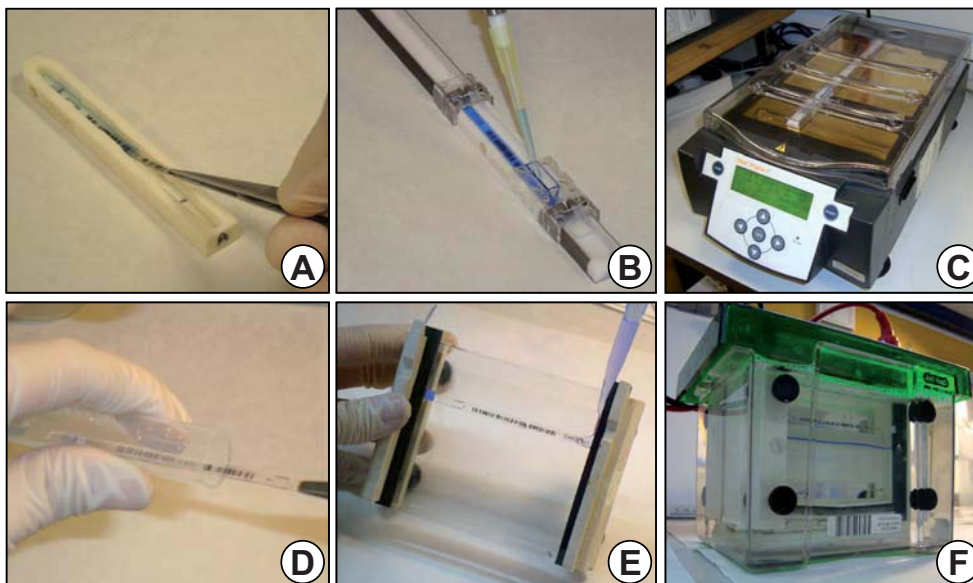


Figura 16. Procediment seguit per a l'electroforesi en dues dimensions. (A) Rehidratació de la tira d'IPG amb tampó de rehidratació (durant 10-15 h); (B) càrrega de la mostra sobre la tira rehidratada emprant un aplicador (mètode de *cup-loading*); (C) isoelectroenfocament; (D) equilibrat de les tires previ a la segona dimensió; (E) col·locació de la tira damunt un gel de poliacrilamida i addició de la solució de segellat; (F) electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS.

oli mineral i es va col·locar el sarcòfag a l'aparell d'isoelectroenfocament (Ettan IPGphorII, GE Healthcare, Uppsala, Suècia) a 20°C però sense aplicar-hi cap voltatge. L'endemà es va col·locar la tira rehidratada, amb el gel cap amunt, en un sarcòfag especial per poder carregar la mostra sobre la tira mitjançant un aplicador (mètode de *cup-loading*) (figura 16B). Es va cobrir la tira amb oli, es van col·locar els elèctrodes en els extrems de la tira en contacte amb la poliacrilamida i es va aplicar la mostra al càtode. Les proteïnes es van isoelectroenfocar (figura 16C) seguint el programa adequat depenent del tipus de mostra i la llargada de la tira

Tipus de mostra	Llargada de la tira (cm)	Pas	Voltatge (V)	Durada (h:min)	Volts-hora
LPL bovina comercial i	7	1	0-1000 (gradient)	2:00	-
LPL de rata		2	1000-5000 (gradient)	1:00	-
parcialment purificada		3	5000 (constant)	-	25000
LPL bovina comercial i	18	1	0-1000 (gradient)	2:00	-
LPL de rata		2	1000-5000 (gradient)	1:00	-
parcialment purificada		3	5000 (constant)	-	60000
Plasma de rata	7	1	0-300 (gradient)	0:30	-
		2	300 (constant)	4:00	-
		3	300-1000 (gradient)	1:00	-
		4	1000-2000 (gradient)	1:00	-
		5	2000-4000 (gradient)	1:00	-
		6	4000 (constant)	-	40000

Taula 3. Programes emprats per a l'isoelectroenfocament. En tots els casos l'isoelectroenfocament es va fer a 20°C i amb una intensitat de corrent màxima limitada a 50 µA/tira.

(vegeu taula 3). En acabar l'IEF la tira es va introduir en un tub de plàstic, col·locant el suport de plàstic de la tira sobre la paret del tub, i es va congelar a -80°C fins al moment de fer la segona dimensió. Abans d'aplicar la tira sobre el gel per a l' SDS-PAGE es va equilibrar durant 15 minuts (figura 16D) amb 2,5 ó 5 mL (per tires de 7 ó 18 cm, respectivament) de tampó d'equilibrat suplementat amb DTT (10 mg/mL). Si les tires eren emprades per a la posterior identificació de proteïnes, es va fer un segon pas d'equilibrat, també de 15 minuts, amb el mateix tampó suplementat amb iodoacetamida (25 mg/mL) en comptes de DTT. Aquest segon pas d'equilibrat no es va fer quan els gels eren emprats per a la immunodetecció de proteïnes per *western blot* (vegeu 3.6.4) per evitar possibles alteracions en l'epítip i en el reconeixement antigen-anticòs com a conseqüència de l'alquilació amb iodoacetamida. Després de l'equilibrat la tira es va col·locar damunt un gel de poliacrilamida al 9% p/v, i es va segellar amb solució de segellat (figura 16E). L' SDS-PAGE (figura 16F) es va dur a terme en les condicions descrites a l'apartat 3.6.1. En acabar l' SDS-PAGE, els gels es van tenyir amb plata (vegeu 3.6.3) o es van transferir les proteïnes a una membrana per a la immunodetecció específica de proteïnes per *western blot* (vegeu 3.6.4).

3.6.3. Tinció amb plata de proteïnes en gels de poliacrilamida

Breu descripció i fonament

Per a la visualització de proteïnes després de la separació electroforètica (vegeu 3.6.1 i 3.6.2) vam emprar una adaptació basada en Shevchenko i col. [200] del mètode de tinció amb plata descrit per Heukeshovn i col. [201], compatible amb l'anàlisi posterior de les proteïnes per espectrometria de masses. La tinció amb plata és un mètode àmpliament utilitzat per la seva sensibilitat ($\approx 1\text{ng prot.}$) [202]. L'aplicació de la tinció amb plata per a la visualització de proteïnes va ser inicialment descrita per Switzer i col. [203] i des d'aleshores s'han publicat desenes de variacions del mètode. La tinció es basa en l'afinitat de les proteïnes pel catió plata (Ag^+) i consta, principalment, dels següents passos: (i) fixació (immobilitza les proteïnes en el gel i permet eliminar compostos com el Tris, la glicina i detergents –com l' SDS– amb una elevada afinitat per la plata); (ii) sensibilització (permet millorar la sensibilitat de la tinció millorant la unió de la plata a les proteïnes o augmentant la velocitat de la reducció de la plata); (iii) tinció (el gel s'impregna amb nitrat de plata), (iv) revelat (consisteix en la reducció a plata metàl·lica dels ions de plata units a les proteïnes) i (v) aturada del revelat.

Nombrosos protocols empenen aldehyds en els processos de fixació i sensibilització. Considerant que aquests reactius impedeixen la recuperació de les proteïnes del gel, s'han desenvolupat diferents adaptacions per aconseguir protocols compatibles amb l'anàlisi posterior de les proteïnes.

Reactius

Les solucions emprades en la tinció es van preparar utilitzant aigua Milli-Q:

- Fixació (etanol 40% v/v; àcid acètic 10% v/v).

- Sensibilització (etanol 30% v/v; Na₂S₂O₃ 0,2% p/v; acetat sòdic 6,8% p/v)
- Tinció (AgNO₃ 0,25% p/v). Es prepara en el moment de fer servir i cal protegir-la de la llum.
- Revelat (Na₂CO₃ 2,5% p/v; formaldehid 0,0148% p/v –afegit just abans d'utilitzar la solució).
- Aturada (EDTA-Na₂·H₂O 1,46% p/v).

Procediment

En finalitzar l'electroforesi el gel es va col·locar en un recipient hermètic de vidre que contenia la solució de fixació i es va agitar suaument durant 30 minuts (el gel es va tenyir immediatament o fins a 24 h després, conservant-lo en solució de fixació a 4°C). Després de descartar la solució de fixació, es va afegir la solució de sensibilització, es va deixar durant 30 minuts en agitació suau i, havent descartat la solució de sensibilització, es van fer tres rentats de 5 minuts amb aigua Milli-Q. Seguidament, es va afegir la solució de tinció, es va agitar suaument durant 20 minuts, es va descartar la solució de tinció i es van fer dos rentats d'1 minut amb aigua Milli-Q. A continuació, es va afegir la solució de revelat (després d'afegir el formaldehid) i, en agitació suau, es va controlar visualment el revelat de les proteïnes del gel, en un pas de durada variable (1–5 minuts). Seguidament, es va descartar la solució de revelat, es va afegir la solució d'aturada i es va agitar suaument 10 minuts. Finalment, es va descartar la solució d'aturada i es van fer tres rentats de 5 minuts amb aigua Milli-Q. En acabar el procés de tinció el gel es va conservar en aigua Milli-Q a 4°C.

3.6.4. Immunodetecció de proteïnes per *western blot*

Breu descripció i fonament

El *western blot* és un mètode per a la detecció específica de proteïnes basat en l'especificitat entre un anticòs i el seu antigen. La detecció es fa sobre una membrana on s'han transferit les proteïnes després d'haver estat separades per electroforesi (vegeu 3.6.1 i 3.6.2). Habitualment, en la tècnica de *western blot* es combinen dos anticòssos: l'anticòs primari, que reconeix específicament la proteïna d'interès, i l'anticòs secundari, que reconeix al primari i fa possible la seva detecció. Un dels sistemes més emprats per a la detecció de l'anticòs secundari és la unió d'una peroxidasa a aquest anticòs. L'ús d'un substrat que, per l'acció de la peroxidasa, generi un producte luminiscent és el que permet detectar l'anticòs secundari (i, per extensió, la proteïna d'interès) mitjançant una pel·lícula fotogràfica. A més de revelar la presència de la proteïna d'interès, la intensitat del senyal obtingut és proporcional a l'abundància relativa de la proteïna a la mostra.

Reactius

- Tampó de transferència (glicina 192 mM, Tris 25 mM, metanol 10% v/v).
- Tampó TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 137 mM).

- Tampó de bloqueig (llet desnatada en pols –Central Lechera Asturiana, Corporación Alimentaria Peñasanta, Granda, Asturias– 5% p/v en tampó TBS).
- Substrat de la peroxidasa (*SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate* o *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate*, ambdós de Pierce, Rockford, IL, EUA).
- Anticossos (vegeu més avall).

Procediment

En acabar l'electroforesi les proteïnes es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa o de fluorur de polivinil emprant el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) o el sistema *X Cell Blot* d'Invitrogen (Paisley, Regne Unit), depenent de la proteïna que es volia detectar en cada cas (vegeu més avall). Primerament, es van equilibrar els components del sandvitx de transferència (gel, membrana, esponges i papers *Whatman*) en tampó de transferència durant 10 minuts. Seguidament, es va muntar el sandvitx col·locant els diferents components pel següent ordre (començant per l'extrem catòdic): esponja, paper *Whatman*, gel, membrana, paper *Whatman* i esponja, evitant la formació de bombolles entre els diferents elements del muntatge. La durada i el voltatge que es va aplicar a la transferència depenia del tipus de *western blot* (vegeu més avall). Després de la transferència es va incubar la membrana amb 100 mL de tampó de bloqueig en un bany a 37°C en agitació suau durant 1 h. Es va incubar la membrana amb l'anticòs primari (la concentració de l'anticòs en el tampó d'incubació varia entre els diferents *western blot*, vegeu més avall) a 4°C durant la nit. Després de la incubació amb l'anticòs primari es va rentar la membrana tres vegades amb tampó TBS contenint un 0,1% v/v de Tween 20, el primer rentat de 10 minuts i els altres dos de 5 minuts, en agitació vigorosa. Seguidament es van fer 3 rentats de 5 minuts amb tampó TBS. A continuació, es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari (la concentració de l'anticòs en el tampó d'incubació varia entre els diferents *western blot*, vegeu més avall) a temperatura ambient durant 2 h i es va tornar a rentar en les mateixes condicions. Finalment, es va incubar la membrana amb el substrat de la peroxidasa més adient per a cada tipus de *western blot* i l'abundància de la proteïna d'interès (vegeu més avall). Per a ambdós substrats es van barrejar els dos components del substrat en una relació 1:1 v/v i es va incubar la membrana 5 minuts protegida de la llum. Finalment, la luminiscència resultant es va detectar mitjançant una pel·lícula fotogràfica, que es va revelar en un aparell de revelat automàtic (FPM-100A, Fujifilm, Tokyo, Japó).

3.6.4.1 Western blot de lipoproteïna lipasa

Tipus de mostra: Plasma de rata, LPL parcialment purificada mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-*-Sepharose* de plasma postheparinic i d'homogenat de cor de rata (vegeu 3.5.2) i LPL bovina comercial (Sigma, Saint Louis, MO, EUA).

Concentració de poliacrilamida en el gel separador: 9% p/v.

Membrana i condicions de la transferència: Transferència (1 h, 100 V, amb casset de gel) a membrana de nitrocel·lulosa (*Hybond ECL*, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Regne Unit) amb el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA).

Anticòs primari:

- Anticòs monoclonal **5D2** (1:2000 v/v) obtingut en ratolí contra LPL bovina (cedit pel Dr. J. D. Brunzell, Universitat de Washington, Seattle, EUA).
- Anticòs policlonal **P66** (1:4000 v/v) obtingut en gallina emprant LPL bovina com a immunogen (cedit pel Dr. T. Olivecrona, Universitat d'Umeå, Umeå, Suècia).
- Anticòs policlonal **GB1** (1:2000 v/v) obtingut en gallina emprant un pèptid sintètic corresponent als aminoàcids 22-41 de l'LPL de rata com a immunogen (desenvolupat en el nostre laboratori en col·laboració amb l'empresa Eurogentec, Seraing, Bèlgica).

Anticòs secundari:

- Quan es va emprar 5D2 com a anticòs primari es va utilitzar un anticòs secundari anti-IgG de ratolí obtingut en cabra (1:10000 v/v; Chemicon, Temecula, CA, EUA).
- Quan es va emprar P66 ó GB1 com a anticòs primari es va utilitzar un anticòs secundari anti-IgY de gallina obtingut en conill (1:10000 v/v; Chemicon, Temecula, CA, EUA).

Es va utilitzar tampó de bloqueig suplementat amb Tween 20 a una concentració final de 0,05% v/v com a tampó d'incubació per a tots els anticossos.

Revelat: *SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate* (Pierce, Rockford, IL, EUA)

3.6.4.2 Western blot de nitrotirosina

Tipus de mostra: Plasma de rata, LPL parcialment purificada mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose* d'homogenat de cor de rata (vegeu 3.5.2) i LPL bovina comercial (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) tractada *in vitro* amb peroxinitrit (vegeu 3.7.3)

Concentració de poliacrilamida en el gel separador: 9% p/v.

Membrana i condicions de la transferència: Transferència (1 h 30 minuts, 25 V, a 4°C) a membrana de nitrocel·lulosa (*Hybond ECL*, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Regne Unit) amb el sistema *X Cell Blot* d'Invitrogen (Paisley, Regne Unit).

Anticòs primari: Anticòs anti-nitrotirosina obtingut en conill (1:300 v/v; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA).

Anticòs secundari: Anticòs anti-IgG de conill obtingut en porc (1:10000 v/v; Dako, Glostrup, Dinamarca).

Les incubacions amb els anticossos es van fer en tampó de bloqueig.

Revelat: SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford, IL, EUA)

3.6.4.3 Western blot d'òxid nítric sintasa induïble

Tipus de mostra: Homogenats de teixit en tampó (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; àcid etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacètic (EGTA) 0,1 mM; EDTA 0,1 mM; β -mercaptoetanol 0,1 mM; Tritó x-100 1% v/v; inhibidors de proteases –*Pefabloc SC* 2 mM i *Complete Mini* a la concentració recomanada pel fabricant, ambdós de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya) emprant una relació entre pes del teixit i volum de tampó (expressat en grams i mL, respectivament) d'1:5. L'homogeneïtzació es va dur a terme mitjançant un disruptor de tipus politró (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen, Alemanya) a màxima potència mantenint el tub en gel. Seguidament, la mostra es va centrifugar (16000 g, 10 minuts, 4°C) i es va recollir i congelar el sobrenedant a -80°C.

Concentració de poliacrilamida en el gel separador: 7,5% p/v.

Membrana i condicions de la transferència: Transferència (2 h, 100 V, amb casset de gel i col·locant la cubeta en un recipient amb gel) a membrana de fluorur de polivinil (*Immobilon P*, Millipore, Bedford, MA, EUA) amb el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA).

Anticòs primari: Anticòs anti-iNOS obtingut en conill (1:500 v/v; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).

Anticòs secundari: Anticòs anti-IgG de conill obtingut en porc (1:10000 v/v; Dako, Glostrup, Dinamarca).

Les incubacions amb els anticossos es van fer en tampó de bloqueig.

Revelat: SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, Rockford, IL, EUA).

3.7. APROXIMACIONS A L'ANÀLISI DE MODIFICACIONS POSTTRADUCCIONALS

3.7.1. Defosforilació *in vitro* de proteïnes

Breu descripció i fonament

La fosforilació és un dels principals mecanismes de regulació de les proteïnes. En proteïnes d'organismes eucariotes la fosforilació es dona en residus de serina, treonina i tirosina. El caràcter reversible de la fosforilació és responsable de l'activació o inactivació d'un gran nombre d'enzims i receptors i participa en nombroses vies de transducció de senyal.

Amb l'objectiu d'estudiar la influència en el punt isoelèctric de l'LPL d'una possible fosforilació, vam tractar les mostres amb fosfatasa alcalina, un enzim àmpliament utilitzat per defosforilar àcids nucleics i proteïnes.

Reactius

- Tampó d'incubació (NH_4HCO_3 50 mM pH 7,8).
- Fosfatasa alcalina intestinal de vedella (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya).
- Barreja estàndard de pèptids fosforilats (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA).

Procediment

Operacions prèvies

L'LPL parcialment purificada per cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose* (vegeu 3.5.2) (5 μg de proteïna) es va precipitar amb TCA seguint el protocol descrit a *operacions prèvies* de l'apartat 3.6.2.

Tractament de les mostres

La proteïna precipitada es va reconstituir en 40 μL de tampó d'incubació, es va sonicar en gel alternant –durant un minut– intervals de 5 segons de sonicació (amplitud 30%, sonicador UPH100, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemanya) i intervals de 5 segons de repòs, i s'incubà 1 h a 37°C amb fosfatasa alcalina intestinal de vedella. Després del tractament, la mostra es va analitzar per *western blot* anti-LPL (vegeu 3.6.4.1). Paral·lelament, es va tractar una barreja estàndard de pèptids fosforilats en les mateixes condicions per comprovar l'eficiència del procés de defosforilació.

3.7.2. Deglicosilació *in vitro* de proteïnes

Breu descripció i fonament

La glicosilació proteica consisteix en l'addició de carbohidrats a una proteïna i forma part del procés de síntesi i maduració normal de nombroses proteïnes de secreció i de membrana. El procés de glicosilació es dona a nivell co- i posttraduccional i, depenent del lloc d'unió dels sucres a la proteïna, es diferencien entre N-glicosilacions (quan l'oligosacàrid s'uneix a una asparagina) i O-glicosilacions (quan la unió és sobre una serina o treonina). Des del punt de vista funcional, la glicosilació pot influir en el plegament de les proteïnes, protegir proteïnes de la degradació o participar en processos de reconeixement i comunicació cel·lular; mentre que alteracions en la glicosilació de les proteïnes s'han associat amb patologies com el càncer o les malalties autoimmunes [204].

Per estudiar la influència dels carbohidrats en el punt isoelèctric de l'LPL vam deglicosilar la proteïna. La PNGasa F és una glicosidasa que permet eliminar completament les N-glicosilacions [205] mentre que per eliminar les

O-glicosilacions cal combinar diverses exoglicosidases, que deixen una única Gal- β (1-3)-GalNAc unida al residu de serina o treonina i que, finalment, pot ser eliminada per acció de l'endo- α -N-acetilgalactosaminidasa. Així, malgrat que en l'LPL de rata només s'han descrit N-glicosilacions [25], vam emprar un kit comercial que contenia els enzims necessaris per eliminar les N-glicosilacions, les O-glicosilacions senzilles i algunes O-glicosilacions complexes.

Reactius

- Kit de deglicosilació de proteïnes (E-DEGLY, Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Components del kit:
 - Tampó d'incubació (composició no descrita pel fabricant).
 - Tampó de desnaturalització (conté SDS 2% p/v i β -mercaptoetanol 1 M).
 - Solució de Tritó x-100 al 15% v/v.
 - Enzims (PNGasa F; O-glicosidasa; α -2(3,6,8,9) neuraminidasa; β -1,4-galactosidasa i β -N-acetilglucosaminidasa).

Procediment

Operacions prèvies

L'LPL parcialment purificada per cromatografia d'afinitat a heparina (vegeu 3.5.2) (5 μ g de proteïna) es va precipitar amb TCA seguint el protocol descrit a *operacions prèvies* de l'apartat 3.6.2.

Tractament de les mostres

D'acord amb les instruccions del fabricant, la proteïna precipitada es va reconstituir afegint 30 μ L d'aigua Milli-Q, 10 μ L de tampó d'incubació i 2,5 μ L de tampó de desnaturalització. Es va bullir 5 minuts i, seguidament, es va sonicar alternant –durant un minut– intervals de 5 segons de sonicació (amplitud 30%, sonicador UPH100, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemanya) i intervals de 5 segons de repòs. Es van afegir 2,5 μ L d'una solució de Tritó x-100 al 15% v/v, 1 μ L de cadascun dels enzims (PNGasa F; O-glicosidasa; α -2(3,6,8,9) neuraminidasa; β -1,4-galactosidasa i β -N-acetilglucosaminidasa) i s'incubà 3h a 37°C en agitació suau. Després del tractament la mostra es va analitzar per *western blot* anti-LPL (vegeu 3.6.4.1).

3.7.3. Nitració *in vitro* de pèptids i proteïnes amb peroxinitrit

Breu descripció i fonament

L'anió peroxinitrit és una molècula oxidant amb una vida mitjana curta que es genera per la reacció de l'òxid nítric (NO) amb l'anió superòxid (O_2^-). El peroxinitrit pertany al grup d'espècies reactives del nitrogen (RNS), es genera *in vivo* i pot reaccionar amb una àmplia varietat de biomolècules com ara proteïnes, lípids i àcids nucleics. En el cas de les proteïnes, el peroxinitrit pot reaccionar amb residus

de tirosina, cisteïna, metionina o triptòfan [206], si bé les modificacions més estudiades han estat la nitració de tirosines (per la seva estabilitat i possible ús com a marcador de la interacció de proteïnes amb RNS) i la nitrosilació de cisteïnes que, per la seva reversibilitat, s'ha proposat com un nou paradigma en els processos de transducció de senyal i en la regulació de la funció de proteïnes [169].

El peroxinitrit s'ha emprat en nombrosos estudis per induir la nitració de pèptids i proteïnes *in vitro* [207,208]. En aquest estudi es va emprar peroxinitrit sintetitzat d'acord amb el mètode descrit per Uppu i Pryor [209], en el laboratori del Dr. A. Messeguer (Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona, CSIC, Barcelona).

Reactius

- Peroxinitrit 0,4 M en NaOH 0,5-1 M.
- NaOH 3 mM.
- Tris-HCl 0,5 M pH 7,4.

Procediment

Operacions prèvies

El peroxinitrit es conservà a -80°C en NaOH 0,5-1 M per optimitzar-ne l'estabilitat. No obstant, la lenta descomposició del peroxinitrit obligà a determinar-ne la concentració mesurant l'absorbància a 302 nm (ϵ 1670 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) [210] abans d'emprar-lo en qualsevol assaig de nitració.

Tractament de les mostres

Es va diluir el peroxinitrit a la concentració desitjada en NaOH 3 mM just abans d'utilitzar-lo en l'assaig de nitració i les mostres es van diluir en tampó Tris-HCl 0,5 M pH 7,4. El peroxinitrit i la mostra es van barrejar en proporció 1:4 v/v afegint el peroxinitrit amb una xeringa *Hamilton* sobre la mostra en agitació amb vòrtex. L'anàlisi posterior dels pèptids i proteïnes nitrades es va fer per *western blot* anti-nitrotirosina (vegeu 3.6.4.2) o per cromatografia líquida capil·lar acoblada a espectrometria de masses en tàndem (vegeu 3.8.3).

3.8. ANÀLISI I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES PER ESPECTROMETRIA DE MASSES

Una estratègia habitual per a l'anàlisi i la identificació d'una mescla complexa de proteïnes consisteix en la separació inicial de les proteïnes mitjançant electroforesi en una o dues dimensions, la digestió de les proteïnes d'interès en el gel mitjançant una endoproteasa específica i l'anàlisi posterior per espectrometria de masses dels pèptids generats. L'espectrometria de masses és una tècnica analítica que permet produir ions en fase gasosa a partir de molècules, orgàniques o inorgàniques, classificar-les en funció de la seva relació massa/càrrega (m/z) i mesurar la seva intensitat. L'aplicació d'aquesta tècnica a l'estudi de pèptids i proteïnes permet

determinar-ne el pes molecular, la seqüència aminoacídica i l'abundància. Els espectròmetres de masses consten de tres mòduls: una font d'ions, en què la mostra és convertida en ions en fase gasosa; un analitzador, que permet separar els ions segons la seva relació massa/càrrega; i un detector, que genera un senyal elèctric proporcional al nombre d'ions incidents.

Entre les fonts d'ionització emprades en proteòmica cal destacar les tècniques d'ionització suaus, com la ionització per electroesprai (ESI) [211] o la ionització/desorció per làser assistida per matriu (MALDI) [212,213], que, sorgides a finals dels 80, van possibilitar la ionització d'anàlits no volàtils i d'elevat pes molecular, com els pèptids i les proteïnes, sense provocar-ne una fragmentació significativa. Pel que fa als analitzadors, existeixen diversos tipus i poden classificar-se en quatre grups: analitzadors de sectors (elèctrics i/o magnètics), de quadrupol, de temps de vol (TOF) o d'atrapament d'ions (analitzadors de ressonància ciclotrònica, trampes iòniques -IT- i Orbitrap). En aquest estudi s'ha emprat una font d'ionització MALDI combinada amb un analitzador de temps de vol per a la identificació de proteïnes per mapatge peptídic (vegeu 3.8.2) i una font d'ionització per electroesprai acoblada a un analitzador de trampa iònica per a la seqüenciació de pèptids (vegeu 3.8.3).

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

3.8.1. Digestió de proteïnes en gel

Breu descripció i fonament

El primer pas per a la identificació i l'anàlisi de proteïnes separades en gels de poliacrilamida és la digestió *in situ* de les proteïnes. Treballar amb pèptids presenta diversos avantatges respecte a fer-ho amb proteïnes com són una major precisió en la determinació de la massa i en la localització de les modificacions de les proteïnes.

El procediment habitual per a la digestió de proteïnes en els gels consisteix en retallar la taca o banda d'interès i incubar-la amb una endoproteasa específica. La tripsina, que talla per l'extrem carboxil dels residus de lisina i arginina, és la proteasa emprada en la majoria d'estudis ja que presenta una alta eficiència de tall i, per la freqüència de lisines i arginines que trobem en la majoria de proteïnes, permet obtenir pèptids d'una mida adequada per a l'anàlisi per espectrometria de masses. A més, en l'anàlisi per espectrometria de masses es treballa amb ions i l'ús de tripsina garanteix la presència d'un aminoàcid bàsic com la lisina o l'arginina a l'extrem C-terminal del pèptid tríptic. Aquests tipus de pèptids donen espectres de fragmentació molt informatius i més fàcils d'interpretar que els obtinguts quan s'empen altres proteases.

En aquest treball, per a la digestió de proteïnes es va utilitzar una tripsina modificada, amb les lisines metilades, per limitar l'autòlisi de l'enzim i minimitzar

la interferència que aportarien els pèptids tríptics de la pròpia tripsina en la interpretació dels espectres de masses.

Reactius

- Tripsina (Promega, Madison, WI, EUA).
- Solució d'acetonitril (ACN)/aigua 1:1 v/v; TFA 0,25% v/v.
- Solució d'ACN/aigua 1:1 v/v; TFA 0,1% v/v.
- Tampó bicarbonat (NH_4HCO_3 20 mM, pH 7,8).

Procediment

Operacions prèvies

Les taques o bandes d'interès, obtingudes per tinció amb plata (vegeu 3.6.3) després de la separació electroforètica en una o dues dimensions (vegeu 3.6.1 i 3.6.2), es van retallar amb bisturí en una campana de flux laminar, es van trossejar i es van introduir en diferents pouets d'una placa de digestió (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln, Alemanya).

Processament de les mostres

Tot el procés es va dur a terme utilitzant un digestor automàtic Digest ProMS (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln, Alemanya). En el digestor, les petites peces de gel contingudes als pous de la placa de digestió es van rentar amb tampó bicarbonat i es van deshidratar rentant-les amb ACN. A continuació, les proteïnes es van reduir amb DTT 10 mM en tampó bicarbonat (50 minuts a 25°C) i es van carbamidometilar les cisteïnes reduïdes amb iodoacetamida 55 mM en tampó bicarbonat (30 minuts a 25°C). Novament, el gel es va rentar amb tampó bicarbonat i es va deshidratar rentant-lo amb ACN. Seguidament, es va incubar 8 h a 37°C amb tripsina, també en tampó bicarbonat, i els pèptids tríptics generats es van extreure amb una solució d'ACN/aigua 1:1 v/v; TFA 0,25% v/v i es van dipositar a una placa col·lectora (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln, Alemanya). Seguidament, els pèptids extrets es van transferir manualment a tubs *Eppendorf* i es van assecar en un evaporador centrífug (SPD121P, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA). Finalment, es van redissoldre els pèptids en 5 μL d'ACN/aigua 1:1 v/v; TFA 0,1% v/v i es van conservar a -80°C.

3.8.2. Identificació de proteïnes per mapatge peptídic

Breu descripció i fonament

La determinació precisa de les masses dels pèptids obtinguts després de digerir en gel la proteïna d'interès es pot utilitzar per identificar una proteïna per mapatge peptídic (PMF) comparant la informació obtinguda experimentalment amb els pèptids teòrics que es generen en la digestió *in silico* de les proteïnes d'una base de

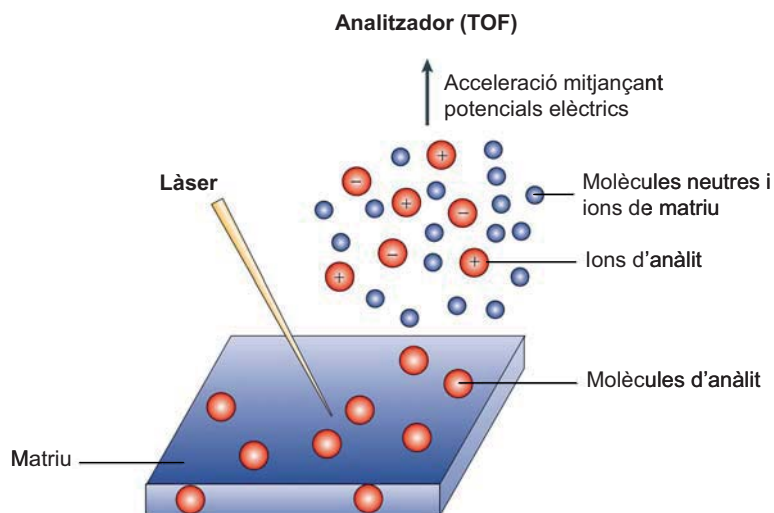


Figura 17. Representació del procés d'ionització amb una font d'ionització/desorció per làser assistida per matriu (MALDI). L'anàlit es cristal·litza amb matriu. La irradiació amb làser sublima molècules de la matriu i transfereix les molècules d'anàlit a la fase gasosa. D'aquesta manera es generen ions d'anàlit que són accelerats per potencials elèctrics i introduïts a l'analitzador. (Adaptat de Steen i Mann [214].)

dades. La comparació entre les dades experimentals i les teòriques genera una llista de possibles proteïnes candidates ordenades segons el nivell d'identitat trobat.

Per a la determinació de la massa dels pèptids tríptics s'utilitzà un espectròmetre de masses MALDI-TOF Voyager DE PRO (Applied Biosystems, Barcelona) treballant en mode reflectró positiu. Aquest equip combina una font d'ionització MALDI (ionització/desorció per làser assistida per matriu) amb un analitzador de temps de vol (TOF). Les fonts d'ions de tipus MALDI utilitzen polsos làser per a la desorció i ionització de la mostra que ha estat prèviament cristal·litzada amb matriu (figura 17). La matriu permet dispersar les molècules d'anàlit i absorbir l'energia de la radiació per produir ions d'anàlit mitjançant reaccions fotoquímiques. A partir del temps que triguen els ions d'anàlit en recórrer el tub de vol i arribar al detector es pot deduir la seva relació massa/càrrega (m/z).

Reactius

- Matriu (3 mg/mL àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic –Bruker Daltonics, Bremen, Alemanya– en ACN/aigua 2:1 v/v; TFA 0,1% v/v).
- Barreges estàndard de pèptids per calibració externa (*Calibration Mixture 1* i *Calibration Mixture 2*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Procediment

Operacions prèvies

Es va preparar la barreja de pèptids emprada en la calibració externa combinant 148 μL de matriu i 1 μL de cada barreja estàndard de pèptids comercial

(concentració final dels pèptids a la barreja 200-500 fmol/ μ L). La solució resultant es va aliquotar i congelar a -80°C .

Anàlisi de les mostres

Per a l'anàlisi de les mostres es van utilitzar plaques de tefló per MALDI de 96 x 2 pous (Applied Biosystems, Barcelona). Es van aplicar inicialment 0,5 μ L de l'extracte peptídic (vegeu 3.8.1) i a continuació 0,5 μ L de matriu. La barreja es va deixar assecat a temperatura ambient. L'anàlisi es va realitzar en mode automàtic acumulant 4 espectres (obtinguts cadascun amb 150 trets) en el rang m/z de 750 a 5000. Els espectres es van calibrar externament utilitzant una barreja estàndard de 6 pèptids: des-Arg1-bradiquinina (Mr 904.46), Glu1-fibrinopèptid B (Mr 1570.68), angiotensina-1 (Mr 1296.69), ACTH 1-17 (Mr 2093.09), ACTH 18-39 (Mr 2465.20), ACTH 7-38 (Mr 3657.93) i, quan es detectaven ions corresponents a productes d'autòlisi de la tripsina (m/z 842.51, 1045.56 i 2111.10) a la intensitat adequada, es feia una calibració interna de l'espectre.

Finalment, en l'anàlisi per MALDI-TOF es va obtenir un espectre de masses, del qual es va extreure un llistat de pics. Aquest llistat de pics va ser utilitzat per identificar les proteïnes presents a la mostra mitjançant una cerca en bases de dades (vegeu 3.8.4.1).

3.8.3. Seqüenciació de pèptids per cromatografia líquida capil·lar acoblada a espectrometria de masses en tàndem en trampa iònica

Breu descripció i fonament

Per obtenir informació de seqüència dels pèptids analitzats cal emprar el que es coneix com a espectrometria de masses en tàndem (MS/MS). En aquesta tècnica, un ió generat a la font d'ions és aïllat (és l'anomenat ió precursor) i sotmès a processos de col·lisió que indueixen la seva fragmentació. La informació estructural del pèptid s'obté amb l'anàlisi dels ions fragment produïts. Aquest procediment es pot dur a terme separant les operacions de selecció de l'ió precursor i d'anàlisi dels ions fragment en l'espai o en el temps. Quan l'espectrometria de masses en tàndem es fa separant aquestes operacions en l'espai, cal emprar dos analitzadors acoblats en sèrie. En aquest cas el primer analitzador fa la funció de font selectiva d'ions per al segon. Així, l'ió precursor és seleccionat en el primer analitzador, es fragmenta mitjançant processos de col·lisió en una cambra de col·lisió disposada entre els dos analitzadors i els ions fragment són analitzats en el segon analitzador. Per contra, quan l'MS/MS es fa separada en el temps s'utilitza un únic analitzador on té lloc, de manera seqüencial, la selecció de l'ió precursor, la seva fragmentació i l'anàlisi dels ions fragment. Aquest és el funcionament de les trampes iòniques on: (i) s'aïlla l'ió precursor mitjançant l'aplicació d'un voltatge que permet la sortida de tots els ions excepte l'ió d'interès, (ii) s'aplica un voltatge d'excitació que fa que es produeixin col·lisions entre l'ió precursor i els àtoms d'un gas inert, habitualment heli, present a l'interior de la trampa induint la fragmentació de l'ió precursor i (iii) s'analitzen els ions fragment generats.

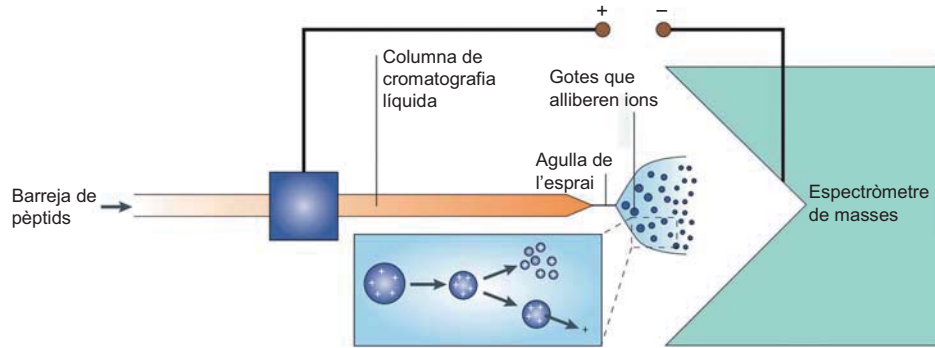


Figura 18. Representació del procés d'ionització amb electroesprai (ESI).

L'anàlit en solució entra a la font d'ionització mitjançant un tub capil·lar o una agulla metàl·lica i és sotmès a un alt potencial elèctric. Aquestes condicions provoquen la dispersió del líquid que conté els pèptids i es generen gotes carregades. El dissolvent d'aquestes gotes s'evapora i, en conseqüència, la densitat de càrrega de la gota augmenta. Els ions desolvatats es generen per la desorció dels ions d'anàlit de la superfície de la gota com a conseqüència del camp elèctric i/o per la formació de gotes molt petites degut a la repetida fissió de les gotes fins que cada gota conté, de mitjana, només un ió d'anàlit (ampliat en la figura). Aquests ions entren a l'analitzador per un sistema de buit. (Adaptat de Steen i Mann [214].)

Per a l'anàlisi MS/MS els pèptids es van injectar en una columna capil·lar de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) acoblada en línia a l'espectròmetre de masses. Els pèptids es van eluir emprant un gradient creixent de dissolvent orgànic, de manera que els pèptids eluïen per ordre creixent d'hidrofobicitat. Els pèptids, a mesura que eluïen de la columna, eren ionitzats mitjançant una font d'ions de tipus electroesprai (ESI) (figura 18) i els ions generats entraven a l'espectròmetre de masses, en el nostre cas una trampa iònica lineal (LTO, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA), per a l'anàlisi MS/MS descrit anteriorment. L'ESI és una tècnica que es caracteritza per la producció d'ions amb múltiples càrregues, això suposa que la relació m/z que presenten els pèptids és una fracció del seu pes molecular i , d'aquesta manera, fa detectables ions amb un pes molecular molt superior al rang de detecció dels analitzadors convencionals.

El patró de fragmentació d'un pèptid analitzat per MS/MS depèn de l'energia de col·lisió, de la pressió i el tipus de gas de col·lisió i de la càrrega del pèptid. En l'anàlisi per MS/MS els pèptids es poden fragmentar per qualsevol dels enllaços de l'esquelet peptídic generant diferents tipus de fragments. D'acord amb la nomenclatura proposada inicialment per Roepstorff i Fohlman [215] i posteriorment modificada per Biemann [216], s'anomenen ions fragment de tipus a , b i c a aquells que contenen l'extrem N-terminal mentre que els de tipus x , y i z contenen l'extrem C-terminal. Per anomenar els diferents ions fragment s'utilitza la lletra corresponent amb un subíndex que indica el nombre d'aminoàcids que conté (figura 19). La fragmentació a les trampes iòniques es produeix mitjançant col·lisions de baixa energia que habitualment indueixen el trencament dels enllaços més febles de l'esquelet peptídic: els enllaços amida. D'aquesta manera els ions majoritaris són els de tipus b , si la càrrega queda al fragment que conté l'N-terminal, i els de tipus y , si la càrrega queda al fragment que conté el

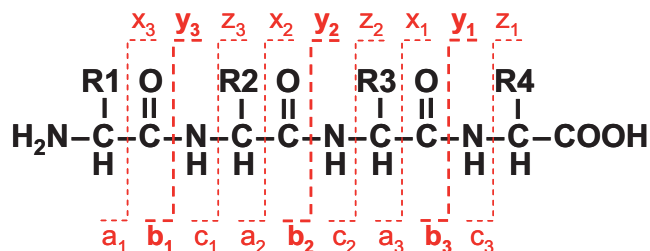


Figura 19. Nomenclatura dels ions fragment obtinguts per MS/MS. En els experiments en què s'utilitza una energia baixa per induir les col·lisions, com en el cas dels analitzadors de quadrupol o les trapes iòniques, els ions *b* i *y* predominen en l'espectre de masses.

C-terminal. Determinant la diferència de massa entre els ions fragment de l'espectre MS/MS es pot deduir la seqüència del pèptid.

En aquest treball s'ha emprat aquesta metodologia per seqüenciar pèptids i per al mapatge de modificacions posttraduccional.

Reactius

- Fase de càrrega (àcid fòrmic 1% v/v).
- Solució A (àcid fòrmic 0,1% v/v).
- Solució B (àcid fòrmic 0,1% v/v en ACN).

Procediment

Operacions prèvies

L'extracte peptídic obtingut en la digestió de les proteïnes en el gel (vegeu 3.8.1) es va diluir inicialment fins a 40 µL amb fase de càrrega.

Anàlisi de les mostres

La mostra es va aplicar inicialment amb un flux de 20 µL/min a un cartutx de preconcentració C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) de 0,5 cm de llargada i 300 µm de diàmetre intern per concentrar i dessalar la mostra. Com a columna analítica es va emprar una columna C18 de 10 cm de llargada i 150 µm de diàmetre intern (Vydac, Grace, Deerfield, IL, EUA). La separació es va dur a terme amb un flux d'1 µL/min en un gradient lineal de 30 minuts de 0 a 40% v/v de solució B. El sistema de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, Agilent 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) estava format per una bomba capil·lar, una bomba binària, un microinjector automàtic termostatitzat i una vàlvula electromecànica de 10 ports (figures 20 i 21).

Per a l'anàlisi per espectrometria de masses en tàndem dels pèptids eluïts, l'equip d'HPLC estava acoblat en línia a una trampa iònica lineal (LTQ, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) equipada amb una font d'ionització de tipus electroesprai (ESI). Per a la ionització es va aplicar un voltatge de 2 kV i es va treballar amb l'analitzador en mode positiu. Vam definir dos tipus d'anàlisis espectromètriques en funció de l'objectiu: (i) per a la seqüenciació parcial de l'LPL,

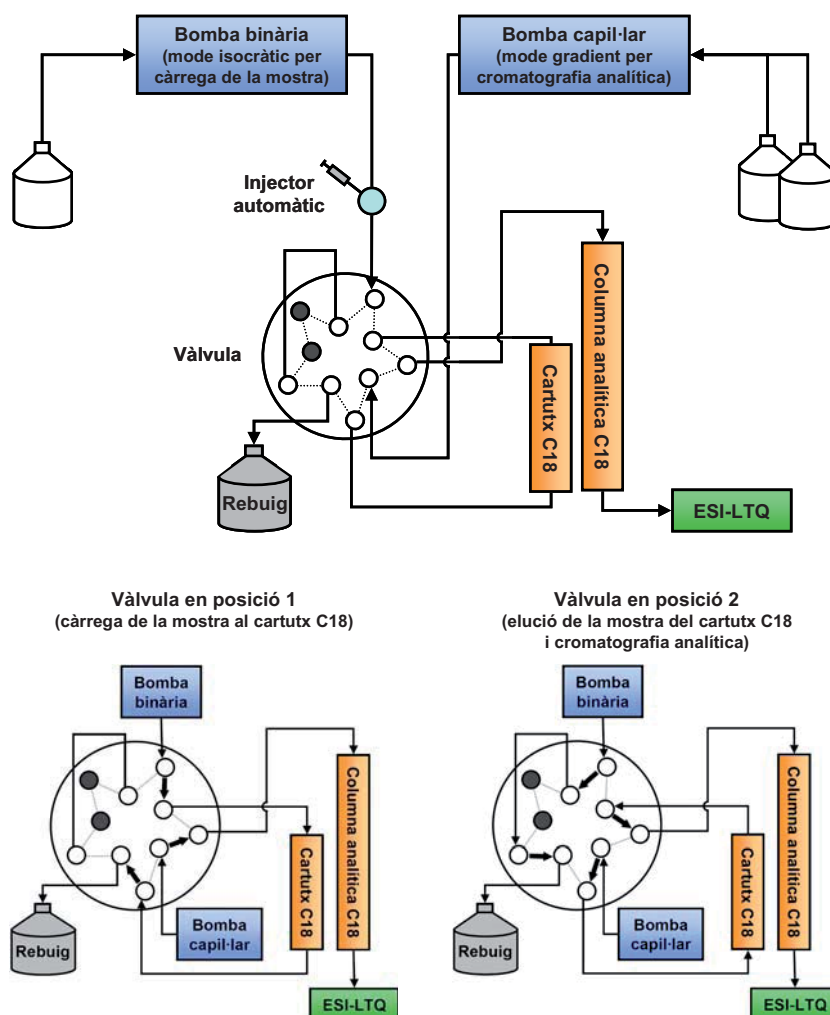


Figura 20. Representació esquemàtica del sistema de cromatografia líquida capil·lar acoblat a l'espectròmetre de masses. Els pèptids de la mostra són eluïts de manera seqüencial per ordre creixent d'hidrofobicitat. A la part inferior de la figura es mostren les dues posicions de la vàlvula electromecànica de 10 ports per a la càrrega de la mostra (posició 1) o per a la separació analítica (posició 2). Els ports de la vàlvula que no es van fer servir es mostren ombrejats.

es va programar l'equip en mode automàtic per obtenir un espectre de rastreig complet (en un rang d' m/z 400-2000) i 8 espectres de fragmentació dels pèptids més abundants en cada cicle (aplicant una exclusió dinàmica d'1 –amb una finestra de temps d'exclusió de 5 minuts– per limitar la fragmentació redundant d'ions precursors) i (ii) per a la cerca de nitrotirosines en seqüències específiques, l'equip es va programar per obtenir espectres de fragmentació seqüencials sobre una llista predefinida d'ions perquè aquest sistema d'escaneig ofereix una sensibilitat més alta [217].

Finalment, en l'anàlisi per LC-MS/MS per cada mostra es va obtenir un conjunt d'espectres de masses al llarg del temps de retenció de la cromatografia que va ser utilitzat per a la seqüenciació de pèptids i el mapatge de modificacions posttraduccional mitjançant una cerca en bases de dades (vegeu 3.8.4.2).

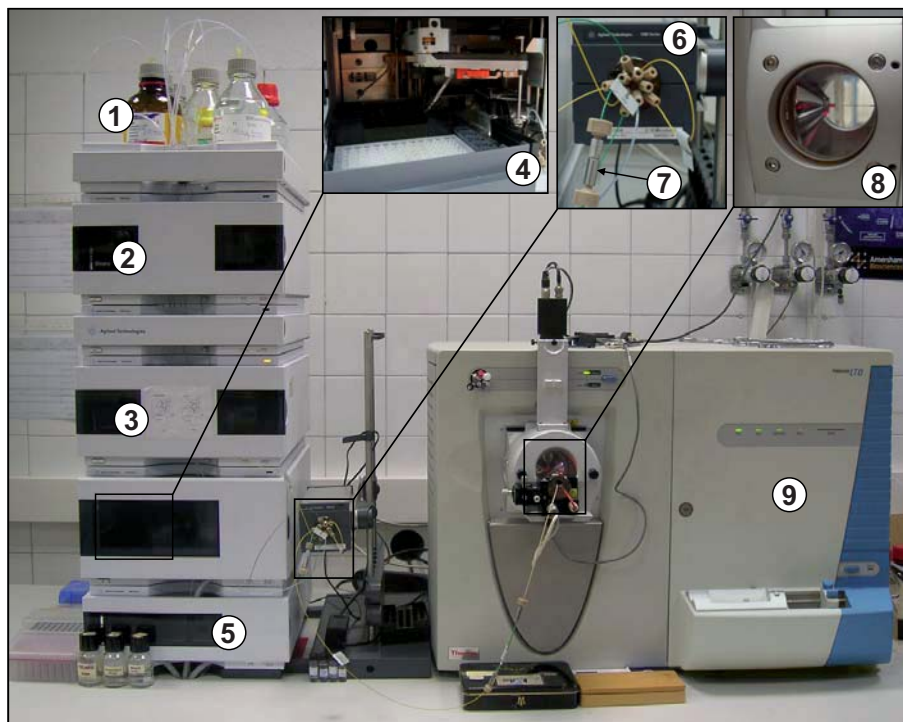


Figura 21. Sistema de cromatografia líquida i espectròmetre de masses emprats en l'estudi. (1) Solucions A i B, (2) bomba binària, (3) bomba capil·lar, (4) injector automàtic, (5) termòstat de l'injector automàtic, (6) vàlvula electromecànica de 10 ports, (7) cartutx de preconcentració, (8) electroesprai (l'ampliació mostra una visió lateral); (9) trampa iònica lineal (LTQ).

3.8.4. Cerca en bases de dades

3.8.4.1. Cerca en base de dades per a la identificació de proteïnes per mapatge peptídic

Per a la identificació de proteïnes per PMF els espectres obtinguts en l'anàlisi per MALDI-TOF (vegeu 3.8.2) es van tractar ajustant la línia de base, eliminant el soroll de fons i "desisotopant" els pics per obtenir un llistat d'ions corresponents als ions "monoisotòpics" dels pèptids detectats. Posteriorment, aquest llistat de pèptids es va emprar per fer les cerques mitjançant l'aplicatiu MS-Tag del programa Protein Prospector (Universitat de Califòrnia, San Francisco, CA, EUA) utilitzant la base de dades UniProtKB/Swiss-Prot (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Regne Unit) emprant els mamífers com a grup taxonòmic. Els paràmetres establerts a les cerques eren: tripsina com a enzim de digestió, fins a 2 talls omesos per la tripsina, carbamidometilació de cisteïna (+57 Da), oxidació de metionina (+16 Da), un nombre mínim de 3 pèptids assignats a cada proteïna identificada i una tolerància màxima d'error de 50 ppm. Els resultats obtinguts es van valorar tenint en compte la puntuació associada que genera el programa, així com el nombre i la intensitat dels pics en l'espectre.

3.8.4.2. Cerca en base de dades per a la seqüenciació i identificació de proteïnes

Per a la seqüenciació i identificació de proteïnes a partir dels espectres de fragmentació obtinguts en l'anàlisi per LC-MS/MS (vegeu 3.8.3) es va utilitzar el programa SEQUEST (Bioworks v3.3, ThermoFisher, San Jose, CA, EUA) utilitzant la base de dades UniProtKB/Swiss-Prot (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Regne Unit) emprant els mamífers (sense incloure humans ni rosegadors) o els rosegadors com a grup taxonòmic. Paral·lelament, per a la cerca de possibles canvis puntuals en la seqüència de l'LPL de rata, vam construir una base de dades de rosegadors que contenia 9479 entrades addicionals que cobrien totes les combinacions possibles de canvi d'un sol aminoàcid en la seqüència de l'LPL de rata. Per a les cerques es van definir els següents paràmetres: 2 Da de tolerància màxima de massa per als ions precursors, 0,8 Da de tolerància màxima de massa per als ions fragment, com a modificació estàtica es va establir la carbamidometilació de cisteïna (+57 Da) i com a modificacions dinàmiques l'oxidació de metionina (+16 Da), la metilació (+14 Da), dimetilació (+28 Da) i acetilació (+ 42 Da) de lisines, i la nitració de tirosines (+45 Da). La cerca es va fer: (i) escollint la tripsina com a enzim de digestió i fins a 2 talls omesos, o bé, (ii) sense definir cap enzim de digestió per a la detecció de pèptids no triptics.

3.8.5. Seqüenciació *de novo*

Per a la cerca de possibles modificacions en la seqüència de l'LPL els espectres obtinguts en l'anàlisi per LC-MS/MS (vegeu 3.8.3) es van analitzar amb el programa PEAKS Studio 4.5 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canadà) per la seqüenciació *de novo* de pèptids a partir dels espectres MS/MS obtinguts.

4. INFORME SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE DE LES PUBLICACIONS

Els sotassignats, com a directors de la Tesi Doctoral d'Albert Casanovas, titulada "Estudi de la lipoproteïna lipasa mitjançant eines proteòmiques. Possible participació de l'òxid nítric en la seva regulació".

INFORMEN

Que el factor d'impacte de les revistes en les que s'han publicat els articles que configuren l'esmentada Tesi Doctoral, són:

1.- A.Casanovas, N.Parramon, F.de la Cruz, O.Andrés, J.Terencio, MD.López-Tejero M.Llobera. *Retroperitoneal white adipose tissue lipoprotein lipase activity is rapidly down-regulated in response to acute immobilization stress.*

Journal of Lipid Research 48, 863-868, 2007.

Factor d'impacte: 4,409

Albert Casanovas ha participat en la realització del segon experiment i en l'anàlisi i la discussió dels resultats, i és el principal responsable de l'escriptura d'aquest treball.

2.- A.Casanovas, M.Carrascal, J.Abián, MD.López-Tejero, M.Llobera. *Application of proteomic tools to detect the nonspecificity of a polyclonal antibody against lipoprotein lipase.*

Journal of Proteome Research 7, 4173-4177, 2008.

Factor d'impacte: 5,684

Albert Casanovas ha participat de forma decisiva en el disseny experimental, en l'anàlisi i en la discussió dels resultats i és el principal responsable de la realització dels experiments i de l'escriptura d'aquest treball.

3.- A.Casanovas, M.Carrascal, J.Abián, MD.López-Tejero, M.Llobera. *Discovery of lipoprotein lipase pI isoforms and contributions to their characterization.*

Journal of Proteomics 72, 1031-1039, 2009.

Factor d'impacte: Encara no en té perquè el primer número de la revista va sortir publicat el mes d'abril de 2008.

Albert Casanovas ha participat de forma decisiva en el disseny experimental, en l'anàlisi i en la discussió dels resultats i és el principal responsable de la realització dels experiments i de l'escriptura d'aquest treball.

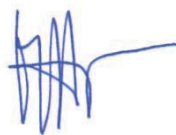
4.- A.Casanovas, M.Carrascal, J.Abián, M.D.López-Tejero, M.Llobera. *Lipoprotein lipase is nitrated in vivo after lipopolysaccharide challenge.*

Free Radical Biology and Medicine (en premsa).

Factor d'impacte: 5,399

Albert Casanovas ha participat de forma decisiva en el disseny experimental, en l'anàlisi i en la discussió dels resultats i és el principal responsable de la realització dels experiments i de l'escriptura d'aquest treball.

Barcelona, setembre de 2009



Dra. M. Dolores López Tejero
Professora Titular d'Universitat



Dr. Miquel Llobera Sande
Catedràtic d'Universitat

5. RESULTATS

ARTICLE 1

Retroperitoneal white adipose tissue lipoprotein lipase activity is rapidly down-regulated in response to acute stress

Casanovas, A.; Parramon, N.; de la Cruz, F.; Andrés, O.; Terencio, J.;
López-Tejero, M. D.; Llobera, M.

Journal of Lipid Research 48: 863-868 (2007)

Resum

L'activitat LPL del teixit adipós blanc retroperitoneal disminueix ràpidament en resposta a l'estrès agut

La regulació específica de teixit de l'LPL ha estat àmpliament estudiada en rates. Estudis anteriors desenvolupats en el nostre grup descriuen que l'administració *in vivo* d'adrenalina i l'estrès agut provoquen un increment de l'activitat LPL en plasma que coincideix amb una disminució de l'activitat LPL del teixit adipós blanc. En aquest treball hem estudiat la velocitat dels canvis d'activitat LPL durant un estrès agut per IMMO de 30 minuts. Una primera aproximació experimental en rates canulades de manera permanent va permetre la recollida de mostres de sang del mateix animal durant el període d'IMMO i l'obtenció de paràmetres hemodinàmics. En una segona aproximació experimental els animals es van sacrificar a diferents temps després de l'inici de la IMMO per determinar l'activitat LPL en diferents teixits. L'estrès es va caracteritzar per un augment de la pressió sanguínia, la freqüència cardíaca, la corticosterona en plasma i els substrats energètics circulants. Cinc minuts després de l'inici de la IMMO, l'activitat LPL va disminuir en el teixit adipós blanc retroperitoneal i va augmentar en plasma. Aquestes dades mostren el canvi d'activitat LPL més ràpid que mai s'ha descrit en resposta a una situació fisiològica. La velocitat i la simultaneïtat d'aquests canvis suggereixen que l'alliberament de l'endoteli a la sang podria constituir un mecanisme ràpid de regulació de l'activitat LPL de teixit, implicat en la redistribució de substrats lipídics entre teixits necessària per preparar la resposta de "lluita o fugida".

Resultats complementaris

Evolució dels nivells de nitrat en plasma durant l'estrès agut per IMMO

Com es comenta a la discussió de l'article 1, una de les molècules que podrien participar en un eventual procés d'alliberament de l'LPL és l'NO. La determinació de nitrat circulant permet estimar la quantitat d'NO generat ja que l'NO que es sintetitza i difon a la llum dels vasos sanguinis, reacciona majoritàriament amb l'oxihemoglobina dels eritròcits formant nitrat [218,219]. La figura 22 mostra un augment significatiu dels nivells de nitrat en plasma durant el període d'estrès agut per IMMO (aquests resultats han estat publicats a la referència 220).

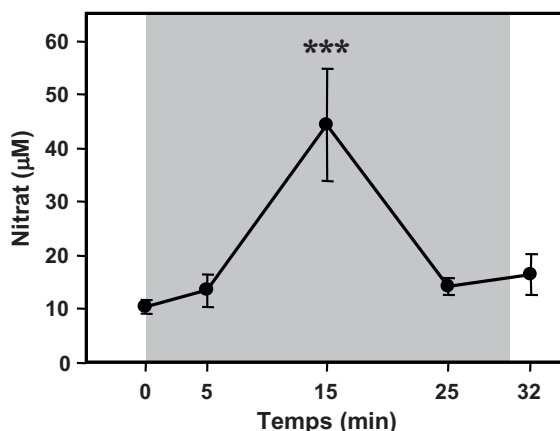


Figura 22. Efecte de l'estrès sobre els nivells de nitrat a plasma. L'àrea ombrejada correspon al període d'IMMO. Els valors estan expressats com a mitjana \pm error estàndard per cada grup experimental. Les diferències entre grups s'han analitzat mitjançant ANOVA d'un factor (temps d'IMMO), seguida del test de Tukey. Es mostra la significativitat respecte al valor basal (0 minuts). ***($P < 0,001$). (Aquest resultat ha estat publicat a la referència 220.)

Immunodetecció de nitro tirosina en plasma de rates sotmeses a estrès agut per IMMO

En una aproximació preliminar a l'estudi d'una potencial interacció entre l'LPL i l'NO o els seus derivats, vam analitzar el plasma de rates sotmeses a diferents temps d'estrès agut per IMMO mitjançant *western blot* anti-nitro tirosina. La nitració de tirosines és una modificació posttraduccional comunament associada a la producció d'NO i RNS. A la figura 23 es comparen els resultats obtinguts en el *western blot* anti-nitro tirosina i els obtinguts en el *western blot* anti-LPL (després de reincubar la mateixa membrana amb l'anticòs P66, vegeu material i mètodes, pàg. 66). Una de les bandes que s'observen al *western blot* anti-nitro tirosina (figura 23A) presenta un pes molecular semblant al de l'LPL (figura 23B). No obstant, la informació que pot extreure's d'aquest resultat és molt limitada, ja que no permet determinar si es tracta d'una modificació de l'LPL o d'una altra proteïna amb el mateix pes molecular. Per resoldre aquesta ambigüitat, vam plantejar-nos augmentar la resolució de la tècnica repetint la mateixa anàlisi per *western blot*

després de la separació de les proteïnes mitjançant electroforesi en dues dimensions (vegeu article 2).

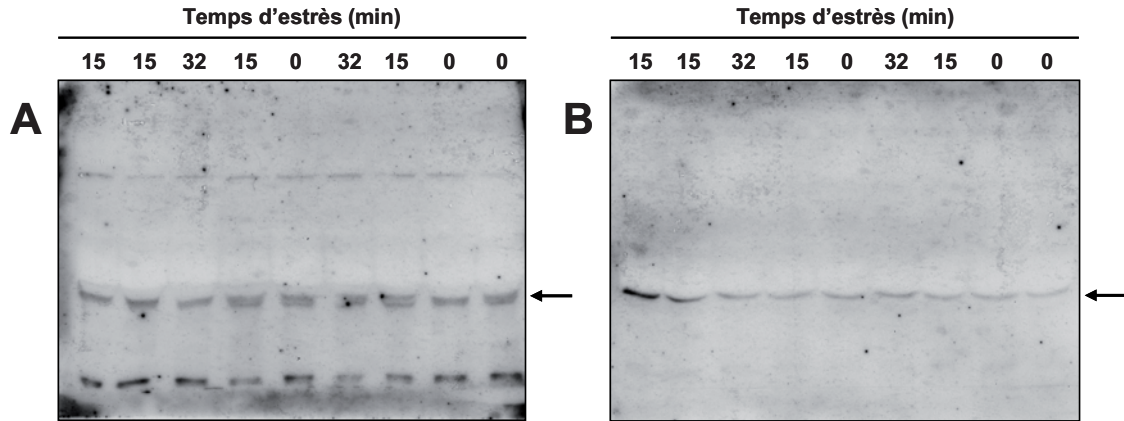


Figura 23. Western blot anti-nitrotirosina i anti-LPL amb mostres de plasma de rates sotmeses a estrès agut per IMMO. Una de les bandes obtingudes en el *western blot* anti-nitrotirosina (A) presenta el mateix pes molecular que la banda corresponent a l'LPL (B) (obtinguda després de reincubar la mateixa membrana amb l'anticòs primari P66, vegeu material i mètodes, pàg. 66). Cada carril correspon a un animal diferent. A la part superior de cada carril s'indica el temps d'estrès. El grup control (no estressat) s'indica com a 0 min d'estrès. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL.

ARTICLE 2

Application of proteomic tools to detect the nonspecificity of a polyclonal antibody against lipoprotein lipase

Casanovas, A.; Carrascal, M.; Abián, J.; López-Tejero, M. D.; Llobera, M.

Journal of Proteome Research 7: 4173-4177 (2008)

Resum

Aplicació d'eines proteòmiques per a la detecció de la inespecificitat d'un anticòs policlonal contra la lipoproteïna lipasa

Els anticossos específics són eines essencials per a l'estudi de proteïnes. L'anticòs P66 és un anticòs policlonal generat contra LPL bovina que s'ha emprat en estudis anteriors. Aquí hem desenvolupat un *western blot* en dues dimensions en condicions desnaturalitzants emprant LPL bovina comercial (53 kDa) com a estàndard i l'anticòs P66 per a la immunodetecció. Els resultats revelen una purificació incompleta de l'LPL comercial i la inespecificitat de l'anticòs P66, ambdues indetectables en l'anàlisi en una dimensió. L'antitrombina III es va identificar com una abundant proteïna contaminant en l'LPL comercial i com una proteïna que també era reconeguda per l'anticòs P66. Malgrat que els mètodes de purificació de l'LPL havien estat presumptament dissenyats per eliminar l'antitrombina III, aquí demostrarem que alguns procediments van ser insuficients per assolir una purificació completa de l'enzim i van portar, en darrer terme, a l'obtenció d'un anticòs inespecífic. Els nostres resultats presenten l'electroforesi en dues dimensions i el *western blot*, juntament amb la identificació de les proteïnes mitjançant espectrometria de masses, com la metodologia més fiable per validar els processos de purificació de l'LPL i l'especificitat dels anticossos contra aquest enzim.

Resultats complementaris

La inespecificitat detectada en l'anticòs P66 ens obligà a buscar un altre anticòs com a alternativa per a la immunodetecció d'LPL en mostres de rata. Com es descriu a l'article 2, l'anticòs monoclonal 5D2 permet detectar específicament LPL purificada de llet bovina, però no dona cap senyal en mostres de plasma de rata. L'administració d'heparina és una estratègia habitual per induir l'alliberament de l'LPL des de l'endoteli a la sang i augmentar, d'aquesta manera, la concentració de l'enzim en mostres de plasma (vegeu material i mètodes, pàg. 40). Així, vam emprar plasma postheparínic de rata com a mostra per a la posada al punt del *western blot* amb els nous anticòssos.

Atès que l'anticòs 5D2 tampoc donava cap de senyal amb plasma postheparínic (figura 24A) vam plantejar l'ús de l'anticòs policlonal GB1, desenvolupat en el nostre laboratori en col·laboració amb l'empresa Eurogentec (Seraing, Bèlgica) (vegeu material i mètodes, pàg. 66). L'anticòs GB1 es va obtenir en gallina emprant com a immunogen un pèptid sintètic (corresponent als aminoàcids 22-41 de l'LPL de rata). Aquest anticòs detecta en plasma postheparínic una clara banda a l'alçada corresponent a l'LPL i dues bandes més de pes molecular inferior (figura 24B). Aquest anticòs no detecta cap banda en plasma control, però tampoc detecta l'LPL bovina. Com a possible explicació a aquest darrer punt vam plantejar-nos que la manca d'immunoreactivitat de l'anticòs GB1 amb l'LPL bovina podria ser deguda a les diferències de seqüència entre l'LPL de rata i l'LPL bovina (que difereixen en 4 dels 20 residus del pèptid emprat com a immunogen).

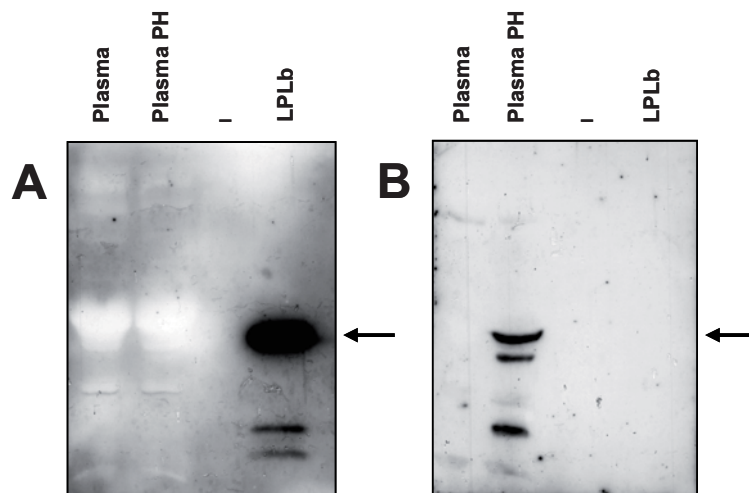


Figura 24. Assaig per a la immunodetecció d'LPL emprant l'anticòs 5D2 (A) o l'anticòs GB1 (B). Mostres de diferents orígens (plasma de rata i LPL bovina) van ser analitzades per *western blot* emprant dos anticòssos diferents com a primari. El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL. LPLb, LPL bovina; Plasma PH, plasma postheparínic.

Immunoprecipitació emprant l'anticòs GB1

Per determinar l'especificitat de l'anticòs GB1 vam proposar-nos immunoprecipitar l'LPL en mostres de plasma postheparínic de rata, per tal d'eliminar altres proteïnes majoritàries i augmentar la concentració relativa de l'enzim, i seguir l'estratègia descrita a l'article 2 –analitzar les proteïnes immunoprecipitades mitjançant electroforesi en dues dimensions i *western blot*, i identificar les proteïnes per mapatge peptídic–. El que anomenem GB1 és un extracte proteic de rovell d'ou de la gallina immunitzada obtingut com es descriu en treballs anteriors [194]. Com a pas previ a la immunoprecipitació vam purificar, mitjançant una cromatografia d'interacció tiòfila, les immunoglobulines Y (IgY) a partir de GB1 (vegeu material i mètodes, pàg. 54). Els resultats del procés de purificació (figura 25) mostren l'eliminació d'algunes proteïnes abundants presents a la mostra inicial (figura 25B).

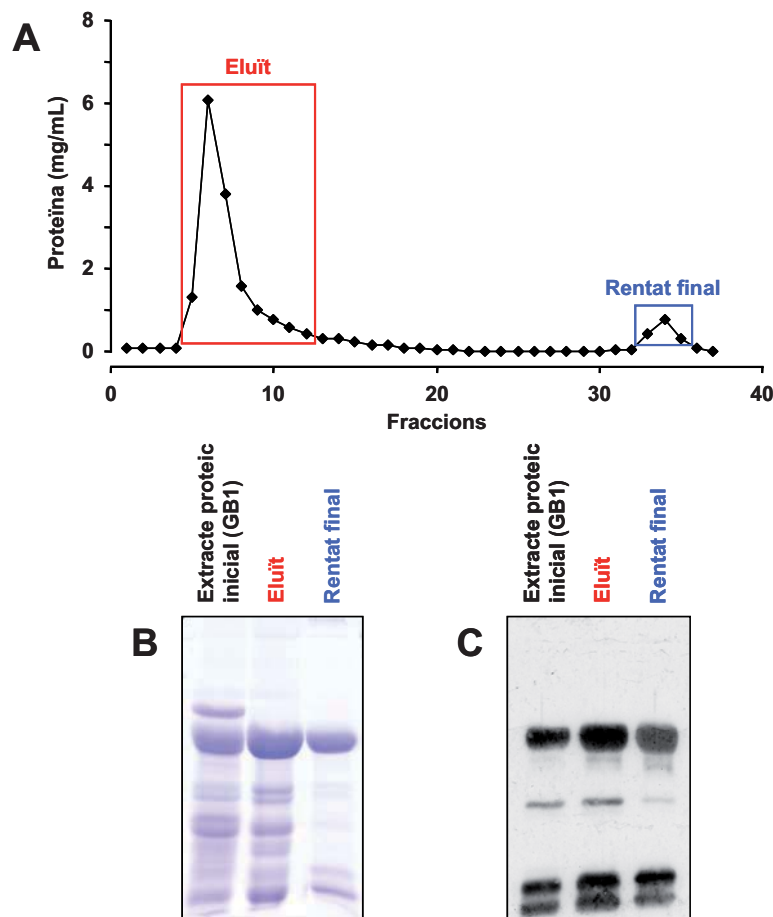


Figura 25. Purificació d'immunoglobulines Y a partir de GB1 (extracte proteic obtingut de rovell d'ou de la gallina immunitzada). Les IgY es van purificar parcialment mitjançant cromatografia d'interacció tiòfila emprant una columna comercial (GE Healthcare, Uppsala, Suècia). Al panell A es mostra la concentració de proteïna a les fraccions recollides i s'indiquen les fraccions que es van barrejar tant de l'elut de proteïnes retingudes com del rentat final. El contingut d'aquestes fraccions es va comparar amb el de l'extracte proteic inicial (GB1) mitjançant electroforesi amb SDS i tinció amb blau de Coomassie (B) o transferint les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa i incubant-la amb un anticòs contra IgY de gallina conjugat amb peroxidasa (Chemicon, Temecula, CA, EUA), panell C. El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril.

No obstant, nombroses proteïnes continuen presents a l'eluït després del procés de purificació (figura 25B), malgrat que la majoria de proteïnes poc abundants no són IgY (figura 25C). L'ús de l'eluït de la cromatografia (IgY purificades) com a anticòs primari en el *western blot* no ofereix millor sensibilitat ni especificitat que el GB1 (figura 26).

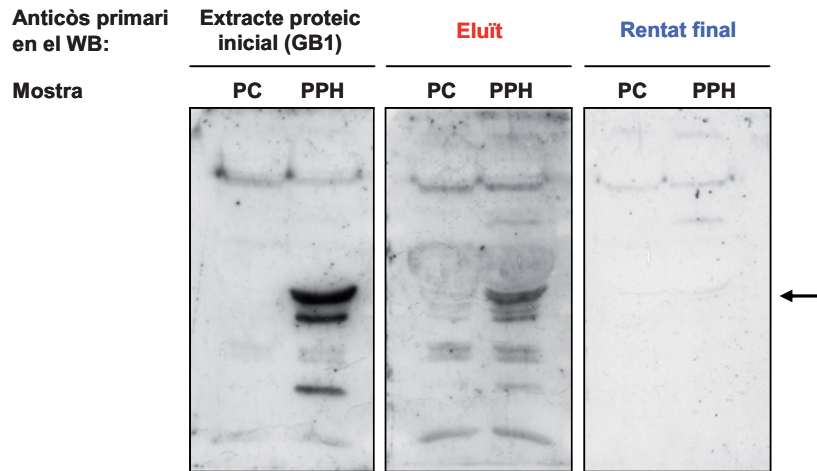


Figura 26. Ús de les IgY purificades a partir de GB1 com a anticòs primari per a la immunodetecció per *western blot* d'LPL en plasma postheparinic de rata. Les IgY purificades (eluït) i les Ig que elueixen en el rentat final no milloren la sensibilitat ni l'especificitat de l'anticòs GB1. El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL. PC, plasma control; PPH, plasma postheparinic; WB, *western blot*.

Tot i així vam fer la primera prova d'immunoprecipitació emprant, paral·lelament, l'eluït de la cromatografia (IgY purificades) i l'anticòs GB1 (figura 27). En ambdós casos, la proteïna d'interès s'observa a la fracció de proteïna no retenguda i al primer rentat, però no a l'eluït, evidenciant d'aquesta manera que la proteïna d'interès no era reconeguda per l'anticòs en la immunoprecipitació.

El reconeixement de la proteïna en el *western blot* (on la proteïna està desnaturalitzada) i la nul·la retenció durant la immunoprecipitació (que es fa amb les proteïnes en conformació nativa) ens van portar a plantejar que el reconeixement de l'epítip podia estar condicionat per la conformació de la proteïna. Així, amb l'objectiu de desnaturalitzar la mostra abans de la immunoprecipitació, vam pretractar la mostra emprant diferents condicions combinant l'ús d'SDS, DTT, iodoacetamida i/o ebullició. Després del tractament, la mostra era dialitzada per tal d'eliminar aquests compostos i evitar la seva acció sobre els anticossos i una eventual interferència en la immunoprecipitació. La figura 28 mostra els resultats obtinguts emprant quatre procediments diferents (indicats a la figura). En tots els casos, la majoria de proteïna d'interès es continua trobant a la fracció no retenguda i en el primer rentat, mentre que la seva detecció a l'eluït és mínima (figura 28D) o nul·la (figura 28 A i B). En el cas del tractament únicament amb DTT (figura 28C), s'aprecien tres bandes en l'eluït que coincideixen amb el pes molecular observat de les cadenes pesades i lleugeres de les IgY i podrien haver eluït de la pròpia columna, en dissociar-se de la *Sepharose*, i haver estat reconegudes per l'anticòs secundari (anti-IgY) emprat en el *western blot*.

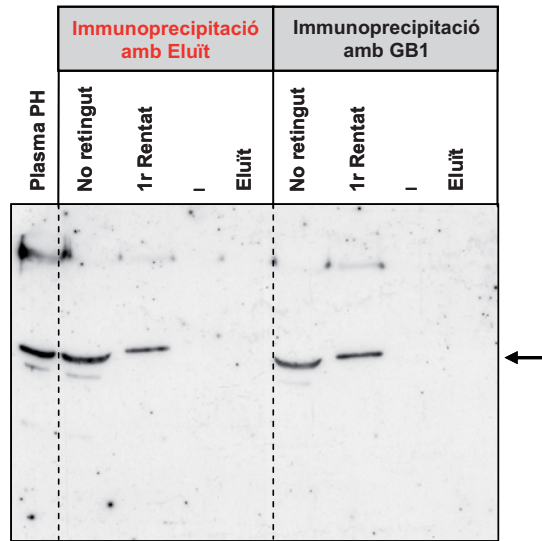


Figura 27. Immunoprecipitació d’LPL emprant l’eluït de la purificació d’IgY o l’anticòs GB1. La figura mostra el *western blot* anti-LPL (emprant l’anticòs GB1 com a primari) de diferents fraccions recollides durant la immunoprecipitació. En el primer carril (esquerra) del gel es va carregar plasma postheparínic cru (sense immunoprecipitar) de rata (Plasma PH). El tipus de mostra s’indica a l’encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l’LPL.

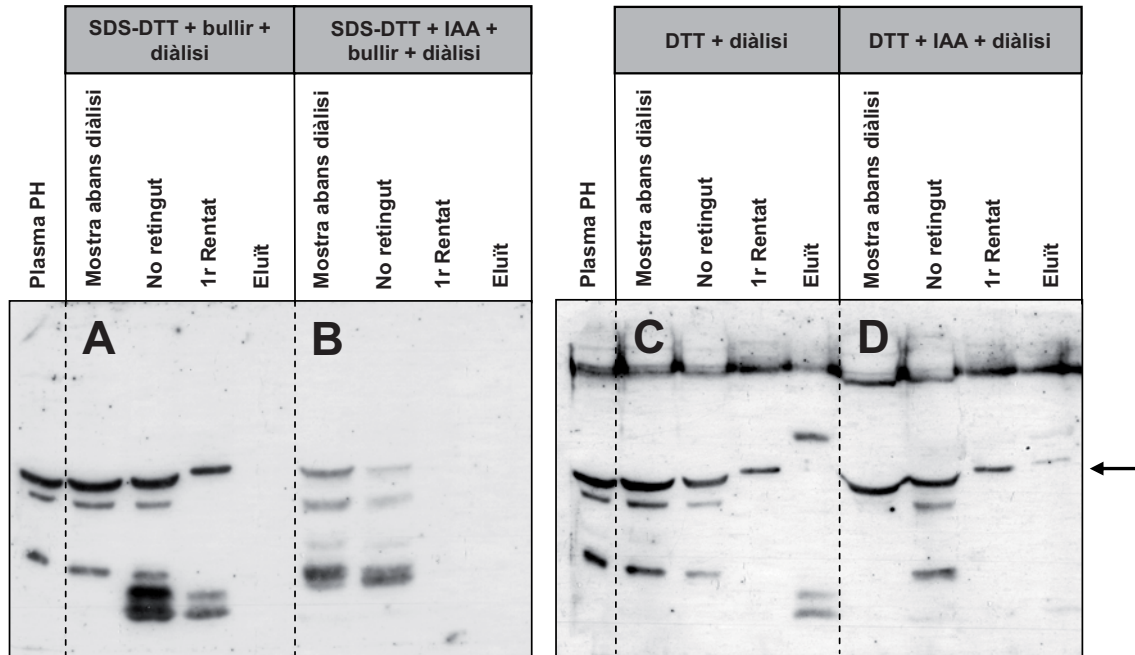


Figura 28. Comparació de diferents procediments de pretractament de la mostra (plasma postheparínic de rata) per a la immunoprecipitació de l’LPL emprant l’anticòs GB1. A la part superior de la figura (requadres grisos) s’indica el tractament de la mostra previ a la immunoprecipitació. La figura mostra, per cada procediment, el *western blot* anti-LPL (emprant l’anticòs GB1 com a primari) de la mostra abans de la diàlisi i en diferents fraccions recollides durant la immunoprecipitació. En el primer carril (esquerra) cada gel es va carregar plasma postheparínic cru (sense immunoprecipitar) de rata (Plasma PH). El tipus de mostra s’indica a l’encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l’LPL.

A la llum dels resultats obtinguts amb les diferents condicions emprades per al pretractament de la mostra, vam decidir estudiar les diferents fraccions recollides en la immunoprecipitació feta pretractant la mostra amb DTT i iodoacetamida. La figura 29 confirma que, malgrat que la majoria de proteïna no queda retinguda en la immunoprecipitació, una petita fracció de proteïna a l'eluit és reconeguda per l'anticòs GB1 en el *western blot* (figura 29B). Vam aprofundir en l'anàlisi d'aquest eluït mitjançant electroforesi en dues dimensions (figura 30). El *western blot* de l'eluït mostra diverses taques (figura 30B). No obstant, la identificació de les proteïnes del gel tenyit amb plata (figura 30A) que coincideixen amb la localització de les taques detectades en el *western blot* no va permetre identificar-ne cap com a LPL (taula 4). En comptes d'LPL, en moltes de les taques es va identificar fibrinogen. El fibrinogen és una proteïna plasmàtica abundant que coincideix amb el pes molecular i el punt isoelèctric de l'LPL. Per aquest motiu, el resultat obtingut no ens permet concloure si l'anticòs GB1 és inespecífic i no detecta l'LPL en el *western blot* o bé si reconeix l'LPL però no podem identificar-la per mapatge peptídic perquè el fibrinogen és més abundant i coincideix amb la localització de l'LPL –perquè la resolució de l'electroforesi en dues dimensions és insuficient per separar ambdues proteïnes–. Com a alternativa per purificar l'LPL i descartar el fibrinogen vam plantejar-nos immunoprecipitar l'LPL emprant l'anticòs P66.

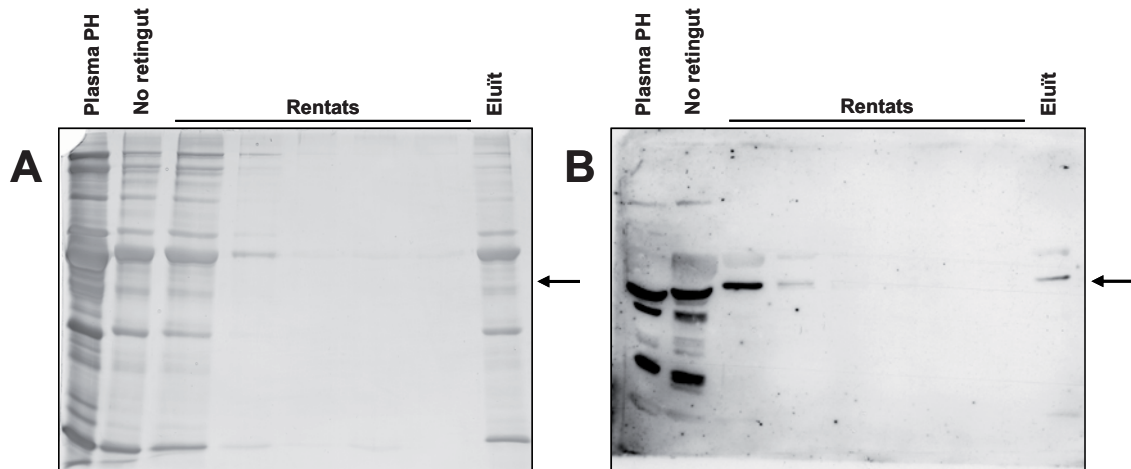


Figura 29. Immunoprecipitació amb l'anticòs GB1. SDS-PAGE de les fraccions recollides en diferents etapes del procés d'immunoprecipitació i tinció amb plata (A) o *western blot* emprant el mateix anticòs GB1 com a primari (B). El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL. Plasma PH, plasma postheparínic de rata.

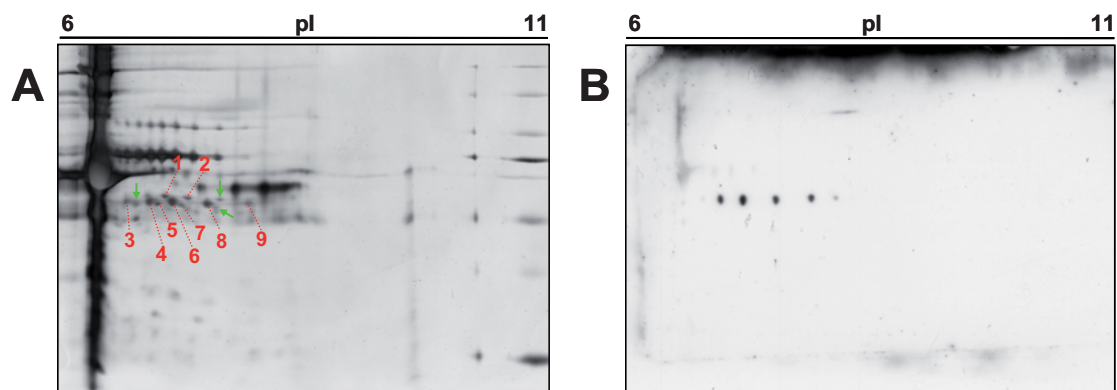


Figura 30. Anàlisi mitjançant electroforesi en dues dimensions de l'eluit de la immunoprecipitació amb l'anticòs GB1. Revelat mitjançant tinció amb plata (A) o *western blot* amb el mateix anticòs GB1 com a primari (B). A l'isoelectroenfocament es van emprar tires d'IPG de 7 cm i pH 6-11. En el panell A, s'enumeren les proteïnes que van ser identificades per mapatge peptídic (vegeu taula 4). Les proteïnes que van ser analitzades però no van poder ser identificades s'indiquen amb una fletxa verda, panell A.

Nº taca	Nom de la proteïna	Nº accés a UniProtKB	Pèptids assignats	MOWSE score
1	fibrinogen cadena α , precursor	P06399	10	705
2	fibrinogen cadena α , precursor	P06399	14	$5,9 \times 10^3$
2	fibrinogen cadena β , precursor	P14480	12	$4,75 \times 10^3$
3	s-metil-5-tioadenosina fosforilasa	Q9CQ65	9	$3,04 \times 10^4$
4	isovaleril-CoA deshidrogenasa mitocondrial, precursor	Q9JHI5	10	$3,05 \times 10^4$
5	fibrinogen cadena β , precursor	P14480	4	103
6	fibrinogen cadena α , precursor	P06399	12	$8,73 \times 10^4$
7	fibrinogen cadena β , precursor	P14480	26	$1,48 \times 10^{12}$
8	fibrinogen cadena α , precursor	P06399	16	$4,82 \times 10^5$
9	fibrinogen cadena β , precursor	P14480	7	$3,56 \times 10^3$

Taula 4. Proteïnes identificades per mapatge peptídic en el gel de la figura 30A.

Immunoprecipitació emprant l'anticòs P66

Malgrat que l'anticòs P66 és inespecífic (com es descriu a l'article 2), aquest anticòs té capacitat per reconèixer l'LPL. La principal proteïna que reconeix inespecíficament és l'antitrombina III però, per la seva diferència de punt isoelèctric amb l'LPL, aquestes proteïnes poden separar-se mitjançant electroforesi en dues dimensions. La figura 31 mostra l'anàlisi de les fraccions recollides en la immunoprecipitació amb l'anticòs P66. De manera anàloga a l'anàlisi anterior, les fraccions van ser analitzades per *western blot* emprant l'anticòs GB1 com a anticòs primari (figura 31B). Tal i com succeïa en la immunoprecipitació amb l'anticòs GB1, gairebé tota la proteïna es detecta a la fracció de proteïnes no retingudes i als primers rentats, mentre que només una petita part de la proteïna es recull a l'eluit. Novament, es va analitzar l'eluit mitjançant electroforesi en dues dimensions (figura 32). El *western blot* amb l'anticòs GB1 mostra algunes taques poc intenses (figura 32B). No obstant, malgrat el doble reconeixement que suposa la immunoprecipitació amb un anticòs (P66) i la immunodetecció en el *western blot* amb un altre anticòs (GB1), la identificació per mapatge peptídic de les proteïnes resoltes a la regió d'interès (figura 32A) no va permetre identificar cap taca com a LPL (taula 5).

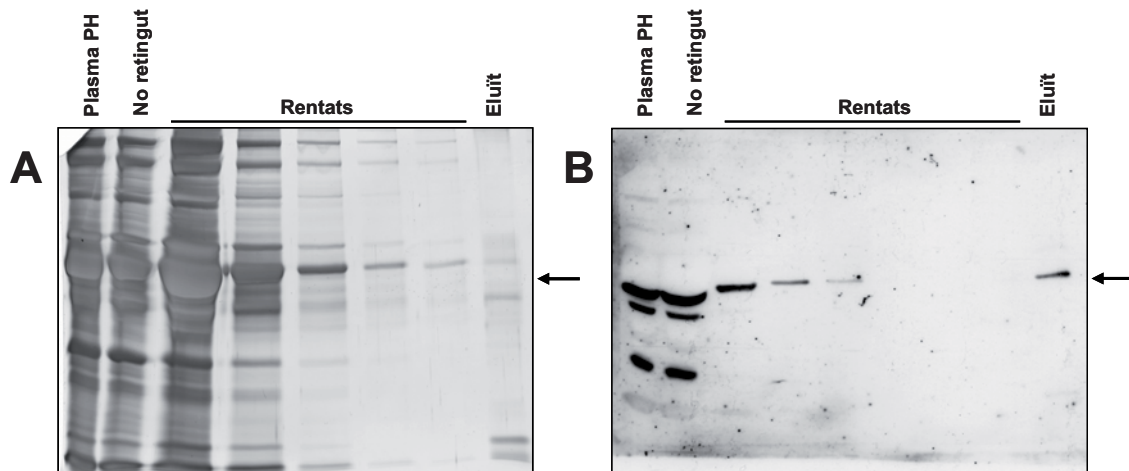


Figura 31. Immunoprecipitació amb l'anticòs P66. SDS-PAGE de les fraccions recollides en diferents etapes del procés d'immunoprecipitació i tinció amb plata (A) o *western blot* emprant l'anticòs GB1 com a primari (B). El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL. Plasma PH, plasma postheparínic de rata.

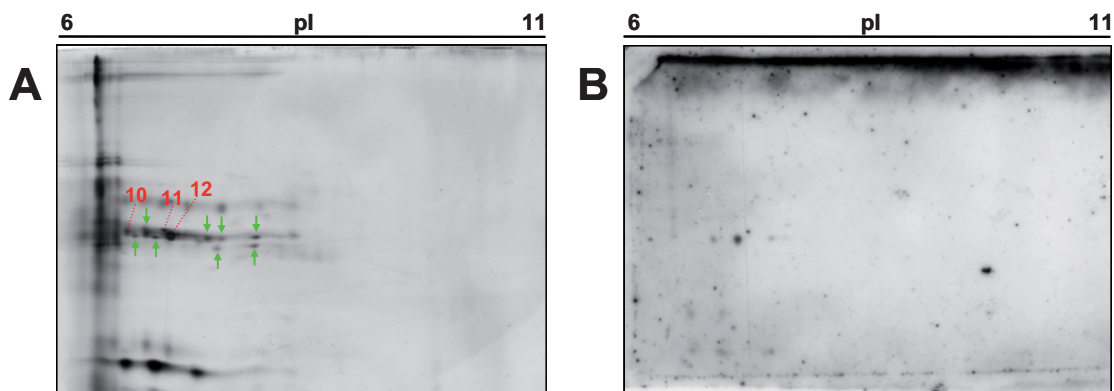


Figura 32. Anàlisi mitjançant electroforesi en dues dimensions de l'eluit de la immunoprecipitació amb l'anticòs P66. Revelat mitjançant tinció amb plata (A) o *western blot* emprant l'anticòs GB1 com a primari (B). A l'isoelectroenfocament es van emprar tires d'IPG de 7 cm i pH 6-11. Al panell A, s'enumeren les proteïnes que van ser identificades per mapatge peptídic (vegeu taula 5). Les proteïnes que van ser analitzades però no van poder ser identificades s'indiquen amb una fletxa verda, panell A.

Nº taca	Nom de la proteïna	Nº accés a UniProtKB	Pèptids assignats	MOWSE score
10	cadena lleugera 6 de la miosina	Q64119	5	1,83 x 10 ³
10	inhibidor 3 de la proteasa semblant a contrapsina, precursor	P05544	4	1,82 x 10 ³
11	fibrinogen cadena β, precursor	P14480	19	8,67 x 10 ⁹
12	fibrinogen cadena β, precursor	P14480	4	ND ^a

Taula 5. Proteïnes identificades per mapatge peptídic en el gel de la figura 32A.

^aND, no disponible. No es va poder obtenir el MOWSE score amb el programa Protein Prospector (Universitat de Califòrnia, San Francisco, CA, EUA) però es van detectar alguns pèptids triptics que corresponen al precursor de la cadena β del fibrinogen (UniProtKB, P14480).

Purificació parcial d'LPL mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose

Amb aquests resultats en la immunoprecipitació, i continuant amb l'objectiu d'avaluar l'especificitat de l'anticòs GB1, vam cercar altres estratègies per a la purificació parcial de l'LPL. Un procediment habitual per a la purificació de l'enzim és mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina. En una primera aproximació, vam desenvolupar aquesta cromatografia en mini-columnnes d'heparina-Sepharose (vegeu material i mètodes, pàg. 58) utilitzant plasma postheparínic com a mostra. A la figura 33A s'observa que, com succeïa en la immunoprecipitació, la majoria de proteïna detectada per l'anticòs GB1 en el *western blot* es troba a la fracció de proteïnes no retengudes i en els primers rentats, però no a l'eluit. Com a possible explicació a aquest resultat vam plantejar una eventual competència entre l'heparina que contenia el propi plasma postheparínic i l'heparina unida a Sepharose de la cromatografia d'afinitat.

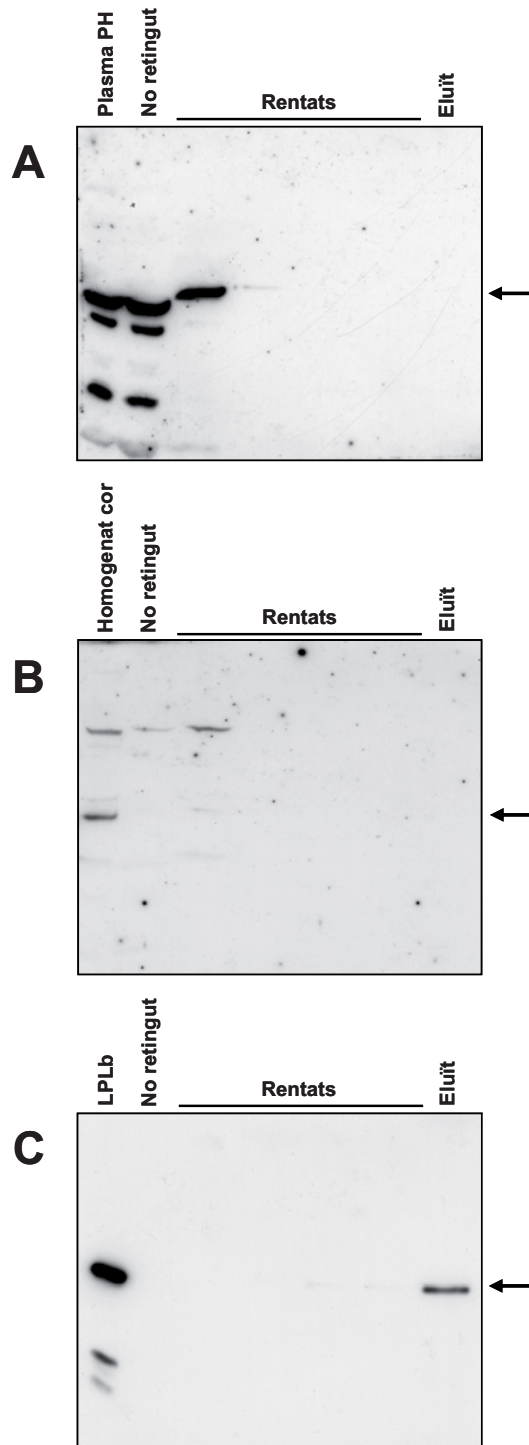


Figura 33. Cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose en mini-columnna. Purificació parcial d'LPL a partir de plasma postheparínic de rata (A), d'homogenat de cor de rata (B) i d'LPL bovina comercial (C) mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose en mini-columnna (vegeu material i mètodes, pàg. 58). Les fraccions obtingudes es van analitzar per *western blot* emprant com a primari l'anticòs GB1 per a les mini-columnnes de plasma postheparínic i d'homogenat de cor (A i B), o l'anticòs 5D2 en la mini-columnna d'LPL bovina (C). El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL. LPLb, LPL bovina; Plasma PH, plasma postheparínic.

Per avaluar el funcionament de la cromatografia d'afinitat vam repetir el procés emprant com a font d'LPL altres mostres que no contenien heparina: homogenat de cor de rata i LPL bovina comercial. L'anàlisi de les fraccions recollides amb l'homogenat de cor mitjançant *western blot* amb l'anticòs GB1 no mostra cap banda a l'eluït (figura 33B). En contrast, les fraccions recollides amb l'LPL bovina –que es van analitzar emprant l'anticòs 5D2 com a primari, perquè l'anticòs GB1 no reconeix aquest tipus de mostra (figura 24B)– van demostrar el bon funcionament de la cromatografia d'afinitat en no observar-se cap banda a la fracció de proteïnes no retengudes ni als rentats, però sí a l'eluït (figura 33C). Aquest resultat ens portà a plantejar dues possibilitats: (i) la cromatografia d'afinitat a heparina no funciona amb les mostres de rata utilitzades o (ii) l'anticòs GB1 no és adequat per validar el procés perquè la proteïna que reconeix en el *western blot* no és LPL. Aquest segon punt ens obligà a buscar un altre paràmetre per avaluar el funcionament del procés cromatogràfic.

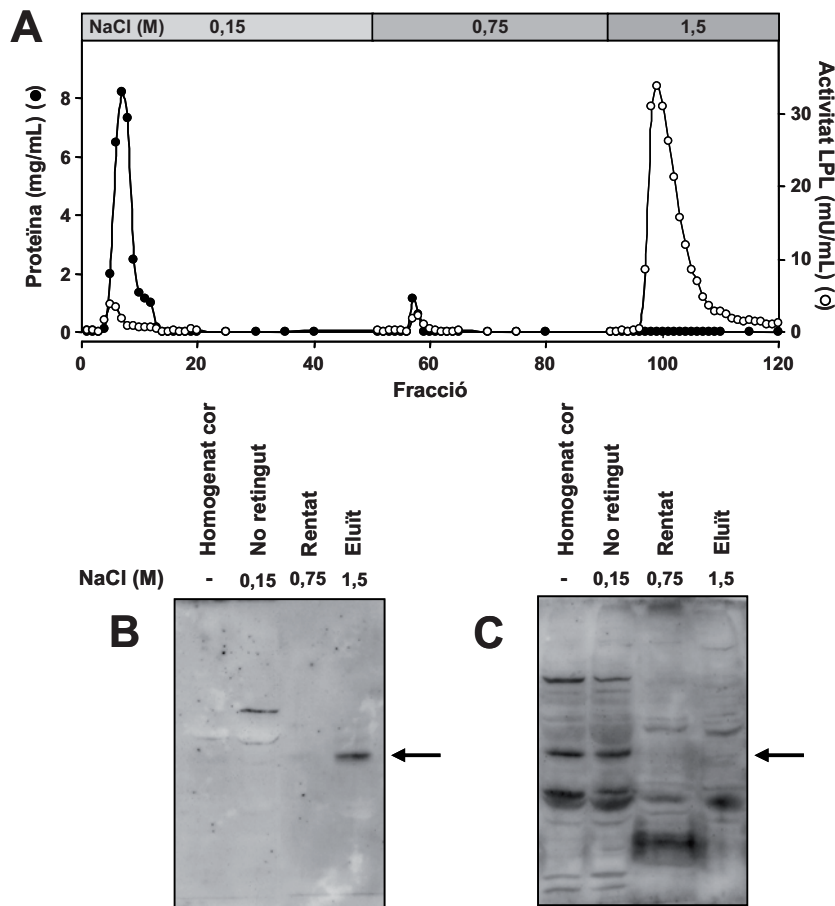


Figura 34. Cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose en columna gran. Es va purificar parcialment l'LPL d'homogenat de cor de rata mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina i es va determinar la concentració de proteïna (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) a les fraccions recollides (A). Les fraccions obtingudes es van analitzar mitjançant *western blot* emprant com a primari l'anticòs 5D2 (B) o l'anticòs GB1 (C). El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL.

La valoració de l'activitat LPL en les fraccions recollides en la cromatografia d'afinitat es presentava com una alternativa per determinar en quina fracció es trobava l'LPL. No obstant, la nul·la detecció d'activitat LPL en les fraccions recollides en les cromatografies realitzades en mini-columna utilitzant homogenat de cor de rata com a mostra (resultats no mostrats) ens portà a adaptar la cromatografia d'afinitat a columna gran (vegeu material i mètodes, pàg. 56) –que permet l'aplicació d'un volum més gran de mostra–. En aquest cas sí vam poder determinar l'activitat LPL en les fraccions recollides. La figura 34A mostra la detecció d'activitat LPL a les fraccions corresponents a l'eluït amb 1,5 M NaCl però no a les fraccions de proteïnes no retengudes, demostrant així el bon funcionament de la cromatografia d'afinitat en columna gran per a la purificació parcial de l'LPL. La posterior anàlisi de les fraccions obtingudes mitjançant *western blot* emprant els anticossos GB1 ó 5D2 com a primari mostrà novament una divergència en els resultats obtinguts amb els dos anticossos: l'anticòs 5D2 reconeix una proteïna amb el pes molecular de l'LPL a l'eluït de la columna (figura 34B), mentre que l'anticòs GB1 no detecta cap proteïna d'aquestes característiques en aquesta fracció (figura 34C). Aquest resultat ens va portar a plantejar l'ús de l'anticòs 5D2 per a la detecció d'LPL de rata per *western blot*. Per a l'anàlisi de les fraccions d'eluït mitjançant electroforesi en dues dimensions vàrem repetir la cromatografia d'afinitat en columna gran aplicant un volum més gran de mostra (vegeu article 3).

ARTICLE 3

Discovery of lipoprotein lipase pI isoforms and contributions to their characterization

Casanovas, A.; Carrascal, M.; Abián, J.; López-Tejero, M. D.; Llobera, M.

Journal of Proteomics 72: 1031-1039 (2009)

Resum

Descobriments de les isoformes de punt isoelèctric de l'LPL i contribucions a la seva caracterització

L'LPL desenvolupa un paper central en el metabolisme lipídic i està implicada en diverses situacions fisiopatològiques. Molts dels estudis fets sobre l'LPL s'han dut a terme en rata, malgrat que la quantitat d'informació derivada de l'estudi directe de la proteïna en aquesta espècie és limitada. Nosaltres ens vam proposar estudiar possibles modificacions de l'LPL mitjançant eines proteòmiques. L'ús d'electroforesi en dues dimensions, *western blot* i espectrometria de masses, ens ha portat a demostrar la coexistència de diverses isoformes de pI de l'LPL en cor de rata. Vàrem estudiar l'origen d'aquesta heterogeneïtat de pI mitjançant: (1) comparació amb el patró 2D d'LPL de plasma postheparínic (com a font d'LPL madura); (2) defosforilació de la proteïna; (3) deglicosilació de la proteïna i (4) seqüenciació parcial de les isoformes d'LPL. Els resultats mostren que l'heterogeneïtat de pI de l'LPL no correspon a diferents estadis de maduració intracel·lular ni a la fosforilació de la proteïna. Aquesta heterogeneïtat es pot explicar parcialment per la glicosilació, tot i que també deuen estar implicades altres modificacions posttraduccionals. En aquest treball també aportem la primera seqüència parcial d'LPL de rata obtinguda mitjançant l'anàlisi directa de la proteïna. Aquests resultats haurien de constituir la base per a futurs estudis dirigits a la identificació de les diferències moleculars entre les isoformes de l'LPL i a explorar les seves potencials implicacions funcionals.

Resultats complementaris

Defosforilació de pèptids fosforilats amb fosfatasa alcalina

L'eficiència del procés de defosforilació a què es va sotmetre l'LPL per avaluar la influència d'una eventual fosforilació sobre el pI de l'enzim es va validar incubant, en les mateixes condicions, una barreja estàndard de pèptids fosforilats amb fosfatasa alcalina. Aquesta incubació provocà un canvi de massa en els pèptids fosforilats corresponent a la pèrdua dels grups fosfat (figura 35).

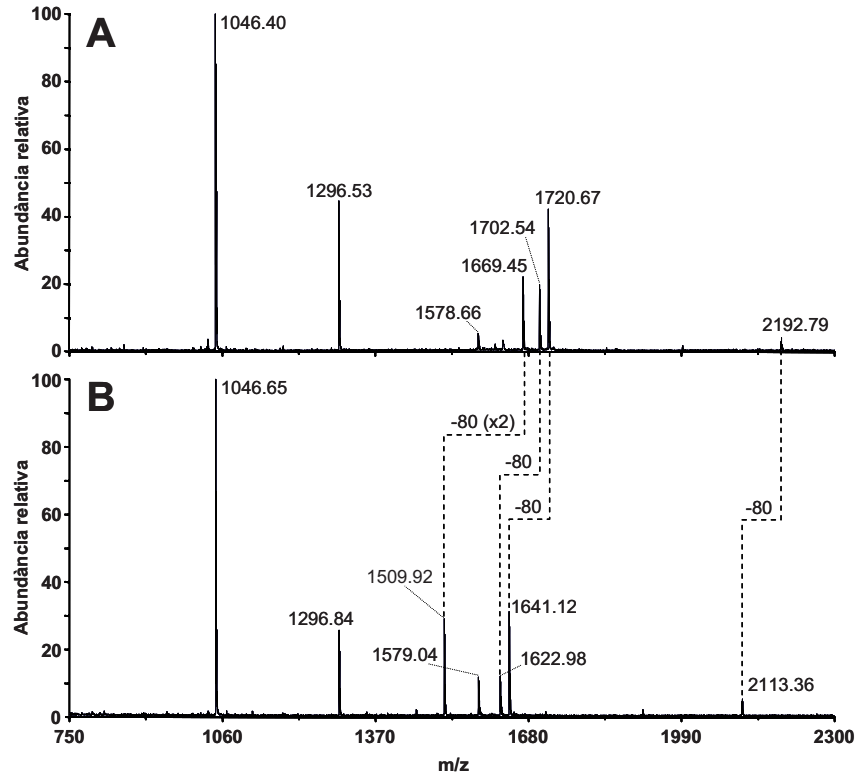


Figura 35. Efecte de la incubació amb fosfatasa alcalina sobre una barreja estàndard de pèptids fosforilats. Espectres de MALDI-TOF dels pèptids incubats sense (A) o amb (B) fosfatasa alcalina. La barreja conté pèptids no fosforilats ($[M+H]^+$ = 1046,5; 1296,7; 1578,9), pèptids monofosforilats ($[M+H]^+$ = 1702,8; 1720,9; 2192,1) i un pèptid bifosforilat ($[M+H]^+$ = 1669,7). La incubació amb fosfatasa alcalina provoca un canvi en la massa dels pèptids fosforilats corresponent a la pèrdua d'un (80 Da) o dos (160 Da) grups fosfat.

Detecció de modificacions en l'LPL de cor de rata mitjançant LC-MS/MS

En la seqüenciació parcial de les isoformes de l'LPL de rata que es descriu a l'article 3, vàrem detectar alguns pèptids modificats: quatre pèptids mostraven un canvi de massa de 28 Da en lisines (figura 36) (residus 238 i 430 a la taca 3, i residu 228 a les taques 5 i 7, segons la numeració de la figura 5 de l'article 3). Aquest canvi de massa generalment s'atribueix a una dimetilació d'aquests residus però alguns autors han qüestionat la validesa d'atribuir aquests canvis a la metilació *in vivo* i han suggerit una possible metilació exògena produïda durant la manipulació de la

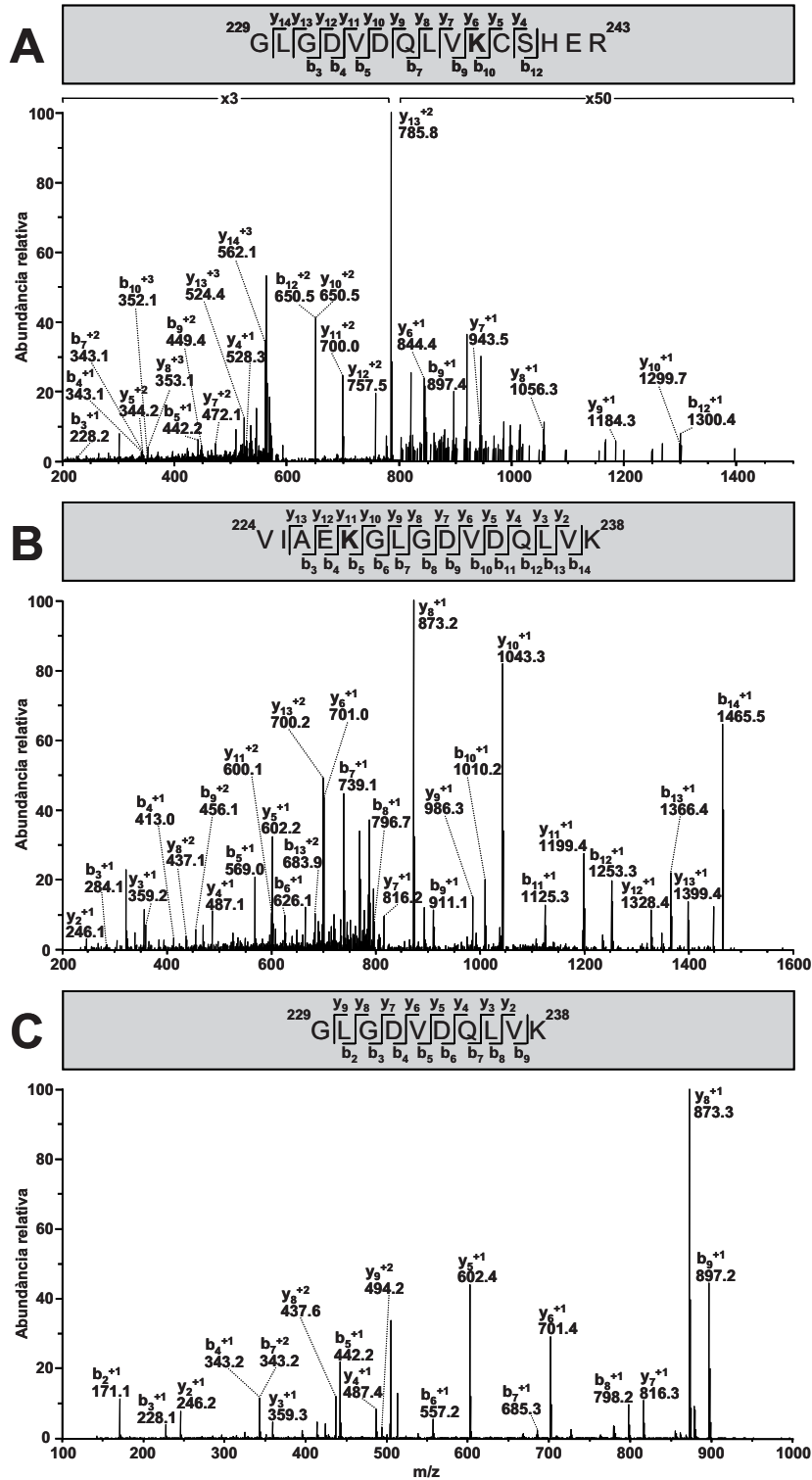


Figura 36. Detecció de modificacions en lisines (+28 Da) de l'LPL de cor de rata. Els espectres MS/MS dels pèptids modificats $^{229}\text{GLGDVDQLVKSHER}^{243}$ (A) i $^{224}\text{VIAEKGLGDVDQLVK}^{238}$ (B) es comparen amb el del pèptid no modificat (C). A l'espectre C es detecta un pèptid triptic més petit perquè la tripsina va tallar per les lisines no modificades. Les lisines modificades es mostren en **negreta**. L'espectre A s'ha obtingut en l'anàlisi de la taca 3 i els espectres B i C en l'anàlisi de la taca 7 (segons la numeració de la figura 5 de l'article 3). Els aminoàcids estan numerats començant per l'extrem N-terminal de la proteïna madura.

mostra [221]. A més, altres autors han descrit que els protocols de tinció amb plata que utilitzen formaldehid, com és el nostre cas, poden induir l'ε-formilació dels residus de lisina, que també provoca un canvi de massa de 28 Da [222]. Així, atès que la dimetilació i la formilació són modificacions isobàriques, es requereixen estudis utilitzant espectròmetres de masses més resolutius (que puguin diferenciar ambdues modificacions) per dirimir aquesta ambigüitat. Si aquests estudis demostrassin que el canvi de massa de 28 Da és degut a dimetilació, es podria assumir que aquesta modificació no s'hauria produït durant la manipulació de la mostra, ja que la tripsina no va tallar per les lisines modificades, suggerint que els residus ja estaven modificats abans de la incubació de la mostra amb tripsina.

D'altra banda, per detectar possibles canvis puntuals en la seqüència de l'LPL de rata, es va fer una cerca amb els espectres de fragmentació, obtinguts en l'anàlisi per LC-MS/MS, utilitzant el programa SEQUEST (Bioworks v3.3, ThermoFisher, San Jose, CA, EUA) i una base de dades de rosegadors que contenia 9479 entrades addicionals que cobrien totes les combinacions possibles de canvi d'un sol aminoàcid en la seqüència de l'LPL de rata (vegeu material i mètodes, pàg. 79). No obstant, aquesta cerca no va generar cap resultat diferent als obtinguts en la cerca amb la base de dades UniProtKB/Swiss-Prot (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Regne Unit) emprant els rosegadors com a grup taxonòmic (article 3, taula suplementària 1).

Purificació parcial d'LPL de plasma postheparínic de rata mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose i aproximació a la caracterització de les activitats lipases en les fraccions recollides

A l'article 3 es presenta el *western blot* en dues dimensions de l'LPL parcialment purificada de plasma postheparínic de rata (article 3, figura 4). La figura 37 mostra el resultat d'aquest procés de purificació parcial de l'enzim a partir de plasma postheparínic. De manera anàloga al resultat obtingut en la purificació feta a partir d'homogenat de cor de rata (article 3, figura 1), la cromatografia fa possible la detecció per *western blot* de l'LPL, que no es detecta en el plasma postheparínic cru (figura 37C). En aquest cas però, a més de la banda corresponent a l'LPL que s'observa a l'eluït, també es detecta una banda menys intensa i de pes molecular més baix en el carril corresponent al rentat amb 0,75 M NaCl. No obstant, la informació obtinguda no permet establir si aquesta banda és LPL degradada que elueix en aquest rentat o una altra proteïna que reconeix l'anticòs 5D2 de manera inespecífica.

Ambdós tipus de mostra, homogenat de cor i plasma postheparínic, presenten activitat lipasa a les fraccions corresponents al rentat amb 0,75 M NaCl. Per això vam fer una aproximació a la caracterització d'aquesta activitat mitjançant l'ús d'anticossos (anticòs 5D2 i antisèrum anti-HL, vegeu material i mètodes, pàg. 51) en l'assaig d'activitat. La figura 38 mostra que, en el cas de l'homogenat de cor, l'activitat present en el rentat amb 0,75 M NaCl s'inhibeix de manera pronunciada (77%) quan s'incuba amb l'anticòs 5D2, mentre que en el plasma postheparínic s'obté una inhibició superior al 95% amb l'antisèrum anti-HL. Així,

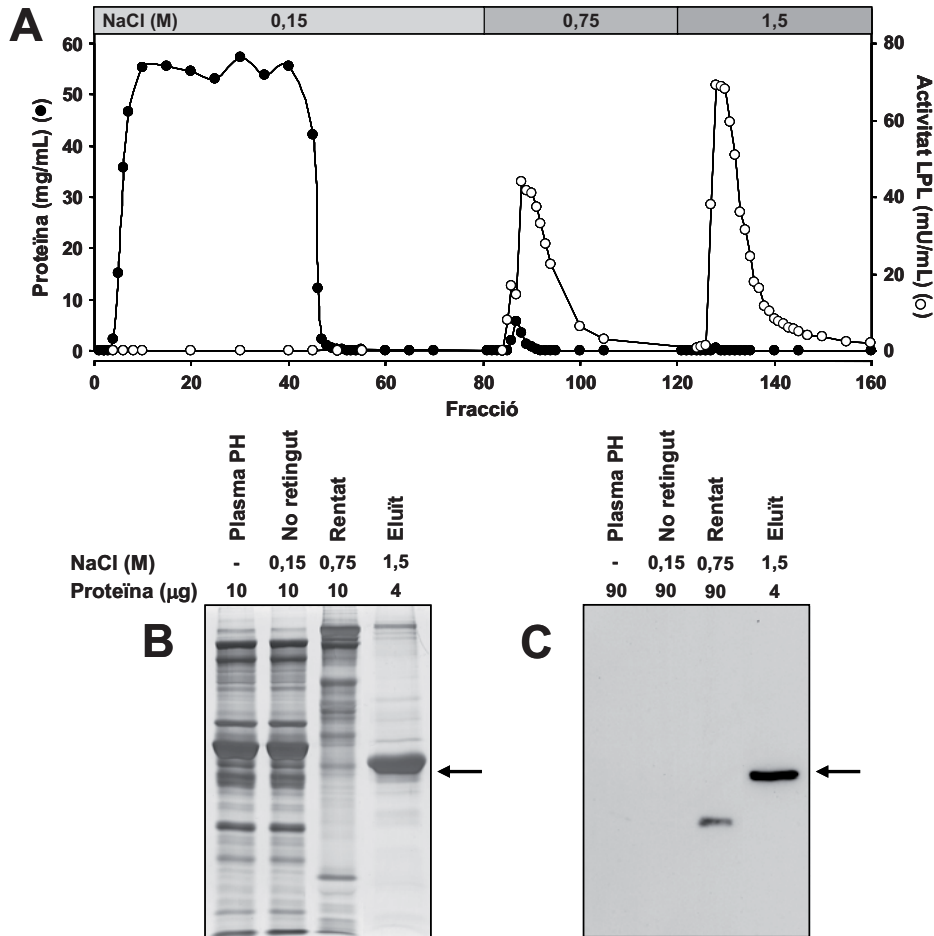


Figura 37. Purificació parcial de l'LPL de plasma postheparínic de rata mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-Sepharose. Es va determinar la concentració de proteïna total (cercles negres) i l'activitat LPL (cercles blancs) a les fraccions recollides (A). SDS-PAGE i tinció amb plata (B) o *western blot* anti-LPL – emprant l'anticòs 5D2 com a primari– (C) de fraccions recollides en diferents etapes del procés de purificació. El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL. Plasma PH, plasma postheparínic.

gran part de l'activitat lipasa que elueix en aquest rentat en la cromatografia feta amb homogenat de cor correspon, presumiblement, a LPL; mentre que en la cromatografia feta amb plasma postheparínic correspon a HL.

Pel que fa a l'efecte dels anticossos sobre l'activitat lipasa que detectem a l'eluït (1,5 M NaCl), ambdós tipus de mostra presenten resultats semblants: l'anticòs 5D2 provoca una inhibició parcial de l'activitat, mentre que l'antisèrum anti-HL no només no inhibeix sinó que augmenta l'activitat (figura 38). Possiblement el volum de sèrum que s'afegeix normalment com a font d'apo C-II en el substrat de l'assaig d'activitat LPL (vegeu material i mètodes, pàg. 50) és insuficient per aportar la quantitat d'apo C-II necessària per l'elevada quantitat d'LPL que es recull en l'eluït de la cromatografia. Així, l'augment d'activitat que s'observa en presència de l'antisèrum anti-HL podria explicar-se per l'aport addicional d'apo C-II. Aquesta hipòtesi es va confirmar en observar un augment

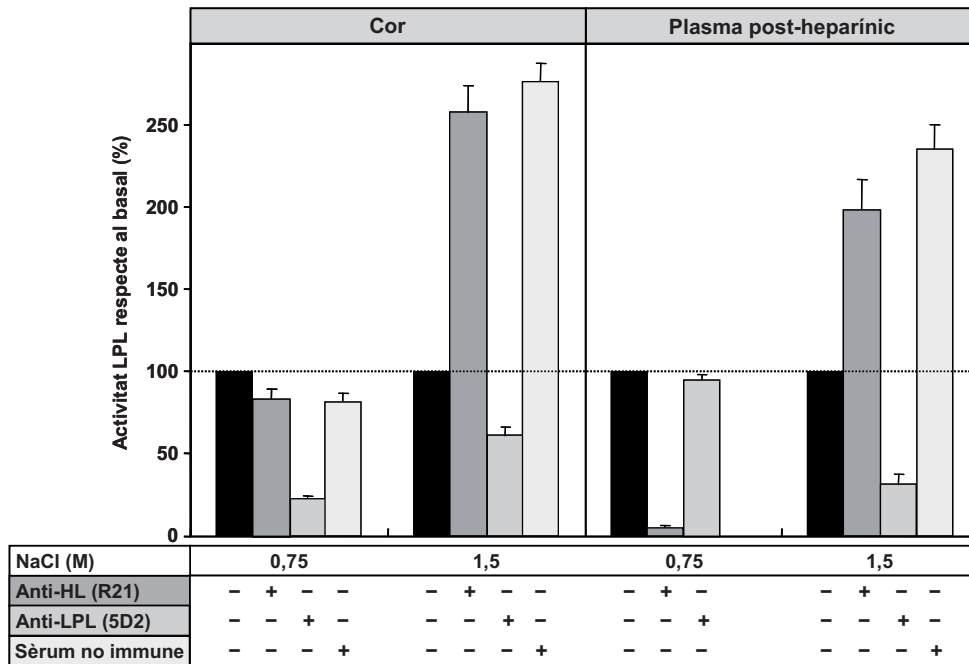


Figura 38. Efecte de la incubació amb anticossos sobre l'activitat lipasa en fraccions recollides en el procés de purificació de l'LPL. Després de purificar parcialment l'LPL de cor (article 3, figura 1) i de plasma postheparínic (figura 37) de rata, vàrem determinar l'activitat LPL en algunes de les fraccions obtingudes (rentat amb 0,75 M NaCl i eluït amb 1,5 M NaCl, indicat a la figura) en presència d'anticòs anti-LPL (5D2), d'antisèrum anti-HL (R21) o de sèrum de rata no immune preescalfat. L'activitat LPL es presenta respecte al valor basal, obtingut determinant l'activitat en les mateixes fraccions però sense anticossos i sense un volum addicional de sèrum no immune (barres negres).

d'activitat similar quan la incubació es va fer amb un volum addicional equivalent de sèrum control (no immune) en comptes de l'antisèrum anti-HL.

Aquest resultat ens porta a concloure que, probablement, l'activitat LPL que s'observa a les fraccions de l'eluït a la figura 37A i a la figura 1A de l'article 3 està infravalorada, perquè el volum de sèrum emprat en l'assaig (com a font d'apo C-II) fou limitant. A més, aquesta subestimació dels valors reals d'activitat LPL suggereix que la inhibició parcial de l'activitat eluïda amb 1,5 M NaCl que vam obtenir en la incubació amb l'anticòs 5D2 (figura 38), podria ser deguda a que el volum d'anticòs emprat fou limitant.

ARTICLE 4

Lipoprotein lipase is nitrated *in vivo* after lipopolysaccharide challenge

Casanovas, A.; Carrascal, M.; Abián, J.; López-Tejero, M. D.; Llobera, M.

Free Radical Biology and Medicine 47: 1553-1560 (2009)

Resum

La lipoproteïna lipasa es nitra *in vivo* en resposta a l'administració de lipopolisacàrid

L'administració d'LPS disminueix l'activitat LPL actuant a nivell posttranscripcional. La hipertriglicèridèmia és la principal conseqüència metabòlica d'aquesta baixada d'activitat LPL i, presumiblement, està implicada en la immunitat innata enfront a la infecció. S'ha proposat que l'NO està implicat en aquesta disminució d'activitat LPL mitjançada per LPS però no està clar si el seu efecte és directe o indirecte. En aquest treball hem estudiat la potencial nitració *in vivo* de l'LPL en resposta a l'administració d'LPS en la rata. Sis hores després de l'administració d'LPS vam trobar hipertriglicèridèmia, inducció de l'expressió d'iNOS, sobreproducció d'NO i una disminució generalitzada de l'activitat LPL en teixits. De manera preliminar, vàrem avaluar la sensibilitat de l'LPL a una potencial nitració mitjançant el tractament *in vitro* d'LPL bovina amb peroxinitrit, una RNS. La nitració es va confirmar mitjançant *western blot* anti-nitrotirosina i amb la posterior identificació, mitjançant espectrometria de masses en tàndem, de seqüències específiques de l'LPL que contenien nitrotirosines. En base a aquests resultats, una anàlisi per espectrometria de masses dirigida va revelar l'existència de tres residus de tirosina nitrats *in vivo* en LPL de cor de rates tractades amb LPS. Així, aquest estudi és el primer que identifica tirosines nitrades en l'LPL, tant *in vitro* com *in vivo*, i demostra que l'LPL és una diana per a les RNS en l'endotoxèmia. Aquests resultats indiquen que la nitració de l'LPL pot constituir un nou mecanisme de regulació de l'activitat LPL *in vivo*.

Resultats complementaris

Efecte de l'administració *in vivo* de TNF α sobre la trigliceridèmia, la producció d'NO i l'activitat LPL en rata

Prèviament a l'estudi amb LPS que es descriu a l'article 4, vam dur a terme un estudi que consistí en l'administració *in vivo* de TNF α , també amb l'objectiu d'induir l'expressió de la iNOS i provocar la síntesi d'alts nivells d'NO *in vivo*. No obstant, a diferència dels resultats obtinguts en l'experiment d'LPS, només es va estimular lleugerament l'expressió d'iNOS en el fetge 6 hores després de l'administració de TNF α (figura 39). A més, aquesta expressió a fetge va ser transitòria ja que en l'anàlisi d'aquest teixit 24 hores després de l'administració de TNF α no vàrem detectar iNOS (no mostrat). D'acord amb aquest resultat, 6 hores després de l'administració de la citoquina es va observar un augment dels nivells de nitrat a plasma (taula 6) menys pronunciat que en l'experiment d'LPS (article 4, taula 1).

D'altra banda, contràriament al que descriu la literatura, l'administració de TNF α no va provocar cap augment dels TAG circulants però sí vam detectar canvis en l'activitat LPL ja observats en estudis anteriors [140,141]: baixada d'activitat LPL en teixit adipós blanc i augment en plasma i en cor (taula 6). Pensem que una possible explicació a la inducció parcial de l'expressió de la iNOS i a la manca d'augment de la trigliceridèmia, seria que la dosi de TNF α emprada va provocar únicament una resposta parcial al tractament. A més, en un altre experiment emprant un lot diferent de TNF α , vam observar un menor grau de resposta (no mostrat) que en l'experiment descrit més amunt (taula 6), la qual cosa incrementa les fonts de variabilitat en la resposta obtinguda en aquest model experimental.

En conjunt, aquests resultats ens van portar a estudiar la potencial nitració de l'LPL en un altre model de sobreproducció d'NO, com és l'administració *in vivo* d'LPS (vegeu article 4).

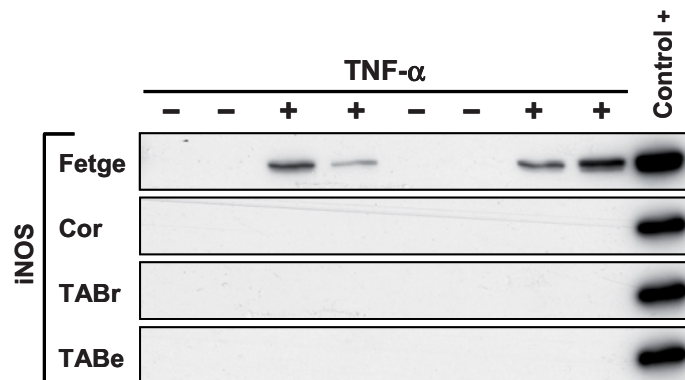


Figura 39. Efecte de l'administració de TNF α sobre l'expressió d'iNOS a diferents teixits. Western blot anti-iNOS en teixits de rata obtinguts 6 hores després de l'administració de TNF α . Cada carril correspon a un animal diferent. Com a control positiu vam emprar un lisat de macròfags de rata estimulats amb LPS i TNF α . TABr, teixit adipós blanc retroperitoneal; TABe, teixit adipós blanc epididimal.

Temps després de l'administració	6 h		24 h	
	Salí	TNF	Salí	TNF
Paràmetres plasmàtics				
TAG (mM)	1,38 ± 0,34	0,84 ± 0,09	1,14 ± 0,14	0,51 ± 0,07
Nitrat (µM)	14,7 ± 2,4	40,9 ± 6,1**	27,0 ± 0,4	16,3 ± 0,3
Activitat LPL				
Plasma (mU/mL)	0,70 ± 0,09	1,87 ± 0,25**	0,94 ± 0,21	1,54 ± 0,21
Cor (mU/g)	335 ± 61	660 ± 39***	302 ± 12	606 ± 46**
Múscul (mU/g)	8,91 ± 1,16	12,1 ± 1,2	9,42 ± 1,09	12,2 ± 1,4
TABr (mU/g)	190 ± 28	80 ± 9**	220 ± 4	110 ± 26**
TABe (mU/g)	335 ± 57	174 ± 23*	366 ± 21	153 ± 14**

Taula 6. Efecte de l'administració de TNF α sobre paràmetres plasmàtics i l'activitat LPL. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard (n=3-4). La comparació estadística s'ha fet mitjançant una anàlisi de la variança (ANOVA) de dos factors (temps i tractament) seguit del test de Bonferroni. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, comparat amb el grup salí (control). L'anàlisi ANOVA també va mostrar un efecte significatiu del tractament amb TNF α sobre l'activitat LPL al múscul ($F=5,748$; $P=0,0375$), tot i que no es van trobar diferències significatives en el test posterior. TABr, teixit adipós blanc retroperitoneal; TABe, teixit adipós blanc epididimal.

Anàlisi de l'LPL de cor de rata tractada amb LPS mitjançant *western blot* anti-nitrotirosina i anti-LPL

Vàrem purificar parcialment l'LPL de cor de rates tractades amb LPS, mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose* (vegeu material i mètodes, pàg. 56), i vàrem analitzar diferents fraccions recollides durant el procés, mitjançant *western blot* anti-nitrotirosina i anti-LPL (figura 40). Al carril corresponent a l'elut de la columna s'observa una clara banda d'LPL (figura 40A) i, a la mateixa alçada, una banda molt lleu, que pràcticament no pot distingir-se del soroll de fons, en el *western blot* anti-nitrotirosina (figura 40B). La informació que pot extreure's d'aquest resultat és molt limitada ja que no permet distingir si es tracta d'una modificació de l'LPL o d'una altra proteïna amb el mateix pes molecular. Un *western blot* amb gels 2D hauria estat més informatiu i hauria permès resoldre l'ambigüitat del resultat del *western blot* en una dimensió. No obstant, la baixa sensibilitat del *western blot* anti-nitrotirosina en aquest tipus de mostra no va permetre aquesta anàlisi en gels 2D. Com a alternativa, vàrem emprar un mètode dirigit d'MS/MS per a la detecció de nitrotirosines en seqüències específiques de l'LPL (article 4, figura 5 i taula 3).

Tot i així, vam comparar, mitjançant *western blot* anti-LPL en gels 2D, el patró d'isoformes de pI de l'LPL de cor de rates tractades amb LPS amb el patró obtingut en l'LPL de cor de rates no tractades (figura 41). Els resultats mostren un perfil molt similar en ambdues condicions tot i que poden apreciar-se lleugeres diferències en el patró d'isoformes.

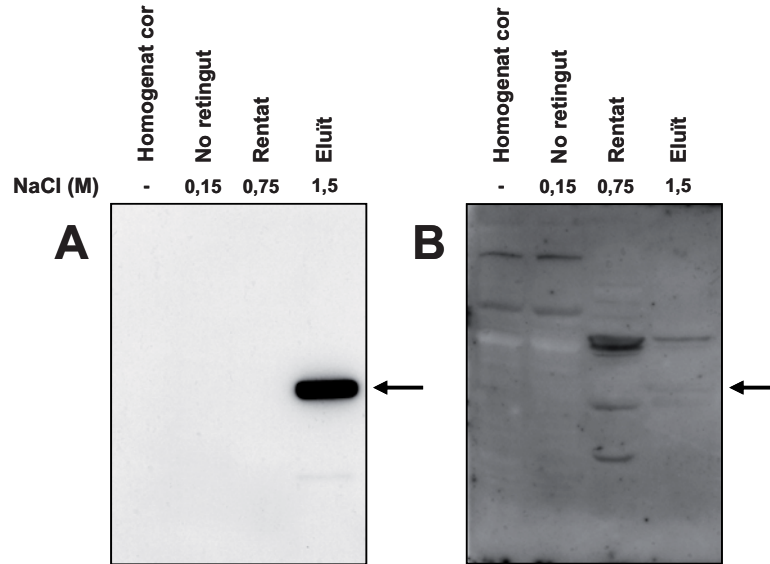


Figura 40. Detecció de nitro tirosina i d'LPL en fraccions recollides durant la purificació parcial de l'LPL de cor de rates tractades amb LPS. Els cors de les rates tractades amb LPS es van homogeneïtzar i l'LPL es va purificar parcialment mitjançant cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose* (vegeu material i mètodes, pàg. 56). *Western blot* anti-LPL –emprant l'anticòs 5D2 com a primari– (A) o anti-nitro tirosina (B) de fraccions recollides en diferents etapes del procés de purificació. El tipus de mostra s'indica a l'encapçalament de cada carril. La fletxa indica el pes molecular de l'LPL.

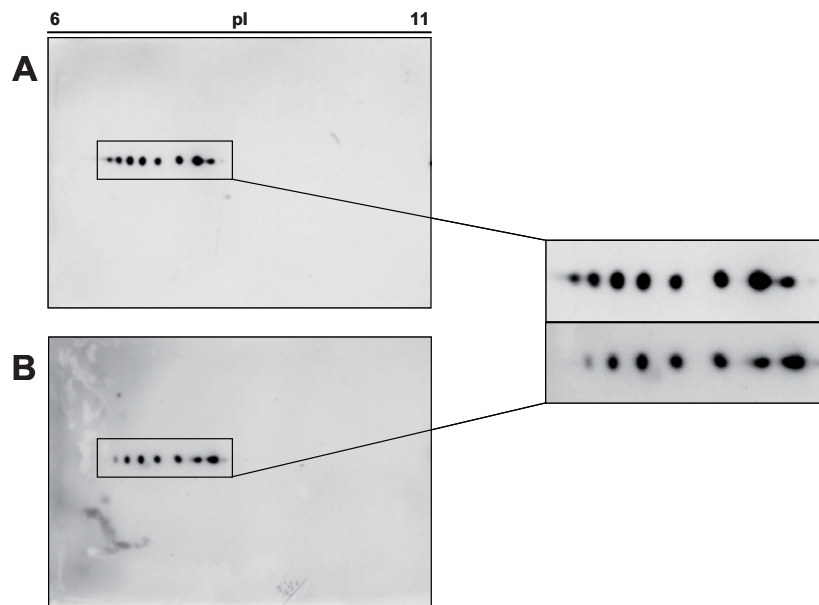


Figura 41. Comparació del patró d'isoformes de pI de l'LPL de cor de rates control (A) i de rates tractades amb LPS (B). Anàlisi mitjançant electroforesi en dues dimensions i *western blot* anti-LPL –emprant l'anticòs 5D2 com a primari–. L'ampliació mostra lleugeres diferències entre ambdues situacions en la separació entre isoformes. A l'isoelectroenfocament es van emprar tires d'IPG de 7 cm i pH 6-11.

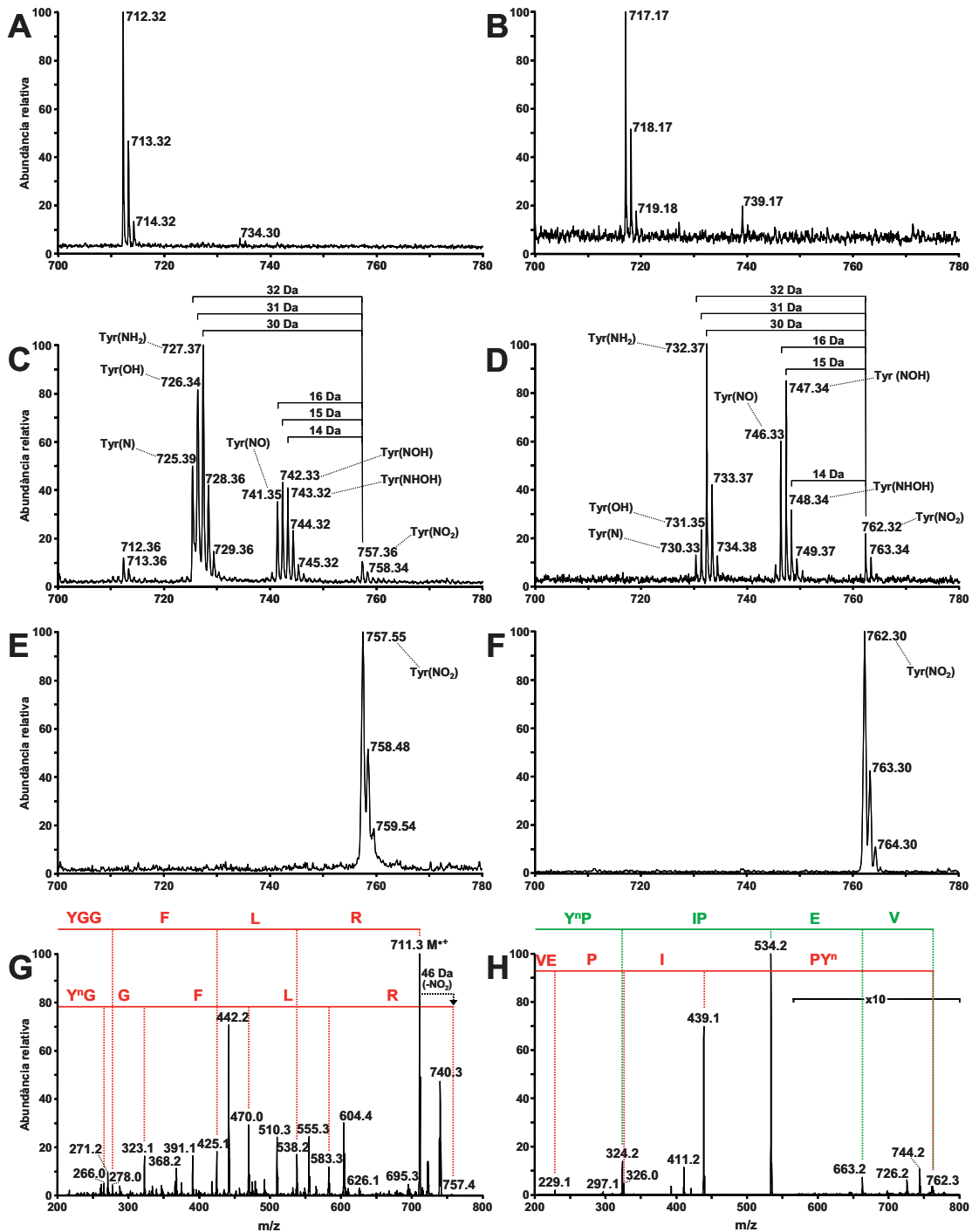


Figura 42. Anàlisi per espectrometria de masses de pèptids nitrats *in vitro*. Els pèptids YGGFLR ([M+H]⁺ = 712,4) (panells A, C, E i G) i VEPIPY ([M+H]⁺ = 717,4) (panells B, D, F i H) es van incubar amb peroxinitrit o amb una solució de NaOH com a control. A i B, espectres de MALDI-TOF dels pèptids incubats amb NaOH. Els pèptids nitrats (incubats amb peroxinitrit) es van analitzar per MALDI-TOF (C i D) i per ESI-MS (E i F). L'anàlisi per MALDI-TOF dels pèptids nitrats provoca l'aparició d'ions derivats de la descomposició del grup nitro. G i H, espectres MS/MS dels ions precursors dels panells E i F, respectivament. En l'anàlisi per MALDI-TOF es va utilitzar un espectròmetre de masses Voyager DE PRO (Applied Biosystems), matriu d'àcid 2,5-dihidroxibenzoic i un rang m/z de 650 a 1000. L'anàlisi per ESI-MS es va fer amb una trampa iònica lineal (LCQ, Thermo Fisher Scientific) equipada amb una font d'ionització de tipus nESI (Protana, actualment Proxeon). Yⁿ, tirosina nitrada.

Detecció de nitrotirosines mitjançant espectrometria de masses en pèptids nitrats *in vitro*

En una primera aproximació per a la posada al punt de l'anàlisi de tirosines nitrades mitjançant espectrometria de masses vam tractar *in vitro* dos pèptids que contenen tirosines a la seva seqüència (YGGFLR, $[M+H]^+ = 712,4$; i VEPIPY, $[M+H]^+ = 717,4$) amb una solució de peroxinitrit 90 mM (en NaOH 0,5-1 M), per induir la nitració de les tirosines (vegeu material i mètodes, pàg. 69), o amb una solució de NaOH 0,5 M com a control. La figura 42 (A i B) mostra els espectres de MALDI-TOF dels pèptids tractats amb NaOH (no nitrats). A cada espectre s'observa el pic corresponent al pèptid no modificat i un petit pic amb un canvi de massa de +22 Da que correspon a la formació d'un adducte de sodi. Pel que fa als pèptids tractats amb peroxinitrit, l'anàlisi per MALDI-TOF mostra un pic minoritari a +45 Da (m/z 757,36 per al pèptid YGGFLR -figura 42C- i m/z 762,32 per al pèptid VEPIPY -figura 42D-) corresponent al canvi de massa induït per la nitració del residu de tirosina. A més, en aquests espectres s'observen diversos pics amb un m/z intermedi entre l' m/z del pèptid no modificat i el del pèptid nitrats. D'acord amb la literatura [223,224], aquests pics segurament corresponen a formes derivades de la descomposició fotoquímica del grup nitro durant el procés de desorció/ionització del pèptid. A la figura s'indica una possible interpretació d'aquests pics basada en treballs anteriors [223,224].

En contrast amb l'anàlisi per MALDI-TOF, l'estudi dels pèptids tractats amb peroxinitrit mitjançant ESI-MS (figura 42 E i F) mostra únicament l'ió corresponent al pèptid nitrats i posa de manifest la idoneïtat d'aquest tipus de ionització per a l'anàlisi de pèptids que continguin nitrotirosines. Els espectres MS/MS d'aquests ions precursors permeten deduir la seqüència del pèptid (figura 42 G i H, en vermell es presenta la sèrie d'ions *b* i en verd la sèrie d'ions *y*).

Així, considerant la descomposició del grup nitro associada a l'anàlisi per MALDI-TOF, l'estudi posterior de la nitració de l'LPL, tant *in vitro* com *in vivo*, es va fer per LC-ESI-MS/MS (vegeu material i mètodes, pàg. 74), com es descriu a l'article 4.

6. RESUM GLOBAL

La lipoproteïna lipasa (LPL) és un enzim que desenvolupa un paper central en el metabolisme lipídic de l'organisme i està sotmesa a una regulació específica de teixit que fa que davant d'una determinada situació fisiològica la seva activitat augmenti en uns teixits i es vegi disminuïda en altres, controlant així el flux de triacilglicerols (TAG) circulants a l'organisme. La regulació en cada cas depèn de la naturalesa del teixit i de l'ús que aquest fa dels àcids grassos que capta mitjançant l'acció lipolítica de l'LPL. En aquest sentit, quan un organisme es troba en una situació que podríem denominar basal (en repòs i amb lliure accés a l'aliment), trobem nivells elevats d'activitat LPL en el teixit adipós blanc (TAB), que utilitza els àcids grassos no esterificats (NEFA) per emmagatzemar reserves lipídiques en forma de TAG. En canvi, quan l'organisme afronta situacions en què es requereix la mobilització d'aquestes reserves com és el cas de l'exercici físic, el dejuni o l'estrès, es dona un increment d'activitat LPL a teixits com el múscul o el cor i una disminució en el TAB. En aquest context, es produeix un canvi en el paper metabòlic del TAB atès que passa d'una situació d'acumulació de greixos a una altra de mobilització de reserves tot posant aquest substrat energètic a l'abast d'altres teixits.

Aquest treball es va iniciar amb l'estudi de l'efecte d'un estrès agut per immobilització (IMMO) –de fins a 30 minuts– sobre l'activitat LPL de diversos teixits en rata. Una petita prospecció al metabolisme dels individus d'aquest primer experiment (article 1, figura 3) ens mostra un pronunciat increment de la glucèmia, un paràmetre que s'ha descrit com a bon indicador d'una situació d'estrès agut [178]. També s'observa un augment en els nivells de NEFA, glicerol i cossos cetònics. Aquests tres paràmetres evidencien que s'ha produït una activació de la lipòlisi, segurament per acció de la triacilglicerol lipasa de l'adipós (ATGL) i de la lipasa sensible a hormones (HSL) del teixit adipós blanc [225], posant a l'abast d'altres teixits glicerol i NEFA. Aquests NEFA són captats, en part, pel fetge i emprats en la síntesi de cossos cetònics, que són reexportats per sang a la resta de teixits per a la seva utilització com a substrat energètic.

Paral·lelament, la IMMO provoca un **ràpid descens (5 minuts) de l'activitat LPL al TAB retroperitoneal** (article 1, figura 4). L'aparent especificitat de resposta per aquest paquet de teixit adipós (atès que no s'observen canvis significatius d'activitat en el TAB epididimal ni en el TAB mesentèric) també s'observà en un estudi anterior realitzat en el nostre grup en resposta a estrès agut per IMMO [77], tot i que les causes d'aquesta especificitat encara no han estat resoltes. La disminució d'activitat LPL en el TAB retroperitoneal, que pot interpretar-se com una resposta a la necessitat de l'organisme de mobilitzar ràpidament les reserves per fer front a la situació d'estrès, coincideix en el temps amb un **increment d'activitat LPL a plasma** (article 1, figura 5). Aquest increment d'activitat LPL circulant a temps molt curts després de l'inici de la IMMO ja havia estat observat en un estudi previ desenvolupat en el nostre laboratori en rates canulades per l'aorta de manera permanent (article 1, figura 2).

La localització de l'LPL funcional, ancorada a l'endoteli dels vasos sanguinis, condiciona i limita els mecanismes pels quals pot estar regulada la seva activitat. En el nostre cas la simultaneïtat del descens d'activitat LPL i de l'augment a plasma, ja observada anteriorment en el nostre grup en estudis d'administració *in*

vivo d'adrenalina [125] i d'estrès per IMMO [77] podria explicar-se, com a mínim, de dues maneres: (i) mitjançant un alliberament a la sang de l'LPL ancorada a l'endoteli dels vasos o (ii) mitjançant una disminució de la degradació hepàtica de l'LPL circulant i la disminució simultània de la síntesi o activació de l'LPL al TAB. El fet que aquest fenomen s'observi a temps molt curts (5 minuts) i la necessitat que s'activin simultàniament dos processos diferents perquè es compleixi la segona hipòtesi ens fa decantar-nos per la primera opció.

En estudis anteriors s'ha descrit que les catecolamines i l'isoproterenol inhibeixen selectivament l'activitat LPL del teixit adipós blanc, reduint la transcripció del gen de l'LPL [126], regulant la traducció [91] i la maduració posttraduccional de l'enzim [127] o induint la seva degradació [128]. No obstant, cap d'aquests mecanismes permet explicar la ràpida resposta que observem. Per això suggerim que l'increment d'activitat LPL que s'observa a plasma amb 5 minuts d'IMMO podria ser degut a l'alliberament de l'enzim des de l'endoteli capil·lar del TAB retroperitoneal.

La literatura descriu diversos candidats que podrien actuar alliberant l'LPL: lipoproteïnes riques en TAG [95], emulsions de TAG [226], el TNF α [145] o els NEFA [95,227]. En efecte, alguns autors han suggerit que els NEFA, que augmenten de manera ràpida i transitòria durant l'estrès agut (article 1, figura 3), podrien alliberar *in vivo* l'LPL activa des dels teixits [95,227], mentre que altres estudis de perfusió de NEFA en cor [228] i en TAB epididimal de rata [229] aporten resultats discordants amb aquests. Per la seva banda, Lookene i col. [62] han estudiat *in vitro* l'efecte del flux sobre la unió de l'LPL als heparan sulfat demostrant que aquest factor, per si sol, és insuficient per provocar l'alliberament de l'LPL. En aquest sentit, un treball desenvolupat en el nostre laboratori demostra que l'estrès agut per IMMO provoca un increment del flux sanguini de més del 100% en els TAB epididimal i retroperitoneal de rata [77]. Més recentment s'han plantejat altres factors locals que podrien intervenir en aquesta regulació. És el cas de l'òxid nítric (NO), àmpliament descrit com a principal modulador del flux sanguini a nivell local [230] i que alguns estudis han proposat com a mediador d'una disminució de l'activitat l'LPL en teixits en resposta a l'administració *in vivo* de lipopolisacàrid (LPS) [157] o al tractament d'adipòcits marrons en cultiu amb factor de necrosi tumoral alfa (TNF α) [142].

Una manera d'avaluar la síntesi d'NO és la quantificació de nitrat circulant ja que l'NO que difon a la sang reacciona majoritàriament amb l'oxihemoglobina dels eritròcits formant nitrat [218,219]. En el nostre experiment trobem un increment dels nivells de nitrat a plasma en el període d'estrès per IMMO (figura 22, pàg. 97). Igualment, altres resultats obtinguts al nostre laboratori mostren, mitjançant estudis histoquímics, un augment en la capacitat de producció d'NO en els teixits adiposos epididimal i mesentèric de rates estressades crònicament [176]. A més, en favor d'un potencial paper de l'NO en l'alliberament de l'LPL des de l'endoteli a la sang, convé destacar un altre estudi desenvolupat en el nostre laboratori en què la perfusió *in situ* d'un donador d'NO al TAB epididimal provoca un alliberament de l'LPL de l'endoteli vascular al medi de perfusió [220]. Així, existeixen diversos treballs que relacionen de manera indirecta l'NO i l'LPL, però mai no s'ha estudiat una eventual interacció directa entre l'LPL i l'NO o les espècies

reactives del nitrogen (RNS) ni s'ha descrit cap modificació posttraduccional de l'LPL derivada de la seva interacció amb les RNS.

La regulació de proteïnes per efecte de l'NO és un camp emergent. S'ha especulat molt sobre els efectes que poden tenir aquest tipus de modificacions en la funció i la regulació de les proteïnes i s'han descrit diversos aminoàcids –tirosina, cisteïna i triptòfan, entre d'altres– que serien sensibles a l'acció de l'NO o dels seus derivats [169,171]. La modificació de l'aminoàcid tirosina a 3-nitrotirosina és relativament estable i s'ha descrit com a marcador de la interacció d'aquest residu i, per extensió, de la proteïna o pèptid que el conté, amb NO o els seus derivats [170].

En una aproximació preliminar a l'estudi d'una eventual nitració de l'LPL, vam analitzar, mitjançant *western blot* anti-LPL i anti-nitrotirosina, plasmes de rates control i de rates sotmeses a diferents temps d'estrès per IMMO. El resultat va mostrar que una de les bandes del *western blot* anti-nitrotirosina coincideix amb el pes molecular de l'LPL (figura 23, pàg. 98). Aquesta dada, tot i suggerir una possible nitració de l'LPL, no permetia determinar si es tractava d'una modificació de l'LPL o d'una altra proteïna del mateix pes molecular. Per això, vam proposar-nos reproduir l'anàlisi per *western blot* emprant electroforesi en dues dimensions (2DE) per millorar la resolució de les proteïnes.

Per a la posada al punt del *western blot* anti-LPL en gels 2D vàrem emprar inicialment LPL bovina comercial com a estàndard i l'anticòs policlonal P66 (cedit pel Dr. T. Olivecrona, Universitat d'Umeå, Umeå, Suècia) per a la detecció de l'enzim. Els resultats van mostrar dues dades sorprenents que havien passat desapercebudes en l'anàlisi en una dimensió: (i) l'LPL bovina comercial conté uns nivells elevats d'antitrombina III, una proteïna contaminant amb un pes molecular similar al de l'LPL, i (ii) **l'anticòs policlonal P66 és inespecífic** perquè, a més de detectar l'LPL també reconeix l'antitrombina III (article 2, figura 2). Aquest resultat, a més d'obligar-nos a buscar un anticòs alternatiu per a la immunodetecció de l'LPL, alerta sobre la importància de validar l'especificitat dels anticossos anti-LPL mitjançant l'ús d'electroforesi en dues dimensions. De fet, les estratègies emprades originalment per validar l'especificitat de l'anticòs P66 són similars a les utilitzades en diferents laboratoris per validar altres anticossos [231-233], de manera que la inespecificitat detectada en l'anticòs P66 podria donar-se també en altres anticossos. Igualment, cal destacar que la purificació incompleta de l'LPL bovina comercial desaconsella el seu ús com a immunogen per a l'obtenció d'anticossos anti-LPL, com han fet servir altres autors en treballs anteriors [234,235].

La comprovació que la inespecificitat de l'anticòs P66 també afectava les mostres de plasma de rata (article 2, figura 4) ens portà a concloure que, en el millor dels casos, havíem sobreestimat els nivells d'LPL en aquestes mostres en l'anàlisi per *western blot* en una dimensió. Això ens obligà a reinterpretar els resultats obtinguts anteriorment i, com tractarem més endavant, a reformular la nostra estratègia de treball.

Així doncs, un pas previ indispensable per a la continuació de l'estudi de la potencial nitració de l'LPL fou la cerca d'un anticòs específic alternatiu a l'anticòs P66. Inicialment, vàrem avaluar el possible ús de l'anticòs GB1 (desenvolupat en el nostre laboratori en col·laboració amb l'empresa Eurogentec, Seraing, Bèlgica) però

la manca de resultats positius ens van portar a utilitzar finalment l'anticòs monoclonal 5D2 (cedit pel Dr. J. D. Brunzell, Universitat de Washington, WA, EUA). L'anticòs 5D2 aviat es mostrà com una alternativa fiable per a la detecció específica de l'LPL bovina comercial (article 2, figura 2). No obstant, la detecció de l'LPL de rata en mostres biològiques requereix: (i) l'ús de mostres amb elevats nivells d'activitat LPL (com homogenat de cor o plasma postheparínic), (ii) grans quantitats de mostra inicial i (iii) la purificació parcial de l'enzim (article 3, figura 1). La necessitat d'aquest procediment per a la detecció de l'LPL de rata pot explicar-se, d'una banda, per la menor afinitat de l'anticòs 5D2 per l'LPL de rata respecte a l'LPL bovina descrita anteriorment [236], i de l'altra, perquè els nivells d'LPL en les mostres biològiques són, probablement, molt més baixos del que podria pensar-se a partir dels resultats obtinguts amb l'anticòs P66.

En conjunt, aquesta estratègia ens va permetre validar l'especificitat de l'anticòs 5D2 per a la immunodetecció d'LPL en mostres de rata i ens conduí, de manera inesperada, al descobriment d'**isoformes de pI de l'LPL de rata** (article 3, figura 2). En una breu aproximació a l'origen d'aquesta heterogeneïtat de pI hem pogut descartar tant que les diferents isoformes corresponguin a formes intermèdies de maduració intracel·lular de la proteïna com que siguin degudes a una eventual fosforilació de l'enzim (article 3, figura 4). En contrast, els nostres resultats posen de manifest que els oligosacàrids units a l'LPL estan implicats en part en aquesta heterogeneïtat de pI però que també hi han d'estar implicades altres modificacions posttraduccionals (article 3, figura 4). Aquesta nova característica de l'LPL augmentarà presumiblement la complexitat dels estudis de l'LPL i posa de manifest la importància d'aprofundir en la caracterització de la glicosilació de l'enzim, així com en l'estudi de les diferències moleculars entre isoformes i de les possibles implicacions funcionals que se'n derivin.

Malgrat que mai s'havia descrit l'existència d'isoformes de l'LPL, alguns autors havien suggerit l'existència de variants d'LPL específiques de teixit en descriure que l'LPL purificada de diferents teixits presenta diferències en l'activitat específica, lleugeres diferències en el seu pI i diferent immunoreactivitat amb anticossos anti-LPL [57,97]. El descobriment de les isoformes de pI de l'LPL que es descriu en el present treball, obre la porta a l'estudi de les isoformes de pI en els diferents teixits i a l'anàlisi d'una hipotètica relació d'aquestes isoformes amb la, encara poc caracteritzada, regulació específica de teixit de l'LPL.

Com hem descrit més amunt, la sensibilitat de la metodologia emprada i els baixos nivells d'LPL en les mostres biològiques requereixen mostres riques en LPL i una gran quantitat inicial de mostra per a la detecció i l'estudi de l'LPL de rata. Així, considerant el volum de mostra necessari per a la detecció de l'LPL en plasma postheparínic es feia inviable estudiar una possible nitració de l'LPL en plasmes preheparínics. Això ens va portar a reformular la nostra hipòtesi i el model d'estudi inicials. En aquest sentit, amb l'objectiu de centrar la nostra recerca en l'estudi d'una potencial nitració *in vivo* de l'LPL, vam trobar que l'estrès, tot i ser un model en què es produeix òxid nítric (figura 22, pàg. 97), no és el model òptim atès que (i) en tractar-se d'una situació fisiològica la resposta és força variable entre individus i (ii) els nivells d'NO que s'assoleixen no són tan alts com els que s'observen en altres situacions.

En efecte, de les tres isoformes de les òxid nítric sintases (NOS) que existeixen (nNOS, iNOS i eNOS), l'nNOS i l'eNOS s'expressen de manera constitutiva i generen nivells baixos d'NO (pmol-nmol), mentre que l'expressió de la iNOS, induïda per citoquines i endotoxines, produeix nivells alts d'NO (nmol- μ mol) [158,159]. En l'estrès agut per IMMO no es detecta l'expressió d'iNOS [220] però està àmpliament descrit que el TNF α activa l'expressió d'aquesta isoforma de les NOS [133]. D'altra banda, alguns treballs mostren un clar efecte del TNF α sobre l'activitat LPL de diferents teixits [140,141] i estudis *in vitro* apunten que el TNF α indueix l'alliberament de l'LPL des de les cèl·lules endotelials [145], sense especificar si aquest és un efecte directe de la citoquina o està mitjançat per altres factors. A més, en un estudi amb adipòcits marrons en cultiu, Uchida i col. [142] proposen que l'NO intervé com a mediador de la baixada d'activitat LPL que provoca el TNF α en demostrar que l'ús d'inhibidors de les NOS reverteix els efectes de la citoquina.

D'acord amb aquests antecedents vam plantejar un segon model experimental en rata, consistent en l'administració *in vivo* de TNF α , per a l'estudi d'una potencial nitració de l'LPL. Les variacions d'activitat LPL que vàrem trobar coincideixen amb les descrites en estudis anteriors [140,141]: descens de l'activitat LPL en TAB i augment en plasma i en cor (taula 6, pàg. 162). No obstant, l'activació de l'expressió d'iNOS i els nivells de síntesi d'NO no van ser els esperats (figura 39, pàg. 161 i taula 6, pàg. 162). A més, la manca d'augment dels TAG circulants (taula 6, pàg. 162), una resposta àmpliament descrita en aquestes condicions, també evidencià alguna diferència en la resposta al tractament. Igualment, l'obtenció de resultats divergents emprant diferents lots de TNF α incrementa les fonts de variabilitat i posa de manifest la complexitat de l'estudi d'aquest model experimental.

A més, el fet que les variacions d'activitat LPL al TAB s'hagin produït sense l'activació de l'expressió d'iNOS en aquest teixit suggereixen que, en aquest model d'administració *in vivo* de TNF α , la regulació de l'activitat LPL en el TAB es dona de manera independent a la producció d'NO per part de la iNOS, tot i que no es pot descartar la participació de l'NO sintetitzat per altres isoformes de les NOS, com l'eNOS. Aquest resultat mostra una aparent contradicció amb les dades descrites *in vitro* per Uchida i col. [142] malgrat que no es pot descartar que aquesta divergència sigui deguda a diferències en la resposta entre el TAB i el teixit adipós marró o, simplement, a les diferents característiques d'ambdós estudis.

A la vista d'aquests resultats vam plantejar un tercer model experimental, també en rata, consistent en l'administració *in vivo* d'LPS. D'acord amb la literatura, l'administració d'LPS també indueix l'expressió d'iNOS [133] i és l'únic model en què s'ha establert una relació entre la síntesi d'NO i la regulació de l'activitat LPL *in vivo*. L'administració d'LPS indueix un augment dels TAG circulants que, com a mínim en part, és conseqüència d'una baixada en el catabolisme de les lipoproteïnes riques en TAG deguda a una inhibició de l'activitat LPL dels teixits a nivell posttranscripcional [156,157]. En un estudi anterior, Picard i col. [157] van aportar la principal evidència d'una relació causa-efecte entre l'activació de la iNOS i la inhibició de l'LPL en demostrar que l'ús d'aminoguanidina (un inhibidor de la iNOS) evita la hipertrigliceridèmia i la baixada d'activitat LPL

que indueix l'LPS en el múscul (però no la del TAB). No obstant, aquest estudi anterior no estableix si la relació entre l'NO i l'LPL es produeix de forma directa o indirecta; de manera que nosaltres, aprofitant la metodologia que havíem desenvolupat per a l'anàlisi de l'LPL mitjançant eines proteòmiques, vam plantejar l'estudi de la potencial nitració *in vivo* de l'LPL en resposta a l'administració d'LPS.

En una primera aproximació experimental vàrem observar hipertrigliceridèmia, activació de l'expressió d'iNOS, sobreproducció d'NO i una davallada generalitzada de l'activitat LPL en teixits 6 hores després de l'administració de l'endotoxina (article 4, figura 1 i taula 1). En el nostre cas, a diferència del que descriuen Picard i col. [157] vam observar una baixada no significativa d'activitat LPL al múscul. Considerant que (i) l'administració d'LPS provoca una baixada significativa de l'activitat LPL al cor (article 4, taula 1) i (ii) altres articles també descriuen que l'LPL de cor es regula a nivell posttranscripcional en resposta a LPS [155,156], vàrem estudiar la potencial nitració de l'LPL en cor de rata.

La nitració de tirosines en proteïnes s'ha descrit com un procés selectiu en què només es nitren algunes proteïnes i una petita proporció de cada una d'elles [237]. Per aquest motiu, en la cerca de nitrotirosines en l'LPL vam dur a terme una anàlisi dirigida, més sensible (article 4, taula 2), per a la detecció selectiva de pèptids específics de l'LPL cercats en la seva forma potencialment nitrada. En una aproximació preliminar per avaluar la sensibilitat de l'LPL a la nitració, vam tractar *in vitro* LPL bovina amb peroxinitrit, una RNS. Mitjançant *western blot* anti-nitrotirosina vàrem comprovar la nitració de l'enzim (article 4, figura 2) i mitjançant espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) vàrem identificar seqüències específiques de l'LPL que contenien nitrotirosines (article 4, figura 3 i taula 3). A més, vàrem utilitzar els espectres MS/MS dels pèptids nitrats obtinguts en aquesta aproximació preliminar com a estàndard en l'anàlisi posterior de la possible nitració *in vivo* de l'LPL de rata.

En conjunt, aquesta estratègia ens ha portat a demostrar, per primera vegada, que **l'LPL és sensible a la nitració, tant *in vitro* com *in vivo*** (article 4, figura 5 i taula 3). Aquests resultats suggereixen que la nitració pot constituir un nou mecanisme de regulació de l'activitat LPL *in vivo* i obre les portes a l'estudi d'altres modificacions derivades de l'NO, com ara la nitrosilació de cisteïnes, i a l'estudi de la nitració de tirosines en altres situacions fisiològiques en què es produeixen nivells més baixos d'NO, com ara l'estrès.

També caldria abordar l'estudi en profunditat dels mecanismes implicats en la baixada d'activitat LPL en teixits que pot derivar-se de la nitració de l'enzim. Aquesta disminució d'activitat LPL podria ser deguda, entre altres causes, a: (i) un alliberament de l'LPL des de l'endoteli a la circulació, (ii) l'alteració directa del centre actiu, o (iii) la monomerització del dímer funcional de l'LPL. En favor de la primera possibilitat, que ja havíem plantejat en la resposta a l'estrès, trobem un augment en la concentració d'LPL en plasma 6 hores després de l'administració d'LPS (article 4, taula 1). No obstant, en aquest mateix grup l'activitat LPL en plasma també tendeix a augmentar, tot i que en menor grau, la qual cosa suggereix que també pot donar-se una inactivació directa de l'enzim. De fet, una de les tirosines que hem trobat nitrada (Tyr 164) es troba a prop d'un dels residus que conformen la tríada catalítica de l'LPL (Asp 156), evidenciant l'accessibilitat de les

RNS al centre actiu. Així doncs, a partir dels resultats descrits en aquest treball poden sorgir altres estudis orientats a la caracterització detallada dels mecanismes implicats en la baixada d'activitat LPL induïda per la nitració de l'enzim.

En definitiva, l'aplicació d'eines proteòmiques a l'estudi de l'LPL ens ha portat a demostrar la **nitració *in vivo*** de l'LPL, que podria constituir un mecanisme de regulació de l'enzim no descrit fins ara, i al descobriment d'**isoformes de pI** de l'LPL que pot marcar un punt d'inflexió en l'estudi d'aquest enzim. A més, des del punt de vista metodològic, el present treball estableix les bases per a estudis futurs adreçats a la caracterització molecular de les isoformes de pI de l'LPL i l'anàlisi de la nitració de l'LPL en altres condicions.

7. CONCLUSIONS

- **L'estrès agut per immobilització en rata provoca un ràpid descens (5 minuts) de l'activitat lipoproteïna lipasa (LPL) del teixit adipós blanc retroperitoneal concomitant amb un increment de l'activitat LPL en plasma.** Això suggereix que l'alliberament de l'enzim de l'endoteli a la sang pot constituir un mecanisme ràpid de regulació de l'activitat LPL en teixit, implicat en la redistribució de substrats energètics entre teixits necessària en la preparació de l'organisme per a la resposta de "lluita o fugida".
- **L'anticòs policlonal P66 és inespecífic perquè reconeix l'LPL, però també l'antitrombina III.** Aquesta inespecificitat, que podria explicar-se per una purificació incompleta de l'LPL emprada com a immunogen, similar a l'observada en l'LPL bovina comercial, alerta sobre la validesa de resultats obtinguts amb aquest anticòs i denota la necessitat d'emprar noves estratègies per validar l'especificitat dels anticòsos anti-LPL. L'ús d'electroforesi en dues dimensions i *western blot*, juntament amb la identificació de proteïnes per espectrometria de masses, representa una alternativa fiable per determinar aquesta especificitat i avaluar la puresa de l'LPL utilitzada com a immunogen.
- **L'LPL de rata presenta isoformes de punt isoelectríc.** En conseqüència, l'LPL no hauria de ser considerada com una proteïna amb unes propietats fisicoquímiques úniques sinó com un conjunt d'isoformes amb propietats fisicoquímiques específiques. L'heterogeneïtat de punt isoelectríc observada no correspon a formes intermèdies de maduració intracel·lular de l'LPL ni a una eventual fosforilació de l'enzim, però sí que podria explicar-se parcialment per la glicosilació de l'LPL, tot i que deuen estar implicades altres modificacions posttraduccional.
- **L'LPL de rata es nitra *in vivo* en resposta a l'administració de lipopolisacàrid.** El tractament amb lipopolisacàrid induïx una disminució generalitzada de l'activitat LPL en teixits, l'activació de l'expressió de l'òxid nítric sintasa induïble i un augment de la síntesi d'òxid nítric en l'organisme. La detecció de nitrotirosines en seqüències específiques de l'LPL demostra la sensibilitat d'aquest enzim a la reacció amb espècies reactives del nitrogen, tant *in vitro* com *in vivo*. Aquesta modificació posttraduccional de l'LPL, no descrita anteriorment, podria constituir un nou mecanisme de regulació *in vivo* de l'activitat LPL en teixits.

8. BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Wong, H.; Schotz, M. C. 2002. The lipase gene family. *J. Lipid Res.* 43: 993-999.
- [2] Hahn, P. F. 1943. Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. *Science* 98: 19-20.
- [3] Anderson, N. G.; Fawcett, B. 1950. An antichylomicronemic substance produced by heparin injection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74: 768-71.
- [4] Anfinsen, C. B.; Boyle, E.; Brown, R. K. 1952. The role of heparin in lipoprotein metabolism. *Science* 115: 583-586.
- [5] Korn, E. D. 1955. Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. *J. Biol. Chem.* 215: 1-14.
- [6] Korn, E. D.; Quigley, T. W., Jr. 1957. Lipoprotein lipase of chicken adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 226: 833-839.
- [7] Korn, E. D. 1955. Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. II. Substrate specificity and activation of coconut oil. *J. Biol. Chem.* 215: 15-26.
- [8] Scanu, A. 1966. Serum high-density lipoprotein: effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase. *Science* 153: 640-641.
- [9] Ekman, R.; Nilsson-Ehle, P. 1975. Effects of apolipoproteins on lipoproteins lipase activity of human adipose tissue. *Clin. Chim. Acta* 63: 29-35.
- [10] Gurr, M. I.; Harwood, J. L.; Frayn, K. N. 2002. *Lipid Biochemistry* (5^a Ed.). Blackwell Science, Oxford, Regne Unit.
- [11] Mead, J.R.; Irvine, S.A.; Ramji, D. P. 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med.* 80: 753-769.
- [12] Vilaró, S.; Buscá, R.; Olivecrona, T.; Reina, M. 2003. Bases genéticas, moleculares y celulares de la quilomicronemia. Del llibre: *Patología molecular*. Editors: González Sastre, F.; Guinovart J. J. Masson, Barcelona, Espanya, pp. 181-218.
- [13] Pedersen, M. E.; Cohen, M.; Schotz, M. C. 1983. Immunocytochemical localization of the functional fraction of lipoprotein lipase in the perfused heart. *J. Lipid Res.* 24: 512-521.
- [14] Olivecrona, T.; Bengtsson-Olivecrona, G. 1987. Lipoprotein lipase from milk - the model enzyme in lipoprotein lipase research. Del llibre: *Lipoprotein lipase*. Editor: Borensztajn, J. Evener Publishers, Chicago, EUA, pp. 15-58.
- [15] Nilsson-Ehle, P. 1987. Measurements of lipoprotein lipase activity. Del llibre: *Lipoprotein lipase*. Editor: Borensztajn, J. Evener Publishers, Chicago, EUA, pp. 59-77.
- [16] Santamarina-Fojo, S.; Dugi, K. A. 1994. Structure, function and role of lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 5: 117-125.

- [17] Bengtsson-Olivecrona, G.; Olivecrona, T. 1991. Phospholipase activity of milk lipoprotein lipase. *Methods Enzymol.* 197: 345-356.
- [18] Scow, R. O.; Egelrud, T. 1976. Hydrolysis of chylomicron phosphatidylcholine in vitro by lipoprotein lipase, phospholipase A2 and phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* 431: 538-549.
- [19] Eisenberg, S.; Schurr, D.; Goldman, H.; Olivecrona, T. 1978. Comparison of the phospholipase activity of bovine milk lipoprotein lipase against rat plasma very low density and high density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 531: 344-351.
- [20] Stocks, J.; Galton, D. J. 1980. Activation of the phospholipase A1 activity of lipoprotein lipase by apoprotein C-II. *Lipids* 15: 186-190.
- [21] Cooper, A. D. 1997. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* 38: 2173-2192.
- [22] Camps, L.; Reina, M.; Llobera, M.; Vilaró, S.; Olivecrona, T. 1990. Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Am. J. Physiol.* 258: C673-C681.
- [23] Camps, L.; Reina, M.; Llobera, M.; Bengtsson-Olivecrona, G.; Olivecrona, T.; Vilaró, S. 1991. Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *J. Lipid Res.* 32: 1877-1888.
- [24] Blanchette-Mackie, E. J.; Masuno, H.; Dwyer, N. K.; Olivecrona, T.; Scow, R. O. 1989. Lipoprotein lipase in myocytes and capillary endothelium of heart: immunocytochemical study. *Am. J. Physiol.* 256: E818-E828.
- [25] Braun, J. E. A.; Severson D. L. 1992. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* 287: 337-347.
- [26] Helenius, A.; Aebi, M. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-2369.
- [27] Park, J.-W.; Oh, M.-S.; Yang, J.-Y.; Park, B.-H.; Rho, H.-W.; Lim, S.-N.; Jhee, E.-C.; Kim, H.-R. 1995. Glycosylation, dimerization, and heparin affinity of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1254: 45-50.
- [28] Semenkovich, C. F.; Luo, C.-C.; Nakanishi, M. K.; Chen, S.-H.; Smith, L. C.; Chan, L. 1990. In vitro expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. *J. Biol. Chem.* 265: 5429-5433.
- [29] Buscá, R.; Pujana, M. A.; Pognonec, P.; Auwerx, J.; Deeb, S. S.; Reina, M.; Vilaró, S. 1995. Absence of N-glycosylation at asparagine 43 in human lipoprotein lipase induces its accumulation in the rough endoplasmic reticulum and alters this cellular compartment. *J. Lipid Res.* 36: 939-951.
- [30] Ben-Zeev, O.; Doolittle, M. H.; Davis, R. C.; Elovson, J.; Schotz, M. C. 1992. Maturation of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 267: 6219-6227.

- [31] Ben-Zeev, O.; Mao, H. Z.; Doolittle, M. H. 2002. Maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277: 10727-10738.
- [32] Semb, H.; Olivecrona, T. 1989. The relation between glycosylation and activity of guinea pig lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 264: 4195-4200.
- [33] Masuno, H.; Schultz, C. J.; Park, J. W.; Blanchette-Mackie, E. J.; Mateo, C.; Scow, R. O. 1991. Glycosylation, activity and secretion of lipoprotein lipase in cultured brown adipocytes of newborn mice. Effect of tunicamycin, monensin, 1-deoxymannojirimycin and swainsonine. *Biochem. J.* 277: 801-809.
- [34] Carroll, R.; Ben-Zeev, O.; Doolittle, M. H.; Severson, D. L. 1992. Activation of lipoprotein lipase in cardiac myocytes by glycosylation requires trimming of glucose residues in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 285: 693-696.
- [35] Masuno, H.; Blanchette-Mackie, E. J.; Schultz, C. J.; Spaeth, A. E.; Scow, R. O.; Okuda, H. 1992. Retention of glucose by N-linked oligosaccharide chains impedes expression of lipoprotein lipase activity: effect of castanospermine. *J. Lipid Res.* 33: 1343-1349.
- [36] Vilella, E.; Joven, J. 1992. Lipoproteinlipasa. *Clin. Invest. Arteriosclerosis* 4: 122-132.
- [37] Vannier, C.; Ailhaud, G. 1989. Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. II. Processing, subunit assembly, and intracellular transport. *J. Biol. Chem.* 264: 13206-13216.
- [38] Cisar, L. A.; Hoogewerf, A. J.; Cupp, M.; Rapport, C. A.; Bensadoun, A. 1989. Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* 264: 1767-1774.
- [39] Saxena, U.; Klein, M. G.; Goldberg, I. J. 1991. Transport of lipoprotein lipase across endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2254-2258.
- [40] Obunike, J. C.; Lutz, E. P.; Li, Z.; Paka, L.; Katopodis, T.; Strickland, D. K.; Kozarsky, K. F.; Pillarisetti, S.; Goldberg I. J. 2001. Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 8934-8941.
- [41] Saxena, U.; Klein, M. G.; Goldberg, I. J. 1990. Metabolism of endothelial cell-bound lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 265: 12880-12886.
- [42] Semb, H.; Olivecrona, T. 1986. Nutritional regulation of lipoprotein lipase in guinea pig tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 876: 249-255.
- [43] Vilella, E.; Joven, J.; Fernández, M.; Vilaró, S.; Brunzell, J. D.; Olivecrona, T.; Bengtsson-Olivecrona, G. 1993. Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J. Lipid Res.* 34: 1555-1564.

- [44] Vilaró, S.; Llobera, M.; Bengtsson-Olivecrona, G.; Olivecrona, T. 1988. Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role. *Am. J. Physiol.* 254: G711-G722.
- [45] Yang, C.-Y.; Gu, Z.-W.; Yang, H.-X.; Rohde, M. F.; Gotto Jr., A. M.; Pownall, H. J. 1989. Structure of bovine milk lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 264: 16822-16827.
- [46] Raisonnier, A.; Etienne, J.; Arnault, F.; Brault, D.; Noé, L.; Chuat, J.-C.; Galibert, F. 1995. Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 111: 385-398.
- [47] Cooper, D. A.; Stein, J. C.; Strieleman, P. J.; Bensadoun, A. 1989. Avian adipose lipoprotein lipase: cDNA sequence and reciprocal regulation of mRNA levels in adipose and heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1008: 92-101.
- [48] Lindberg, A.; Olivecrona, G. 2002. Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals. *Gene* 292: 213-223.
- [49] Oku, H.; Ogata, H. Y.; Liang, X. F. 2002. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 131: 775-785.
- [50] Bonnet, M.; Leroux, C.; Chilliard, Y.; Martin P. 2000. Rapid communication: nucleotide sequence of the ovine lipoprotein lipase cDNA. *J. Anim. Sci.* 78: 2994-2995.
- [51] Wion, K. L.; Kirchgessner, T. G.; Lusic, A. J.; Schotz, M. C.; Lawn, R. M. 1987. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 235: 1638-1641.
- [52] Ranganathan, G.; Ong, J. M.; Yukht, A.; Saghizadeh, M.; Simsolo, R. B.; Pauer, A.; Kern, P. A. 1995. Tissue-specific expression of human lipoprotein lipase. Effect of the 3'-untranslated region on translation. *J. Biol. Chem.* 270: 7149-7155.
- [53] Bensadoun, A. 1991. Lipoprotein lipase. *Annu. Rev. Nutr.* 11: 217-237.
- [54] Cryer, A. 1987. Comparative biochemistry and physiology of lipoprotein lipase. Del llibre: Lipoprotein lipase. Editor: Borensztajn, J. Evener Publishers, Chicago, EUA, pp. 277-327.
- [55] Sato, K.; Akiba, Y.; Horiguchi, M. 1997. Species differences between chickens and rats in chemical properties of adipose tissue lipoprotein lipase. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A: 855-858.
- [56] Augustin, J.; Freeze, H.; Tejada, P.; Brown, W. V. 1978. A comparison of molecular properties of hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase from human post-heparin plasma. *J. Biol. Chem.* 253: 2912-2920.
- [57] Soteriou, A.; Cryer, A. 1993. Purification and characterization of lipoprotein lipase from the white adipose, skeletal muscle, cardiac muscle, mammary gland and lung tissues of the rat. *Int. J. Biochem.* 25: 1483-1490.

- [58] Bengtsson, G.; Olivecrona, T. 1977. Does lipoprotein lipase bind ampholytes? *Del llibre: Electrofocusing and isotachopheresis*. Editors: Radola B. J.; Graesslin, B. De Gruyter, Berlin, Alemanya, pp. 189-195.
- [59] van Tilbeurgh, H.; Roussel, A.; Lalouel, J. M.; Cambillau, C. 1994. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* 269: 4626-4633.
- [60] Winkler, F. K.; D'Arcy, A.; Hunziker, W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343: 771-774.
- [61] Kobayashi, Y.; Nakajima, T.; Inoue, I. 2002. Molecular modeling of dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *Eur. J. Biochem.* 269: 4701-4710.
- [62] Lookene, A.; Chevreuil, O.; Ostergaard, P.; Olivecrona, G. 1996. Interaction of lipoprotein lipase with heparin fragments and with heparan sulfate: stoichiometry, stabilization, and kinetics. *Biochemistry* 35: 12155-12163.
- [63] Emmerich, J.; Beg, O. U.; Peterson, J.; Previato, L.; Brunzell, J. D.; Brewer, H. B. Jr.; Santamarina-Fojo, S. 1992. Human lipoprotein lipase. Analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis of Ser-132, Asp-156, and His-241. *J. Biol. Chem.* 267: 4161-4165.
- [64] van Tilbeurgh, H.; Egloff, M. P.; Martinez, C.; Rugani, N.; Verger, R.; Cambillau, C. 1993. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 362: 814-820.
- [65] Dugi, K. A.; Dichek, H. L.; Santamarina-Fojo, S. 1995. Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 270: 25396-25401.
- [66] Fielding, C. J.; Fielding, P. E. 1976. Mechanism of salt-mediated inhibition of lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.* 17: 248-256.
- [67] Nykjaer, A.; Nielsen, M.; Lookene, A.; Meyer, N.; Røigaard, H.; Etzerodt, M.; Beisiegel, U.; Olivecrona, G.; Gliemann, J. 1994. A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells. *J. Biol. Chem.* 269: 31747-31755.
- [68] Preiss-Landl, K.; Zimmermann, R.; Hämmerle, G.; Zechner, R. 2002. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 471-481.
- [69] Vilaró, S.; Llobera, M.; Bengtsson-Olivecrona, G.; Olivecrona, T. 1988. Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization of the enzyme by immunofluorescence. *Biochem. J.* 249: 549-556.
- [70] Sabugal, R.; Robert, M. Q.; Julve, J.; Auwerx, J.; Llobera, M.; Peinado-Onsurbe, J. 1996. Hepatic regeneration induces changes in lipoprotein lipase activity in several tissues and its re-expression in the liver. *Biochem. J.* 318: 597-602.

- [71] Carneheim, C.; Nedergaard, J.; Cannon, B. 1984. Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *Am. J. Physiol.* 246: E327-E333.
- [72] Mahley, R. W.; Weisgraber, K. H.; Farese, R. V. Jr. 1998. Disorders of lipid metabolism. Del llibre: Williams textbook of endocrinology (9^a Ed.). Editors: Wilson, J. D.; Foster, D. W.; Kronenberg, H. M.; Larsen, P. R. W. B. Saunders Company, Philadelphia, EUA, pp. 1099-1153.
- [73] Zechner, R. 1997. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 8: 77-88.
- [74] Doolittle, M. H.; Ben-Zeev, O.; Elovson, J.; Martin, D.; Kirchgessner, T. G. 1990. The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J. Biol. Chem.* 265: 4570-4577.
- [75] Ruge, T.; Svensson, M.; Eriksson, J. W.; Olivecrona, G. 2005. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase in humans: effects of fasting. *Eur. J. Clin. Invest.* 35: 194-200.
- [76] Seip, R. L.; Angelopoulos, T. J.; Semenkovich, C. F. 1995. Exercise induces human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 268: E229-E236.
- [77] Ricart-Jané, D.; Cejudo-Martín, P.; Peinado-Onsurbe, J.; López-Tejero, M. D.; Llobera, M. 2005. Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. *J. Appl. Physiol.* 99: 1343-1351.
- [78] Giralt, M.; Martin, I.; Vilaró, S.; Villarroya, F.; Mampel, T.; Iglesias, R.; Viñas, O. 1990. Lipoprotein lipase mRNA expression in brown adipose tissue: translational and/or posttranslational events are involved in the modulation of enzyme activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1048: 270-273.
- [79] Ramírez, I.; Llobera, M.; Herrera, E. 1983. Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. *Metabolism* 32: 333-341.
- [80] Keig, P.; Borensztajn, J. 1974. Regulation of rat heart lipoprotein lipase activity during cold exposure. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146: 890-893.
- [81] Rault, C.; Fruchart, J. C.; Dewailly, P.; Jaillard, J.; Sezille, G. 1974. Experimental studies on the regulation of myocardial and adipose tissue lipoprotein lipase activities in rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59: 160-166.
- [82] de Gasquet, P.; Pequignot-Planche, E.; Tonnu, N. T.; Daiby, F. A. 1975. Effect of glucocorticoids on lipoprotein lipase activity in rat heart and adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* 7: 152-157.
- [83] Gubern, M.; Portet, R. 1981. Circadian rhythm and hormonal sensitivity of lipoprotein lipase activity in cold acclimated rats. *Horm. Metab. Res.* 13: 73-77.

- [84] Górski, J.; Stankiewicz-Choroszuca, B. 1982. The effect of hormones on lipoprotein lipase activity in skeletal muscles of the rat. *Horm. Metab. Res.* 14: 189-191.
- [85] Ling, C.; Svensson, L.; Odén, B.; Weijdegård, B.; Edén, B.; Edén, S.; Billig, H. 2003. Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 1804-1808.
- [86] Schoonjans, K.; Gelman, L.; Haby, C.; Briggs, M.; Auwerx, J. 2000. Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes. *J. Mol. Biol.* 304: 323-334.
- [87] Hughes, T. R.; Tengku-Muhammad, T. S.; Irvine, S. A.; Ramji, D. P. 2002. A novel role of Sp1 and Sp3 in the interferon-gamma -mediated suppression of macrophage lipoprotein lipase gene transcription. *J. Biol. Chem.* 277: 11097-11106.
- [88] Ranganathan, G.; Vu, D.; Kern, P. A. 1997. Translational regulation of lipoprotein lipase by epinephrine involves a trans-acting binding protein interacting with the 3'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 272: 2515-2519.
- [89] Kern, P. A.; Ranganathan, G.; Yukht, A.; Ong, J. M.; Davis, R. C. 1996. Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region. *J. Lipid Res.* 37: 2332-2340.
- [90] Ranganathan, G.; Li, C.; Kern, P. A. 2000. The translational regulation of lipoprotein lipase in diabetic rats involves the 3'-untranslated region of the lipoprotein lipase mRNA. *J. Biol. Chem.* 275: 40986-40991.
- [91] Ranganathan, G.; Pokrovskaya, I.; Ranganathan, S.; Kern, P. A. 2005. Role of A kinase anchor proteins in the tissue-specific regulation of lipoprotein lipase. *Mol. Endocrinol.* 19: 2527-2534.
- [92] Unal, R.; Pokrovskaya, I.; Tripathi, P.; Monia, B. P.; Kern, P. A.; Ranganathan, G. 2008. Translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes: depletion of cellular protein kinase C α activates binding of the C subunit of protein kinase A to the 3'-untranslated region of the lipoprotein lipase mRNA. *Biochem. J.* 413: 315-322.
- [93] Sukonina, V.; Lookene, A.; Olivecrona, T.; Olivecrona, G. 2006. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 17450-17455.
- [94] Wu, G.; Zhang, L.; Gupta, J.; Olivecrona, G.; Olivecrona, T. 2007. A transcription-dependent mechanism, akin to that in adipose tissue, modulates lipoprotein lipase activity in rat heart. *Am. J. Physiol.* 293: E908-E915.
- [95] Saxena, U.; Witte, L. D.; Goldberg, I. J. 1989. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J. Biol. Chem.* 264: 4349-4355.
- [96] Zhang, L.; Lookene, A.; Wu, G.; Olivecrona, G. 2005. Calcium triggers folding of lipoprotein lipase into active dimers. *J. Biol. Chem.* 280: 42580-42591.

- [97] Soteriou, A.; Cryer, A. 1994. Distinct immunoreactivities suggest the existence of potential tissue variants in rat lipoprotein lipase. *Biochem. J.* 299: 417-423.
- [98] Nierman, M. C.; Rip, J.; Twisk, J.; Meulenberg, J. J.; Kastelein, J. J.; Stroes, E. S.; Kuivenhoven, J. A. 2005. Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice. *Neth. J. Med.* 63: 14-19.
- [99] Babirak, S. P.; Iverius, P. H.; Fujimoto, W. Y.; Brunzell, J. D. 1989. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 9: 326-334.
- [100] Rip, J.; Nierman, M. C.; Ross, C. J.; Jukema, J. W.; Hayden, M. R.; Kastelein, J. J.; Stroes, E. S.; Kuivenhoven, J. A. 2006. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 1236-1245.
- [101] Ross, C. J.; Twisk, J.; Meulenberg, J. M.; Liu, G.; van den Oever, K.; Moraal, E.; Hermens, W. T.; Rip, J.; Kastelein, J. J.; Kuivenhoven, J. A.; Hayden, M. R. 2004. Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL (S447X) beneficial mutation. *Hum. Gene Ther.* 15: 906-919.
- [102] Ross, C. J.; Twisk, J.; Bakker, A. C.; Miao, F.; Verbart, D.; Rip, J.; Godbey, T.; Dijkhuizen, P.; Hermens, W. T.; Kastelein, J. J.; Kuivenhoven, J. A.; Meulenberg, J. M.; Hayden, M. R. 2006. Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation. *Hum. Gene Ther.* 17: 487-499.
- [103] Stroes, E. S.; Nierman, M. C.; Meulenberg, J. J.; Franssen, R.; Twisk, J.; Henny, C. P.; Maas, M. M.; Zwinderman, A. H.; Ross, C.; Aronica, E.; High, K. A.; Levi, M. M.; Hayden, M. R.; Kastelein, J. J.; Kuivenhoven, J. A. 2008. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 2303-2304.
- [104] Greenwood, M. R. 1985. The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int. J. Obes.* 9 Suppl. 1: 67-70.
- [105] Kern, P. A. 1997. Potential role of TNF α and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J. Nutr.* 127: 1917S-1922S.
- [106] Ross, R. 1999. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340: 115-126.
- [107] Mead, J. R.; Ramji, D. P. 2002. The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 55: 261-269.
- [108] Stein, Y.; Stein, O. 2003. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170: 1-9.
- [109] Renier, G.; Skamene, E.; DeSanctis, J. B.; Radzioch, D. 1993. High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.* 13: 190-196.

- [110] Nuñez, M.; Peinado-Onsurbe, J.; Vilaró, S.; Llobera, M. 1995. Lipoprotein lipase activity in developing rat brain areas. *Biol. Neonate* 68: 119-127.
- [111] Baum, L.; Wiebusch, H.; Pang, C. P. 2000. Roles for lipoprotein lipase in Alzheimer's disease: an association study. *Microsc. Res. Tech.* 50: 291-296.
- [112] Fidani, L.; Compton, D.; Hardy, J.; Petersen, R. C.; Tangalos, E.; Mirtsou, V.; Goulas, A.; De Vrieze, F. W. 2002. No association between the lipoprotein lipase S447X polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 322: 192-194.
- [113] Martin-Rehrmann, M. D.; Cho, H. S.; Rebeck, G. W. 2002. Lack of association of two lipoprotein lipase polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 328: 109-112.
- [114] Pacák, K.; Palkovits, M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22: 502-548.
- [115] Herman, J. P.; Cullinan, W. E. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20: 78-84.
- [116] de Kloet, E. R.; Joëls, M.; Holsboer, F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 463-475.
- [117] Goldstein, D. S.; Kopin, I. J. 2007. Evolution of concepts of stress. *Stress* 10: 109-120.
- [118] Kayaba, Y.; Nakamura, A.; Kasuya, Y.; Ohuchi, T.; Yanagisawa, M.; Komuro, I.; Fukuda, Y.; Kuwaki, T. 2003. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am. J. Physiol.* 285: R581-R593.
- [119] Surwit, R. S.; Schneider, M. S.; Feinglos, M. N. 1992. Stress and diabetes mellitus. *Diabetes Care* 15: 1413-1422.
- [120] Ricart-Jané, D.; Rodríguez-Sureda, V.; Benavides, A.; Peinado-Onsurbe, J.; López-Tejero, M. D.; Llobera, M. 2002. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* 51: 925-931.
- [121] Brindley, D. N.; Rolland, Y. 1989. Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin. Sci. (Lond)* 77: 453-461.
- [122] Rai, D.; Bhatia, G.; Sen, T.; Palit, G. 2003. Comparative study of perturbations of peripheral markers in different stressors in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81: 1139-1146.
- [123] Kvetnansky, R.; Mikulaj, L. 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology* 87: 738-743.
- [124] Ball, K. L.; Speake, B. K.; Robinson, D. S. 1986. Effects of adrenaline on the turnover of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 877: 399-405.

- [125] Ballart, X.; Siches, M.; Peinado-Onsurbe, J.; López-Tejero, D.; Llobera, M.; Ramírez, I.; Robert, M. Q. 2003. Isoproterenol increases active lipoprotein lipase in adipocyte medium and in rat plasma. *Biochimie* 85: 971-982.
- [126] Raynolds, M. V.; Awald, P. D.; Gordon, D. F.; Gutierrez-Hartman, A.; Rule, D. C.; Wood, W. M.; Eckel, R. H. 1990. Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 4: 1416-1422.
- [127] Ong, J. M.; Saffari, B.; Simsolo, R. B.; Kern, P. A. 1992. Epinephrine inhibits lipoprotein lipase gene expression in rat adipocytes through multiple steps in posttranscriptional processing. *Mol. Endocrinol.* 6: 61-69.
- [128] Chiappe de Cingolani, G. E.; Goers, J. W. F.; Giannotti, M.; Caldiz, C. I. 1996. Comparative effects of insulin and isoproterenol on lipoprotein lipase in rat adipose cells. *Am. J. Physiol.* 270: C1461-C1467.
- [129] Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3666-3670.
- [130] Balkwill, F. 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9: 361-371.
- [131] Goeddel, D. V. 1999. Signal transduction by tumor necrosis factor. *Chest* 116: 69S-73S.
- [132] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2008. Molecular biology of the cell (5^a Ed.). Garland Science, Abingdon, Regne Unit.
- [133] Kleinert, H.; Pautz, A.; Linker, K.; Schwarz, P. M. 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* 500: 255-266.
- [134] Nam, N. H. 2006. Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* 6: 945-951.
- [135] Gasic, S.; Tian, B.; Green, A. 1999. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J. Biol. Chem.* 274: 6770-6775.
- [136] Feingold, K. R.; Grunfeld, C. 1987. Tumor necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J. Clin. Invest.* 80: 184-190.
- [137] Flores, E. A.; Bistrrian, B. R.; Pomposelli, J. J.; Dinarello, C. A.; Blackburn, G. L.; Istfan, N. W. 1989. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. *J. Clin. Invest.* 83: 1614-1622.
- [138] Blumberg, D.; Hochwald, S.; Burt, M.; Donner, D.; Brennan, M. F. 1995. Tumor necrosis factor alpha stimulates gluconeogenesis from alanine in vivo. *J. Surg. Oncol.* 59: 220-224.

- [139] Kawakami, M.; Murase, T.; Ogawa, H.; Ishibashi, S.; Mori, N.; Takaku, F.; Shibata, S. 1987. Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *J. Biochem.* 101: 331-338.
- [140] Semb, H.; Peterson, J.; Tavernier, J.; Olivecrona, T. 1987. Multiple effects of tumor necrosis factor on lipoprotein lipase in vivo. *J. Biol. Chem.* 262: 8390-8394.
- [141] Grunfeld, C.; Gulli, R.; Moser, A. H.; Gavin, L. A.; Feingold, K. R. 1989. Effect of tumor necrosis factor administration in vivo on lipoprotein lipase activity in various tissues of the rat. *J. Lipid Res.* 30: 579-585.
- [142] Uchida, Y.; Tsukahara, F.; Ohba, K.; Ogawa, A.; Irie, K.; Fujii, E.; Yoshimoto, T.; Yoshioka, T.; Muraki, T. 1997. Nitric oxide mediates down regulation of lipoprotein lipase activity induced by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 335: 235-243.
- [143] Wu, G.; Brouckaert, P.; Olivecrona, T. 2004. Rapid downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase activity on food deprivation: evidence that TNF α is involved. *Am. J. Physiol.* 286: E711-E717.
- [144] Morin, C. L.; Schlaepfer, I. R.; Eckel, R. H. 1995. Tumor necrosis factor-alpha eliminates binding of NF-Y and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L1 adipocytes. *J. Clin. Invest.* 95: 1684-1689.
- [145] Saxena, U.; Witte, L. D.; Goldberg, I. J. 1990. Tumor necrosis factor induced release of endothelial cell lipoprotein lipase. *Arteriosclerosis* 10: 470-476.
- [146] Caroff, M.; Karibian, D.; Cavaillon, J. M.; Haeffner-Cavaillon, N. 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4: 915-926.
- [147] Barcia, A. M.; Harris, H. W. 2005. Triglyceride-rich lipoproteins as agents of innate immunity. *Clin. Infect. Dis.* 41: S498-S503.
- [148] Dauphinee, S. M.; Karsan, A. 2006. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab. Invest.* 86: 9-22.
- [149] Lu, Y. C.; Yeh, W. C.; Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145-151.
- [150] Spitzer, J. J.; Bagby, G. J.; Meszaros, K.; Lang, C. H. 1989. Altered control of carbohydrate metabolism in endotoxemia. *Prog. Clin. Biol. Res.* 286: 145-165.
- [151] Hardardóttir, I.; Grunfeld, C.; Feingold, K. R. 1995. Effects of endotoxin on lipid metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 1013-1018.
- [152] Feingold, K. R.; Staprans, I.; Memon, R. A.; Moser, A. H.; Shigenaga, J. K.; Doerrler, W.; Dinarello, C. A.; Grunfeld, C. 1992. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J. Lipid Res.* 33: 1765-1776.

- [153] Harris, H. W.; Rockey, D. C.; Chau, P. 1998. Chylomicrons alter the hepatic distribution and cellular response to endotoxin in rats. *Hepatology* 27: 1341-1348.
- [154] Bagby, G. J.; Spitzer, J. A. 1980. Lipoprotein lipase activity in rat heart and adipose tissue during endotoxic shock. *Am. J. Physiol.* 238: H325-H330.
- [155] Hülsmann, W. C.; Dubelaar, M.-L.; De Wit, L. E. A.; Persoon, N. L. M. 1988. Cardiac lipoprotein lipase: effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biochem.* 79: 137-145.
- [156] Gouni, I.; Oka, K.; Etienne, J.; Chan, L. 1993. Endotoxin-induced hypertriglyceridemia is mediated by suppression of lipoprotein lipase at a post-transcriptional level. *J. Lipid Res.* 34: 139-146.
- [157] Picard, F.; Kapur, S.; Perreault, M.; Marette, A.; Deshaies, Y. 2001. Nitric oxide mediates endotoxin-induced hypertriglyceridemia through its action on skeletal muscle lipoprotein lipase. *FASEB J.* 15: 1828-1830.
- [158] Pagliaro, P. 2003. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sci.* 73: 2137-2149.
- [159] Lincoln, J.; Hoyle, C. H. V.; Burnstock, G. 1997. Nitric oxide in health and disease. Cambridge University Press, Cambridge, Regne Unit.
- [160] Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268: 12231-12234.
- [161] Cho, H. J.; Xie, Q. W.; Calaycay, J.; Mumford, R. A.; Swiderek, K. M.; Lee, T. D.; Nathan, C. 1992. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 176: 599-604.
- [162] Knowles, R. G.; Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298: 249-258.
- [163] Davis, K. L.; Martin, E.; Turko, I. V.; Murad, F. 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 203-236.
- [164] McCabe, T. J.; Fulton, D.; Roman, L. J.; Sessa, W. C. 2000. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275: 6123-6128.
- [165] Komeima, K.; Hayashi, Y.; Naito, Y.; Watanabe, Y. 2000. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275: 28139-28143.
- [166] Brenman, J. E.; Xia, H.; Chao, D. S.; Black, S. M.; Bredt, D. S. 1997. Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev. Neurosci.* 19: 224-231.

- [167] Martínez-Ruiz, A.; Lamas, S. 2009. Two decades of new concepts in nitric oxide signaling: from the discovery of a gas messenger to the mediation of nonenzymatic posttranslational modifications. *IUBMB Life* 61: 91-98.
- [168] Stuehr, D. J.; Santolini, J.; Wang, Z. Q.; Wei, C. C.; Adak, S. 2004. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* 279: 36167-36170.
- [169] Martínez-Ruiz, A.; Lamas, S. 2004. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc. Res.* 62: 43-52.
- [170] van der Vliet, A.; Eiserich, J. P.; Kaur, H.; Cross, C. E.; Halliwell, B. 1996. Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol.* 269: 175-184.
- [171] Ischiropoulos, H. 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 776-783.
- [172] Ischiropoulos, H. 2009. Protein tyrosine nitration - an update. *Arch. Biochem. Biophys.* 484: 117-121.
- [173] Kamisaki, Y.; Wada, K.; Bian, K.; Balabanli, B.; Davis, K.; Martin, E.; Behbod, F.; Lee, Y. C.; Murad, F. 1998. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11584-11589.
- [174] Smallwood, H. S.; Lourette, N. M.; Boschek, C. B.; Bigelow, D. J.; Smith, R. D.; Pasa-Tolić, L.; Squier, T. C. 2007. Identification of a denitrase activity against calmodulin in activated macrophages using high-field liquid chromatography-FTICR mass spectrometry. *Biochemistry* 46: 10498-10505.
- [175] de la Cruz, F. 2001. Efecte de l'estrès per immobilització sobre els nivells circulants d'activitat lipoproteïna lipasa en rata. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona.
- [176] Ricart-Jané, D. 2003. Efecte de l'estrès en la rata sobre la lipoproteïna lipasa. Possible implicació de l'òxid nítric en la regulació d'aquest enzim en el teixit adipós blanc. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- [177] Jané, N. 2006. Aplicació del mètode de perfusió de teixit adipós blanc epididimal a l'estudi de l'alliberament de l'LPL per òxid nítric. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona.
- [178] Armario, A.; Marti, J.; Gil, M. 1990. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 15: 341-347.
- [179] Benavides, A.; Siches, M.; Llobera, M. 1998. Circadian rhythms of lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in intermediate metabolism of adult rat. *Am. J. Physiol.* 275: R811-R817.

- [180] Farghali, H.; Canová, N.; Kucera, T.; Martínek, J.; Masek, K. 2003. Nitric oxide synthase inhibitors modulate lipopolysaccharide-induced hepatocyte injury: dissociation between in vivo and in vitro effects. *Int. Immunopharmacol.* 3: 1627-1638.
- [181] Mossiat, C.; Demougeot, C.; Prigent-Tessier, A.; Bertrand, N.; Garnier, P.; Beley, A.; Marie, C. 2003. Effects of iNOS-related NO on hearts exposed to liposoluble iron. *Free Radic. Res.* 37: 749-756.
- [182] Williams, S. P.; Johnson, E. A. 1989. Release of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in rats by heparin and other sulphated polysaccharides. *Thromb. Res.* 55: 361-368.
- [183] Ruge, T.; Svensson, A.; Eriksson, J. W.; Olivecrona, T.; Olivecrona, G. 2001. Food deprivation increases post-heparin lipoprotein lipase activity in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* 31: 1040-1047.
- [184] Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J. Clin. Pathol.* 22: 246.
- [185] Shimizu, S.; Tani, Y.; Yamada, H.; Tabata, M.; Murachi, T. 1980. Enzymatic determination of serum-free fatty acids: a colorimetric method. *Anal. Biochem.* 107: 193-198.
- [186] Garland, P. B.; Randle, P. J. 1962. A rapid enzymatic assay for glycerol. *Nature* 196: 987-988.
- [187] Fossati, P.; Prencipe, L. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 28: 2077-2080.
- [188] Kientsch-Engel, R. I.; Siess, E. A. 1985. D-(-)-3-hydroxybutyrate and acetoacetate. *Del Llibre: Methods in Enzymatic Analysis* (vol. 8). Editors: Bergmeyer, H. U.; Bergmeyer, J.; Grabl, M. Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, pp. 60-69.
- [189] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- [190] Ricart-Jané, D.; Llobera, M.; López-Tejero, M. D. 2002. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 6: 178-185.
- [191] Griess, P. 1879. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH: Wesely and Benedikt "Über einige Azoverbindungen". *Ver. Deutsch. Chem. Ges.* 12, pp. 426-428.
- [192] Julve, J.; Robert, M. Q.; Llobera, M.; Peinado-Onsurbe, J. 1996. Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 116: 97-104.

- [193] Ramírez, I.; Kryski, A. J.; Ben-Zeev, O.; Schotz, M. C.; Severson, D. L. 1985. Characterization of triacylglycerol hydrolase activities in isolated myocardial cells from rat heart. *Biochem. J.* 232: 229-236.
- [194] Pardina, E. 2006. Obtenció d'anticossos policlonals de gallina contra l'LPL. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona.
- [195] Hansen, P.; Scoble, J. A.; Hanson, B.; Hoogenraad, N. J. 1998. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J. Immunol. Methods* 215: 1-7.
- [196] Peterson, J.; Fujimoto, W. Y.; Brunzell, J. D. 1992. Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J. Lipid Res.* 33: 1165-1170.
- [197] Reynolds, J. A.; Tanford, C. 1970. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* 245: 5161-5165.
- [198] O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- [199] Bjellqvist, B.; Ek, K.; Righetti, P. G.; Gianazza, E.; Görg, A.; Westermeier, R.; Postel, W. 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6: 317-339.
- [200] Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.
- [201] Heukeshoven, J.; Dernick, R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 103-112.
- [202] Dunn, M. J. 1993. Gel electrophoresis: proteins. Editors: Graham, J. M.; Billington, D. Bios Scientific Publishers, Oxford, Regne Unit.
- [203] Switzer, R. C.; Merrill, C. R.; Shifrin, S. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 98: 231-237.
- [204] van Kooyk, Y.; Rabinovich, G. A. 2008. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 9: 593-601.
- [205] Tarentino, A. L.; Plummer, T. H. Jr. 1994. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol.* 230: 44-57.
- [206] Alvarez, B.; Radi, R. 2003. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25: 295-311.
- [207] Yi, D.; Smythe, G. A.; Blount, B. C.; Duncan, M. W. 1997. Peroxynitrite-mediated nitration of peptides: characterization of the products by electrospray and combined gas chromatography-mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* 344: 253-259.

- [208] Kanski, J.; Hong, S. J.; Schöneich, C. 2005. Proteomic analysis of protein nitration in aging skeletal muscle and identification of nitrotyrosine-containing sequences in vivo by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 280: 24261-24266.
- [209] Uppu, R. M.; Pryor, W. A. 1996. Synthesis of peroxyxynitrite in a two-phase system using isoamyl nitrite and hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 236: 242-249.
- [210] Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. 1968. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J. Chem. Soc. (A)*: 450-452.
- [211] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246: 64-71.
- [212] Karas, M.; Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60: 2299-2301.
- [213] Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2: 151-153.
- [214] Steen, H.; Mann, M. 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 699-711.
- [215] Roepstorff, P.; Fohlman, J. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 11: 601.
- [216] Biemann, K. 1988. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16: 99-111.
- [217] Jorge, I.; Casas, E. M.; Villar, M.; Ortega-Pérez, I.; López-Ferrer, D.; Martínez-Ruiz, A.; Carrera, M.; Marina, A.; Martínez, P.; Serrano, H.; Cañas, B.; Were, F.; Gallardo, J. M.; Lamas, S.; Redondo, J. M.; García-Dorado, D.; Vázquez, J. 2007. High-sensitivity analysis of specific peptides in complex samples by selected MS/MS ion monitoring and linear ion trap mass spectrometry: application to biological studies. *J. Mass Spectrom.* 42: 1391-1403.
- [218] Tsikas, D. 2005. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic. Res.* 39: 797-815.
- [219] Tsikas, D. 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B* 851: 51-70.
- [220] Ricart-Jané, D.; Casanovas, A.; Jané, N.; González, M. A.; Buira-Morell, I.; Ribera, J.; Llobera, M.; López-Tejero, M. D. 2008. Nitric oxide and the release of lipoprotein lipase from white adipose tissue. *Cell. Physiol. Biochem.* 22: 525-530.

- [221] Jung, S. Y.; Li, Y.; Wang, Y.; Chen, Y.; Zhao, Y.; Qin, J. 2008. Complications in the assignment of 14 and 28 Da mass shift detected by mass spectrometry as in vivo methylation from endogenous proteins. *Anal. Chem.* 80: 1721-1729.
- [222] Osés-Prieto, J. A.; Zhang, X.; Burlingame, A. L. 2007. Formation of epsilon-formyllysine on silver-stained proteins: implications for assignment of isobaric dimethylation sites by tandem mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 6: 181-192.
- [223] Petersson, A. S.; Steen, H.; Kalume, D. E.; Caidahl, K.; Roepstorff, P. 2001. Investigation of tyrosine nitration in proteins by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36: 616-625.
- [224] Sarver, A.; Scheffler, N. K.; Shetlar, M. D.; Gibson, B. W. 2001. Analysis of peptides and proteins containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12: 439-448.
- [225] Zimmermann, R.; Strauss, J. G.; Haemmerle, G.; Schoiswohl, G.; Birner-Gruenberger, R.; Riederer, M.; Lass, A.; Neuberger, G.; Eisenhaber, F.; Hermetter, A.; Zechner, R. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306: 1383-1386.
- [226] Hultin, M.; Bengtsson-Olivecrona, G.; Olivecrona, T. 1992. Release of lipoprotein lipase to plasma by triacylglycerol emulsions. Comparison to the effect of heparin. *Biochim. Biophys. Acta* 1125: 97-103.
- [227] Peterson, J.; Bihain, B. E.; Bengtsson-Olivecrona, G.; Deckelbaum, R. J.; Carpentier, Y. A.; Olivecrona, T. 1990. Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 909-913.
- [228] Rodrigues, B.; Spooner, M.; Severson, D. L. 1992. Free fatty acids do not release lipoprotein lipase from isolated cardiac myocytes or perfused hearts. *Am. J. Physiol.* 262: E216-E223.
- [229] Moles, A. 2005. Avaluació i modificació d'un mètode de perfusió de teixit adipós blanc epididimal de rata. Estudi de l'alliberament de l'LPL per àcid oleic. Màster en Bioquímica Experimental. Universitat de Barcelona.
- [230] Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- [231] Socorro, L.; Jackson, R. L. 1985. Monoclonal antibodies to bovine milk lipoprotein lipase. Evidence for proteolytic degradation of the native enzyme. *J. Biol. Chem.* 260: 6324-6328.
- [232] Voyta, J. C.; Via, D. P.; Kinnunen, P. K.; Sparrow, J. T.; Gotto, A. M. Jr.; Smith, L.C. 1985. Monoclonal antibodies against bovine milk lipoprotein lipase. Characterization of an antibody specific for the apolipoprotein C-II binding site. *J. Biol. Chem.* 260: 893-898.
- [233] Goers, J. W.; Pedersen, M. E.; Kern, P. A.; Ong, J.; Schotz, M. C. 1987. An enzyme-linked immunoassay for lipoprotein lipase. *Anal. Biochem.* 166: 27-35.

Bibliografia

- [234] Doolittle, M. H.; Ben-Zeev, O.; Briquet-Laugier, V. 1998. Enhanced detection of lipoprotein lipase by combining immunoprecipitation with Western blot analysis. *J. Lipid Res.* 39: 934-942.
- [235] Doolittle, M. H.; Ben-Zeev, O. 1999. Immunodetection of lipoprotein lipase: antibody production, immunoprecipitation, and western blotting techniques. *Methods Mol. Biol.* 109: 215-237.
- [236] Chang, S.-F.; Reich, B.; Brunzell, J. D.; Will, H. 1998. Detailed characterization of the binding site of the lipoprotein lipase-specific monoclonal antibody 5D2. *J. Lipid Res.* 39: 2350-2359.
- [237] Souza, J. M.; Peluffo, G.; Radi, R. 2008. Protein tyrosine nitration - functional alteration or just a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* 45: 357-366.