

# Efecte de la sobreexpressió de la carnitina-palmitoiltransferasa (CPT) 1A en el fetge de ratolins obesos

Josep Maria Orellana Gavalda

**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](http://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](http://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](http://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.



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

**EFFECTE DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE LA  
CARNITINA-PALMITOÏLTRANSFERASA (CPT) 1A  
EN FETGE DE RATOLINS OBESOS**

**JOSEP MARIA ORELLANA GAVALDÀ**  
**2010**





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

Memòria presentada per Josep Maria Orellana Gavaldà, Llicenciat en Bioquímica, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Fausto García Hegardt i la Dra. Dolors Serra Cucurull, en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

**Dr. Fausto G. Hegardt**

**Dra. Dolors Serra Cucurull**

**Josep Maria Orellana Gavaldà**

Barcelona, desembre de 2010

Programa de Doctorat: Nutrició i Metabolisme

Bienni 2005-2007



## **Agraïments**

Aquest és sens dubte un dels moments més bonics, interessants i apassionants de la meua vida professional i personal. És també un punt i seguit molt engrescador i emocionant. I com tot camí que es segueix al llarg de la vida i que un mateix pot triar, no es fa mai sol.

El primer que em ve al cap per definir el meu camí és feixuc, alegre, dur, interessant, pedregós i moltes més sensacions que envolten les circumstàncies d'un mateix, incapaç de definir amb exactitud totes les vivències viscudes. Crec que algun cop aquest camí feia pujada, d'altres es convertia en un laberint i d'altres el camí s'aturava. Però al final ens en sortim.

Cal dir que la meua tesi té dues parts molt ben diferenciades; per un costat vaig començar l'estiu de l'any 2004 al Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili a Tarragona on vaig estar fins al juny del 2007. És el lloc on vaig realitzar els estudis de doctorat de Nutrició i Metabolisme. Va ser una època que em va marcar molt i de moltes experiències diferents. Durant aquella temporada vaig estar al costat de gent molt maca que gràcies en part a ells vaig seguir en el meu camí cap al doctorat.

D'aquella època voldria destacar al meu gran amic el Dr. Albert Pallejà, gran persona, culer i bioinformàtic i a la Dra. Lúdia González divertida i amant de la vida, que a hores d'ara ja deuen estar tornant de Dinamarca. També al Dr. Santi Garcia-Vallvè, gran tarragoní, casteller i músic. I molts d'altres que no voldria oblidar-me, com en Pere, la Montse, l'Esther, l'Eduard (el meu dentista), la Marina, la Ximena, la Núria, en Santiago, en Cesc Puiggròs, en Josep i a la Noe i un llarg etcètera de gent. També en tinc un especial record pels seus bons consells de la professora del Departament la Dra. Cinta Bladé. A més, durant els cursos 2005/06 i 06/07 vaig ser professor associat de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus, fet que em va aportar moltes coses professionalment parlant. Agrair també el suport del personal i professors de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus.

L'altra part del camí cap al meu doctorat comença el juliol del 2007 a Barcelona, al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Tot va començar amb una entrevista al despatx del Dr. Fausto G.Hegardt, on em va brindar la possibilitat de continuar i començar de zero el meu camí.

Aquí he conegut a moltíssima gent que voldria esmentar,

Al Dr. Fausto G.Hegardt, per confiar amb mi, pels seus consells i per la seva perseverança en el món de la ciència. A la Dra. Guillermina Asins, perquè és un pou de ciència, pels seus grans consells científics i personals i per ser tant esbojarrada. A la Dra. Dolors Serra perquè hem treballat de valent, hem rigut, hem après, i ens han passat moltes coses junts i ha cregut més que ningú en els virus. Per ser la meva guia científica durant aquest temps.

A la Dra. Laura Herrero, gràcies als seus consells i a la seva experiència la meva tesi va fer un gir increïble. A la maligna del grup, Paula Mera. Per portar l'alegria al laboratori cada dia, i per ser una companya i amiga de feina incansable, pacient, i molt bona investigadora, tot i que és biòloga i no li agraden els bitxos. Al Dr. Chandrashekar Gurunatan (Chandru), per les seves xerrades místiques i per estar sempre disposat a ajudar-me. Al Dr. David Sebastián que tot i no haver compartit mai amb ell laboratori és un gran científic i sempre està disposat al que calgui dins i fora del laboratori. A la Yoli, perquè era tremendament alegre i portava el laboratori com ningú. A la Mida, perquè ens cuida i ens fa de mama del grup i mai té un no per resposta. A la Macarena, per ser la meva última companya de *poiata* i aguantar la meva expansió i les meves bromes, gràcies a ella durant la meva tesi he tingut dues *poiates*. A en Kamil, que m'ajuda a posar ordre al galliner i m'ensenya polonès "dzień dobry". A tota la gent que hi ha ara o que ha passat pel grup i que he conegut: Dra. Irene Vázquez, Dra. Assia Bentebibel, Elena, Maria, Joan, Mar, Marina, Maria Lucia, Valentina ...

També als companys de la Universitat Internacional de Catalunya, a la Dra. Núria Casals i el seu equip: l'Esther, la Patricia, la Sara perquè com més sumem i més som més aprenem.

A tots els companys i companyes del Departament, Mariona, Anna, Joana, Analú, Sílvia, Lilia, Mari, Diego, Marina, Laura, Elaine, Karla, Cristina, Carlota, Núria i companys d'altres departaments com la Tere, la Sara i les Carmes per ajudar-me sempre que ho he necessitat.

A les secretàries del Departament Brugués, Mari Carmen i a la Montse, per ajudar-nos dia a dia en tot i més i en la sempre feixuga burocràcia dels papers. Als tècnics del Departament, Sílvia i Andrés perquè sense ells no vull imaginar com aniria tot. A la gent de l'estabulari, Tere, Marta, Paula, David, Anna... perquè sempre tenen un somriure i sense les seves mans i els seus consells les nostres

bèsties es matarien. A la gent del Servei Científicotècnic del Parc Científic de Barcelona, la Dra. Olga Jáuregui, que és mig tarragonina i a la Dra. Eli Bermúdez, pel seu suport i ajut, perquè vaig conèixer amb elles durant uns mesos.

També al Dr. Joan Llobet, catedràtic de toxicologia, que he conegut en el tren durant aquest temps i curiosament treballa a la Facultat de Farmàcia, gran científic, tarragoní i de gran sentit de l'humor. Els seus viatges en tren són especials i no et deixen indiferent. Al Dr. Iñaki Ruiz-Trillo, company de viatge en el tren, gran treballador i persona i molt pacient, que gràcies als meus consells és cada dia més tarragoní.

Al Dr. Ramon Bartrons i a la seva gent, l'Àlícia, en Joan, la Patrícia, la Maria i el Dr. Perales per iniciar-me en el món de la investigació en el seu grup de recerca l'estiu del 2003 quan jo no sabia ni fer un *Western*. Va ser el primer lloc on vaig veure ratolins i rates de laboratori i vaig dir que jo mai treballaria amb ratolins jeje.

Agrair també el finançament del CIBERobn durant al llarg de la meva tesi, que tot i les adversitats econòmiques d'aquest moments es segueix apostant per la investigació, tot i que caldria més suport econòmic a la recerca, però això forma part d'un altre capítol. Actualment i des del curs 2009/10 sóc també professor associat del departament i està sent un molt bon aprenentatge per a mi. Agrair als professors del Departament el seu suport i consells.

Finalment agrair als meus pares el seu suport durant el meu doctorat, perquè tot i no entendre que significa sobreexpressar la CPT1, sempre han estat disposats a ajudar-me, fos quina fos la meva decisió. També al meu germà, que per fi ha aconseguit que el seu germà petit "anés a Barcelona a estudiar". Tot i marejar-se amb una gota de sang i no poder-li explicar les meves aventures amb els ratolins, ell sempre pregunta.

I per últim...una noia o xiqueta millor dit, que vaig conèixer ara ja farà més de 6 anys i que sempre va creure que acabaria sent doctor. Que va creure que em podria fer feliç i que em volia acompanyar i així ho ha fet. La Xana ha patit més que ningú totes les meves vivències i etapes de la meva tesi, que a sobre va acompanyada per la meva altra vida, la de músic i més coses oi vida? Una barreja complicada que ella com ningú sap portar molt bé. Tant bé, que al 4 de setembre ens vam casar. Perquè paraules com avellanes, Barcelona, dinamines, aflatoxines, bioinformàtica, CPT1, sobreexpressar, ratolins, obesitat, tren, virus adenoassociats,



saatchi, petosito i un llarg etcètera ens han fet plorar i riure, sobretot riure, el que en la intimitat en diem "risa". Ara també crec que aquesta tesi és seva. Per acompanyar-me i estimar-me en tot moment i per gaudir de la vida junts. Per tu carinyo.

A tot vosaltres, de tot cor, gràcies, moltes gràcies!

Pep

***"El qui aprèn i aprèn i no practica el que sap,  
és com el qui llaura i llaura i no sembra."***

Plató (427 aC - 347 aC)



## ABREVIATURES

Ab	anticòs
Abs	absorbància
A.C.	autoclavat
ACC	acetil-CoA carboxilasa
ACS	acil-CoA sintetasa
Ad	adenovirus
A.E.	activitat específica
AMP	monofosfat d'adenosina
AMPK	proteïna quinasa activada per AMP
AKT	AKT proteïna quinasa
ASP	productes àcídics solubles
ATP	trifosfat d'adenosina
AAV	virus adenoassociats
bp	parell de bases
BSA	albúmina bovina sèrica
C	concentració
CACT	carnitina-acilcarnitinatranslocasa
cDNA	DNA complementari
Ci	curí
ChAT	colina acetiltransferasa
CHREBP	proteïna d'unió a l'element en resposta als carbohidrats
CoA	coenzim A
COT	carnitina-octanoïltransferasa
cpm	comptes per minut
CPT1	carnitina-palmitoïltransferasa 1
CPT1A	isoforma hepàtica de la carnitina-palmitoïltransferasa 1
CPT1B	isoforma muscular de la carnitina-palmitoïltransferasa 1
CPT1C	isoforma cerebral de la carnitina-palmitoïltransferasa 1
CrAT	carnitina-acetiltransferasa
DAG	diacilglicerol
DEPC	dietilpirocarbonat
DGAT	diacilglicerol-aciltransferasa
DIO	dietes que indueixen obesitat
DMSO	dimetil sulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic

dNTPs	2'-deosoxinucleòsids 5'-trifosfat
DTE	ditioeritrol
DTT	ditiotreitrol
ECF	facilitador quimiofluorescent
EDTA	àcid etilenediamina-tetraacètic
EGTA	àcid etilenglicol-bis (aminoetil ether)- N,N,N',N'- tetracètic
ELISA	immunoanàlisi unida a un enzim
eNOS	enzim òxid nítric sintasa
ER	reticle endoplasmàtic
ETR	cadena de transport d'electrons
FA-CoA	acil-CoA gras
FAO	oxidació d'àcids grassos
FAS	àcid gras-sintasa
FBS	sèrum boví fetal
FFA	àcids grassos lliures
for	<i>forward</i>
FOXO	factors de la família <i>Forkhead Box O</i>
FW	pes molecular
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
gc/kg	còpies genòmiques per quilogram
GK	glucoquinasa
GLUT2	transportador-2 de la glucosa
GSK	quinasa glicògen sintasa
GSH	glutatió (forma reduïda)
GTT	test de tolerància a la glucosa
h	hora
HBSS	solució salina tamponadora <i>Hank</i>
HEPES	àcid N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfonic
HFD	dieta rica en greixos
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzyme A
HRP	<i>horseradish</i> peroxidasa
HSL	hormona sensitiva lipasa
IKK $\beta$	I $\kappa$ B quinasa- $\beta$
iNOS	òxid nítric-sintasa induïble
IL	interleucina
Ip	intraperitoneal
IRS	substrat receptor d'insulina
JNK	quinasa c-Jun N-terminal

<i>K<sub>m</sub></i>	constant de <i>Michaelis</i>
kDa	kilodalton
KRBH	Solució <i>Krebs-Ringer</i> bicarbonat hepes
LCFA	àcids grassos de cadena llarga
LC-CoA	acil-CoA de cadena llarga
LLP	lipoproteïna-lipasa
M	molar (mol/l)
mA	mil·liamper
MAPK	proteïna quinasa activada per mitogen
MCD	malonil-CoA descarboxilasa
MCP	proteïna quimioattractant de monòcits
min.	minut
ml	mil·lilitre
mRNA	RNA missatger
MTP	proteïna de transferència de triacilglicerols microsomal
NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (forma reduïda)
NCD	dieta control
NF-κB	factor nuclear <i>kappa-light-chain-enhancer</i> activador de cèl·lules B
NO	òxid nítric
PBS	tampó salí fosfat
PC	piruvat-carboxilasa
PCR	reacció en cadena per la polimerasa
PDK	quinasa de piruvat-deshidrogenasa
PEG	polietilenglicol
PEPCK	fosfoenolpiruvat-carboxiquinasa
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP-3	fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfat
PKB	proteïna quinasa B
PKC	proteïna quinasa C
PK	piruvat quinasa
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
PPAR	peroxisomal proliferator-activated receptor
PTT	test de tolerància al piruvat
R.E.	radioactivitat específica
rev	<i>reverse</i>
RIPA	solució d'assaig de radioimmunoprecipitació
RNA	àcid ribonucleic

ROS	espècies reactives d'oxigen
rpm	revolucions per minut
s.	segons
SCD-1	esteroïl coenzim-A desaturasa
SDS	sodi dodecil sulfat
SOCS	senyal supressora de citoquines
SREBP	proteïna d'unió a l'element regulador esterol
TAB	teixit adipós blanc
TAG	triacilglicerols
T amb.	temperatura ambient
TCA	àcid tricarbòxilic
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilenediamina
TNF $\alpha$	tumor- necrosis factor $\alpha$
Tris	Tris(hidroxiètil)aminoetà
TZD	Tiazolidindiona
U	unitats
UCP	proteïna desacobladora
UV	ultravioleta
V	volts
VLDL	lipoproteïnes de molt baixa densitat

## PRESENTACIÓ

L'obesitat és una malaltia crònica que es caracteritza per una acumulació ectòpica excessiva de greix associada a la inflamació del fetge i del teixit adipós. A més és el principal factor de risc pel desenvolupament de malalties com la diabetis tipus 2 o malalties cardiovasculars. En els darrers temps, degut a la ingesta de dietes enriquides en greixos i al sedentarisme l'obesitat i el sobrepès han adquirit dimensions de pandèmia, fins el punt que la OMS l'ha etiquetat com l'epidèmia del segle XXI on mil milions de persones en tot el món pateixen algun tipus de sobrepès i uns 300 milions de persones es consideren que són obeses com a conseqüència de la sobrenutrició o sobrealimentació permanent en els països industrialitzats.

El fetge és l'òrgan responsable de mantenir la homeostasi energètica de tot l'organisme i responsable en gran part del metabolisme de la glucosa i del metabolisme lipídic. A més, el fetge juga un paper fonamental en el desenvolupament de l'obesitat i en la desregulació metabòlica conseqüent. Nombrosos estudis han descrit l'acumulació d'espècies derivades d'àcids grassos en el fetge com a causants dels problemes associats a l'obesitat, ja sigui degut a una aportació excessiva de lípids o a una fallada en l'oxidació.

En els individus obesos tot i tenir alts nivells de greix presenten una oxidació d'àcids grassos disminuïda. Per això, en aquesta tesi s'ha estudiat si un augment en l'oxidació d'àcids grassos en el fetge a llarg termini és capaç de reduir l'acumulació lipídica i per tant disminuir l'obesitat ens diferents models d'animals obesos. Per dur a terme aquest objectiu s'ha avaluat l'efecte de la sobreexpressió de la carnitina-palmitoiltransferasa (CPT) 1A, que és l'enzim responsable del control del transport d'àcids grassos en el mitocondri per ser oxidats, mitjançant l'administració de virus adenoassociats (AAVs). Els AAVs són una molt bona eina per utilitzar com a teràpia gènica per la seva capacitat d'expressar els gens que introdueixen durant llargs períodes de temps i per la resposta pràcticament nul·la del sistema immunitari de l'organisme el qual infecten.

Els resultats presentats en aquesta tesi demostren que la sobreexpressió de la CPT1A i d'una forma mutada de CPT1A (CPT1AM), insensible al seu inhibidor fisiològic el malonil-CoA, és suficient per augmentar l'oxidació d'àcids grassos en el fetge, reduir l'acumulació lipídica i la inflamació en el fetge i en el teixit adipós. Per tan, la sobreexpressió de la CPT1A i en un major grau la CPT1AM protegeix a



l'organisme enfront l'obesitat i els seus problemes associats. Aquests resultats obren un ventall de possibilitats en la recerca de noves teràpies gèniques contra l'obesitat.

# ÍNDEX

## INTRODUCCIÓ

1. Obesitat	1
2. Diabetis	2
2.1 Resistència a la insulina	4
2.2 Transducció del senyal de la insulina	7
3. Obesitat i inflamació	9
4. Metabolisme hepàtic en l'obesitat	10
4.1 Alteracions en el metabolisme de la glucosa	11
4.2 Alteracions en el metabolisme lipídic	12
4.3 Inflamació i resistència a la insulina	16
5. Paper del teixit adipós i del múscul en l'obesitat	19
6. Sistema carnitina-palmitoiltransferasa	21
6.1 Regulació a nivell transcripcional	24
6.2 Regulació per malonil-CoA	25
7. Estratègies terapèutiques en el tractament de l'obesitat	27
7.1 Models d'estudi d'obesitat	28
7.2 Teràpia gènica	30
7.1.1 Teràpia gènica en l'obesitat	31
7.1.2 AAVs	33

<b>OBJECTIUS</b>	41
------------------	----

<b>MATERIAL I MÈTODES</b>	45
---------------------------	----

1. Animals	
1.1 Ratolins C57BL/6	45
1.2 Ratolins db/db	45
1.3 Rates Wistar	45
1.4 Dietes emprades	46

2. Cultius primaris	
2.1 Hepatòcits de ratolí	47
2.2 Obtenció d'hepatòcits de ratolí	48
3. Virus adenoassociats	52
4. Procediments amb els animals	
4.1 Identificació dels animals	54
4.2 Administració de virus	55
4.3 Disseny dels experiments	55
4.4 Extracció sanguínia per a la determinació de metabòlits	57
4.4.1 Determinació de glucosa	57
4.4.2 Obtenció de sèrum	57
4.5 Test de tolerància a la glucosa	57
4.6 Test de tolerància al piruvat	58
4.7 Inducció de la cascada de senyalització de la insulina	58
5. Anàlisi de l'RNA	
5.1 Obtenció i quantificació de l'RNA total	59
5.2 Síntesi del cDNA	60
5.3 PCR a temps real	61
5.3.1 Quantificació i anàlisi de dades	64
6. Anàlisi de proteïnes	
6.1 Quantificació pel mètode de Bradford	65
6.2 Western Blot	66
7. Assaig de l'activitat CPT1	
7.1 Obtenció de fraccions enriquides amb mitocondris	72
7.1.1 Obtenció de mitocondris d'hepatòcits	72
7.1.2 Obtenció de mitocondris de fetge	72
7.2 Assaig radiomètric de CPT1	72
7.3 Assaig d'inhibició per malonil-CoA	76
8. Assaig d'oxidació d'àcids grassos	
8.1 Assaig d'oxidació en hepatòcits	76

9. Determinacions en sèrum	
9.1 Determinació de triacilglicèrids	79
9.2 Determinació d'àcids grassos lliures	80
9.3 Determinació de cossos cetònics	81
9.4 Determinació d'insulina	82
9.5 Determinació de leptina	83
10. Determinació de metabòlits en fetge	
10.1 Determinació de TAG	83
10.2 Determinació de malonil-CoA	84
10.2.1 Extracció	84
10.2.2 Procediment i condicions HPLC/MS	84
10.2.3 Quantificació	84
10.3 Determinació de $\beta$ -hidroxibutirat-CoA	85
10.3.1 Extracció	85
10.3.2 Procediment i condicions HPLC/MS	85
10.3.3 Quantificació	85
10.4 Determinació de ROS	85
10.5 Determinació d'ATP	87
11. Estudi histològic de fetge i de teixit adipós	
11.1 Deshidratació de les mostres de fetge	88
11.2 Deshidratació de les mostres de teixit adipós	88
11.3 Tinció Hematoxilina-Eosina	88
12. Servidors i programes en línia d'ús freqüent	
12.1 Servidors	89
12.2 Programes	90
12.2.1 Cerca d'homologia de seqüència	90
12.2.2 Cerca d'encebadors per PCR a temps real	91
13. Anàlisi estadístic	91
<b>RESULTATS</b>	
1. Obtenció de virus adenoassociats	95

2. Efecte de la sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM en fetge de rates alimentades amb dieta control	
2.1 Anàlisi dels nivells de proteïna CPT1	96
2.2 Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1	97
2.3 Nivells de TAG en sèrum	98
3. Efecte de la sobreexpressió de CPT1AM en fetge de rates alimentades amb dieta grassa i control	99
3.1 Anàlisi dels nivells de proteïna CPT1	100
3.2 Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1	101
4. Efecte de la sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM en fetge de ratolins alimentats amb dieta grassa i control	
4.1 Anàlisi dels nivells d'mRNA de CPT1A i distribució en teixits	102
4.2 Anàlisi dels nivells de proteïna CPT1	104
4.3 Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1	105
4.4 Anàlisi dels nivells d'oxidació d'àcids grassos	108
4.5 Producció dels cossos cetònics en fetge i en sèrum	110
4.6 Producció d'ATP en el fetge	112
4.7 Efecte en el pes	113
4.8 Homeostasi de la glucosa	115
4.9 Nivells de TAG, àcids grassos lliures i leptina en sèrum	119
4.10 Contingut de TAG en fetge	121
4.11 Estudi histològic del fetge	122
4.12 Estudi del metabolisme en el fetge	
4.12.1 Metabolisme de la glucosa	123
4.12.2 Metabolisme lipídic	125
4.12.3 Anàlisi de factors d'expressió	128
4.12.4 Anàlisi de gens relacionats amb la inflamació	130
4.13 Anàlisi de l'estrès oxidatiu	132
4.14 Estudi del teixit adipós blanc epididimal	134
4.14.1 Anàlisi del pes	134
4.14.2 Estudi histològic	135
4.14.3 Anàlisi de l'expressió de gens relacionats amb la inflamació	136
4.15 Anàlisi de la resistència a la insulina en diferents teixits	138

5. Efecte de la sobreexpressió de CPT1AM en fetge de ratolins db/db	
5.1 Estudi de l'increment en el pes	140
5.2 Metabolisme de la glucosa i la insulina	141
5.3 Histologia del fetge	142
5.4 Histologia del teixit adipós blanc epididimal	143

## **DISCUSSIÓ**

1. La rata com a model per la sobreexpressió de CPT1	149
2. L'augment de l'oxidació- $\beta$ en el fetge de ratolins alimentats amb dieta grassa reverteix el fenotip obès i insulinoresistent	150
2.1 L'augment de l'oxidació d'àcids grassos en fetge disminueix l'esteatosi hepàtica	152
2.2 Millora del metabolisme de la glucosa i lipídic en ratolins obesos degut a l'augment de l'oxidació- $\beta$	
2.2.1 metabolisme de la glucosa	154
2.2.2 metabolisme lipídic	156
2.3 Disminució de la inflamació en el fetge i en el teixit adipós i millora de la histologia del teixit adipós	157
2.4 Reducció de l'estrès oxidatiu degut a l'augment de l'oxidació- $\beta$	158
2.5 Reversió del fenotip obès	
2.5.1 El pes	159
2.5.2 Normalització de la senyalització de la insulina	160
3. Ratolins obesos genèticament modificats db/db milloren el seu fenotip quan es sobreexpressa la CPT1AM en el fetge	162
4. Investigacions futures	165

<b>CONCLUSIONS</b>	169
--------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	173
---------------------	-----

<b>ANNEX I</b>	197
----------------	-----



# **INTRODUCCIÓ**

---





## INTRODUCCIÓ

### 1. OBESITAT

L'obesitat i el sobrepès es defineixen com una acumulació anormal o excessiva de greix. L'obesitat és una malaltia crònica multifactorial incrementada per la sobrealimentació i la inactivitat física i fruit de la interacció entre genotip i ambient. En la majoria de pacients que pateixen obesitat és impossible establir una única causa de perquè desenvolupen la malaltia. L'obesitat afecta a un gran percentatge de la població de països desenvolupats abraçant totes les edats, sexes i condicions socials. La prevalença de l'obesitat ha augmentat i continua incrementant de forma alarmant en la nostra societat, així com en països d'economia en transició, adquirint proporcions epidèmiques. L'obesitat s'ha convertit en la segona causa de mortalitat prematura i evitable després del tabac (Banegas JR, 2005).

L'obesitat és una malaltia crònica i un factor de risc que incrementa les possibilitats de patir altres malalties com la diabetis, la hipercolesterolèmia, la hipertensió arterial, afeccions coronàries, articulars, de la vesícula biliar, respiratòries, esteatosi hepàtica, renals i oncològiques, entre d'altres (Pérusse L, 2001). Com més alt sigui el grau d'obesitat més probable és que apareguin altres malalties. De fet, es calcula que les persones obeses viuen deu anys menys de mitjana que les que tenen un pes normal (Pi-Sunyer FX, 2002). Durant els darrers anys s'ha produït un augment considerable de l'obesitat en els països desenvolupats, fins al punt que l'Organització Mundial de la Salut l'ha definit com "l'epidèmia del segle XXI". Actualment el 54,7% de la població espanyola té excés de pes. D'aquest percentatge, un 15,5% pateix obesitat, és a dir, una de cada sis persones. El 39,2% restant correspon a persones amb sobrepès. En els propers anys aquestes xifres continuaran augmentant, donat que cada cop hi ha més nens obesos (Steinbeck K, 2009). L'obesitat suposa entre el 3% i el 8% del cost sanitari en els països desenvolupats (Young JB, 2010).

La forma de saber si es té un pes normal o bé es pateix sobrepès o obesitat és calculant el que s'anomena índex de massa corporal, un número que s'obté dividint el pes per l'alçada al quadrat. Si el resultat d'aquesta divisió es troba entre 18,5 i 24,9, es considera que el pes és normal; si es troba entre 25 i 29,9, es té sobrepès i si és igual o superior a 30, es pateix obesitat. Un índex de massa

corporal superior a 40 indica una obesitat mòrbida, que ocasiona problemes molt greus per a la salut.

Els mamífers han desenvolupat mecanismes per tal d'emmagatzemar energia durant èpoques d'abundància per tal de garantir el subministrament en períodes d'escassetat d'aliments. L'excés de nutrients s'emmagatzema en forma de triacilglicèrids, principalment en el teixit adipós, però també en altres teixits com en el fetge i el múscul esquelètic. Aquests efectes beneficiosos de l'emmagatzament de nutrients, es poden convertir en perjudicials per a la salut si aquest fet es dona durant llargs períodes de temps i especialment sota condicions de vida sedentària i de reduïda activitat física (Shoelson SE, 2007). Els perjudicis en la salut com a conseqüència de l'augment de pes i l'obesitat estan especialment promoguts per un balanç energètic positiu i per la ingesta d'aliments rics en carbohidrats simples i greixos saturats.

## **2. DIABETIS**

La diabetis mellitus és una malaltia provocada per una desregulació en el metabolisme dels carbohidrats i dels àcids grassos, ja sigui degut a una fallada en la producció d'insulina o a una fallada en la seva acció sobre els teixits diana. Això comporta la presència de nivells de glucosa elevats tant en situacions de dejú com en estats postabsortius si no es tracta adequadament. La diabetis es caracteritza per una hiperglucèmia en dejú com a conseqüència de la falta d'insulina o de la seva correcta acció en el fetge i en els teixits perifèrics, i de nivells augmentats de glucagó. A més, els àcids grassos del teixit adipós son alliberats anormalment, promovent la estimulació de la cetogènesi hepàtica. Aquests desordres metabòlics condueixen als principals síndromes de la diabetis: poliúria, polifàgia i polidipsia. La diabetis s'associa també amb neuropaties, nefrologies, retinopaties, malalties coronàries i mort prematura (Zimmet P, 2001). El resultat és doncs una disminució de la qualitat de vida i en l'esperança de vida. Totes aquestes complicacions associades són les responsables del gran impacte sanitari i socioeconòmic que comporta aquesta malaltia (King H, 1998).

Mantenir una dieta sana i realitzar exercici regularment son dos aspectes molt importants per la prevenció i el tractament de la diabetis. Inclús mantenint un estil de vida sa, molts pacients necessiten intervenció farmacològica, que pot consistir en una única o una combinació de les següents medicacions orals: sulfonilureas (estimulen la secreció d'insulina per la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica),

metformina (inhibeix la producció hepàtica de glucosa) o tiazolidindiones (sensibilitzen el múscul i el teixit adipós a la insulina).

El 5-10% dels pacients diabètics pateixen diabetis del tipus 1 o diabetis mellitus dependent d'insulina. Aquests pacients son completament dependents d'insulina exògena degut a una destrucció autoimmune de les cèl·lules productores d'insulina (cèl·lules  $\beta$ ) del pàncreas. Aquest tipus de diabetis apareix abans dels 25 anys d'edat. La diabetis tipus 1 es diagnostica després de l'aparició de símptomes com són una gran set (polidipsia), molta gana (polifagia) i pèrdua abundant d'orina (poliuria). En ocasions pot apareixe cetoacidosi diabètica que pot comportar l'entrada en coma dels pacients.

La diabetis tipus 2 o diabetis no dependent d'insulina és molt més comú i afecta al 75-90% dels pacients diabètics. La diabetis tipus 2 es caracteritza per una combinació de factors genètics i ambientals que afecten a la capacitat de l'organisme per respondre a les accions de la insulina (Stumvoll M, 2005).

En els estats primerencs de la malaltia es caracteritza per una conjunció d'anormalitats metabòliques i hormonals com la resistència a la insulina, hiperinsulinèmia, hiperlipidèmia, hipercolesterolèmia, intolerància a la glucosa i hipertensió. Tot aquest conjunt de símptomes es denominen en el seu conjunt sovint com a síndrome metabòlic X (Reaven GM, 1992).

La malaltia estar causada per dos factors: 1) la resistència a la insulina, definida com la incapacitat de la hormona per suprimir la producció hepàtica de glucosa i per promoure la captació de glucosa per part dels teixits perifèrics, i 2) una funció disminuïda de la cèl·lula  $\beta$  del pàncreas. D'aquesta manera la malaltia es caracteritza per una disminució progressiva de l'acció de la insulina, seguida d'una incapacitat per part de la cèl·lula  $\beta$  de compensar aquesta resistència a les accions de la hormona. Cronològicament i metabòlicament la malaltia podria seguir aquest curs: la resistència a la insulina sembla ser la lesió primària, deguda a factors genètics, a l'edat, estil sedentari de vida o a canvis metabòlics produïts per l'obesitat (Alberti KG, 1998). Aquesta resistència a la insulina causa una fallada en la captació de glucosa estimulada en el múscul. A més, en el teixit adipós, la resistència als efectes antilipolítics de la insulina causa una alliberació augmentada d'àcids grassos. Alhora, aquests àcids grassos atenuen la capacitat de la insulina d'inhibir la producció de glucosa hepàtica, assolint una situació d'hiperglicèmia. Aquesta desregulació en el metabolisme lipídic i de carbohidrats accelera la

progressió de la resistència a la insulina. Normalment la cèl·lula  $\beta$  del pàncreas compensa l'estat de resistència a la insulina incrementant la secreció d'insulina, agravant encara més la resistència a la insulina. Arribat a un punt, la cèl·lula  $\beta$  perd aquesta capacitat i deixa de respondre apropiadament a les concentracions de glucosa. Això condueix a un deteriorament de la homeostasi de la glucosa i a l'aparició de la intolerància a la glucosa.

La diabetis tipus 2, en contra de la de tipus 1, està fortament associada a l'obesitat (Nadler ST, 2000). Al voltant del 80% dels individus amb diabetis tipus 2 són obesos, i més concretament amb obesitat visceral central.

## **2.1 Resistència a la insulina**

La resistència a la insulina és un estat comunament associat a l'obesitat. La resistència a la insulina es defineix com a una patofisiologia en la qual en concentracions normals d'insulina no es produeix una resposta adequada en els teixits diana com el teixit adipós, el múscul i en el fetge. Després d'una ingesta els nivells de glucosa en plasma augmenten. Aquest augment és detectat per les cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques que procedeixen a la secreció d'insulina per tal de mantenir els nivells de glucosa constants (Pørksen N, 2002). La insulina secretada pel pàncreas exerceix varies funcions sobre els teixits perifèrics: 1) estimula la captació de glucosa per part del múscul, 2) inhibeix la producció hepàtica de glucosa i 3) inhibeix la hidròlisi de greixos del teixit adipós i estimula la captació de glucosa en el propi teixit adipós. Tot això acaba comportant la disminució en sang dels nivells de glucosa. Les cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques tenen la capacitat d'adaptar-se a canvis en la sensibilitat a la insulina en la resta de l'organisme. Davant d'una pèrdua de sensibilitat a la insulina, les cèl·lules pancreàtiques secreterien més insulina i viceversa, comportant l'aparició de la resistència a la insulina i convertint els individus amb hiperinsulinèmics. Els continus nivells elevats d'insulina tenen efectes addicionals en molts teixits, especialment en els teixits que segueixen sent sensitius a la insulina com el ronyó i els ovaris (Weickert MO, 2006).

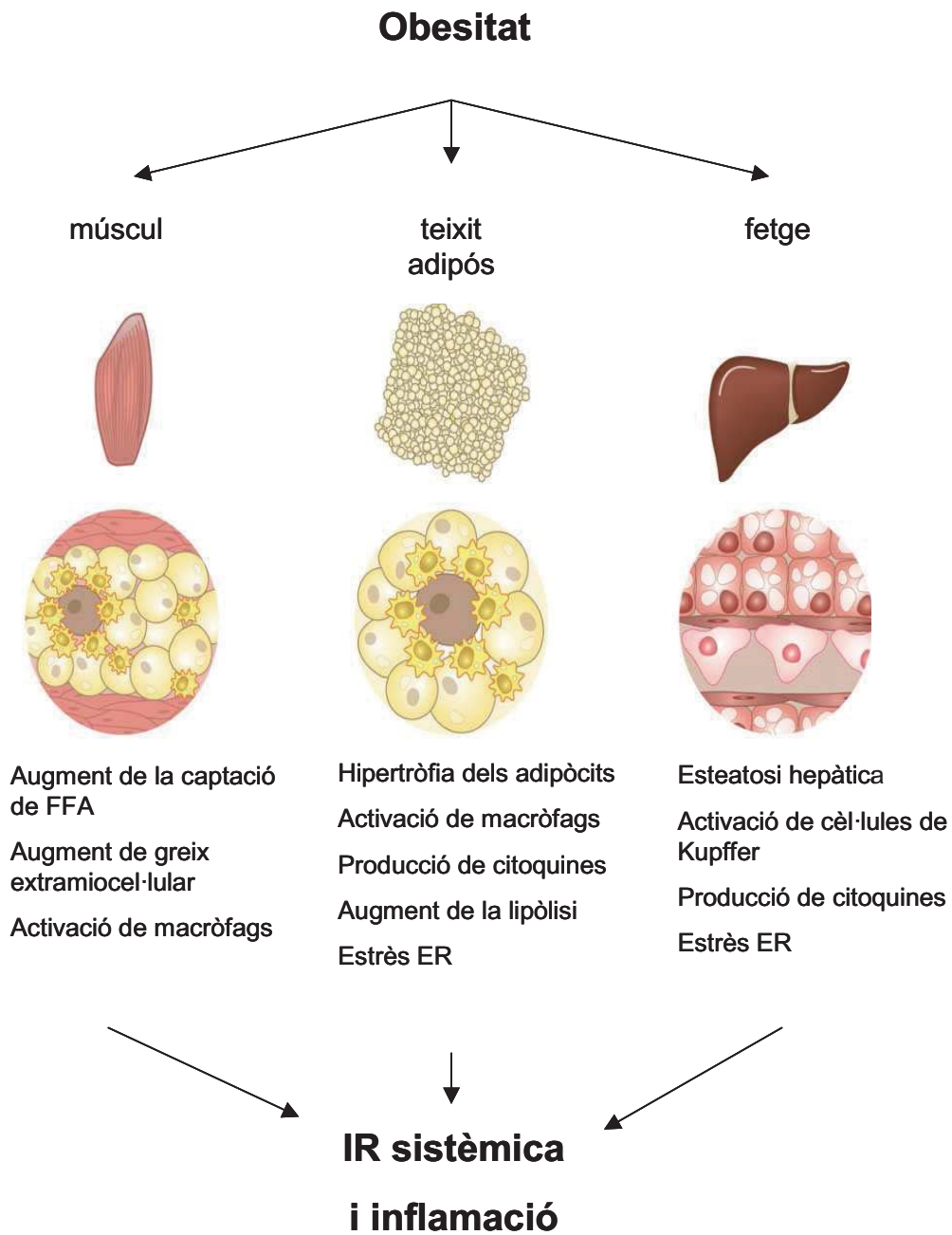
Estudis realitzats tan en animals com en humans han demostrat que l'increment o la pèrdua de pes es correlacionen directament amb una pitjor o millor sensibilitat a la insulina (Freidenberg GR, 1988). La resistència a la insulina va també lligada a l'edat, a un estil de vida sedentari o inclús a una predisposició genètica, que també es consideren causes de l'aparició de la diabetis tipus 2.

Aquesta conclusió es basa en estudis que demostren la presència de la resistència a la insulina en pacients amb DT2 (Lillioja S, 1993), la presència de la resistència a la insulina en la descendència no diabètica de pacients amb DT2 (Warram JH, 1990), estudis que demostren l'ús de la resistència a la insulina com un marcador per predir una futura DT2 (Lillioja S, 1993), i l'ús d'agents sensibilitzadors a la insulina per la prevenció de la DT2 (Buchanan TA, 2002).

S'han proposat dos mecanismes principals per tal d'explicar la resistència a la insulina associada a l'obesitat: per un costat l'acumulació ectòpica de greixos en forma de triacilglicerols fora del teixit adipós (Savage DB, 2007) i per una altra banda l'augment de l'estat d'inflamació que es produeix en el fetge i en el teixit adipós sota condicions d'obesitat (Shoelson SE, 2007).

L'acumulació ectòpica de greixos (figura 1) es pot produir de tres maneres diferents: per una major captació d'àcids grassos, per una major síntesis d'àcids grassos en el propi teixit o per una reducció en l'oxidació d'àcids grassos o en l'exportació en forma de VLDL (Shulman GI, 2000). La contribució de cadascun d'aquests factors pot variar depenent de l'estat fisiològic i del teixit que s'estigui estudiant. Tot i que la DT2 associada a l'obesitat s'ha relacionat directament amb l'acumulació lipídica en el fetge, en el múscul i amb una reducció de l'oxidació d'àcids grassos com a processos més importants (Petersen KF, 2001).

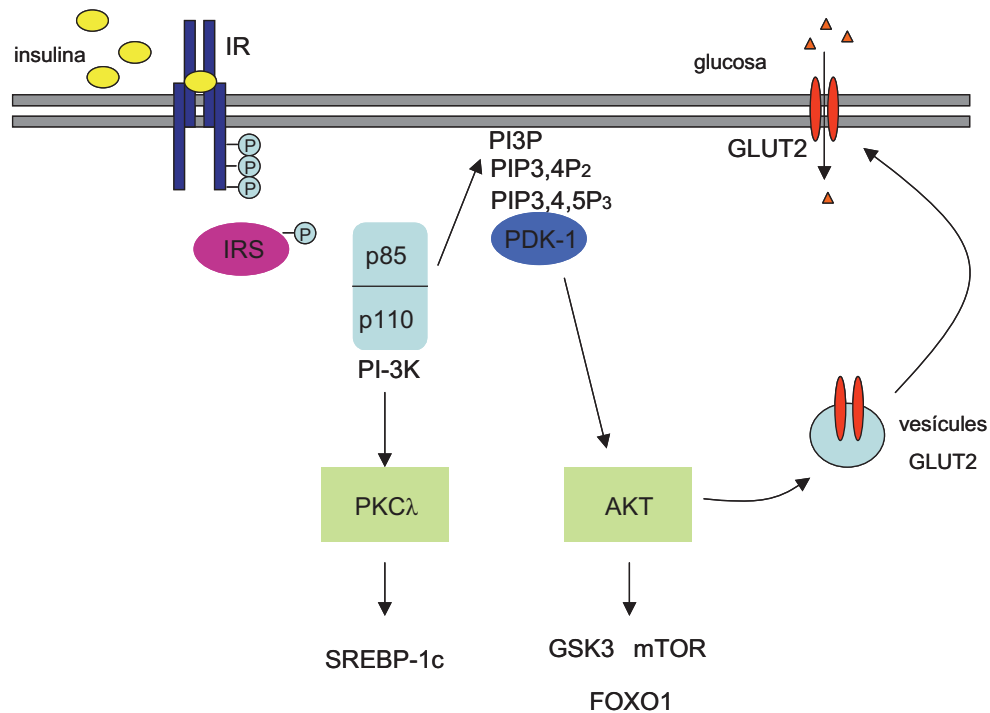
Respecte el metabolisme de la glucosa, la resposta a la insulina per part dels teixits diana com el fetge, el múscul i el teixit adipós i altres hormones circulants en determina la concentració de glucosa, àcids grassos i altres metabolits en sang. Els nivells de glucosa en sang venen principalment determinats per un balanç entre la glucosa sintetitzada pel fetge, la qual és inhibida per la insulina i per la captació de glucosa per part del múscul, que és estimulada per l'acció de la insulina (Pessin JE, 2000). En el teixit adipós la insulina promou la captació i l'emmagatzament dels àcids grassos lliures en forma de TAG i inhibeix la lipòlisi dels TAG emmagatzemats. L'obesitat indueix un estat de resistència a la insulina en els tres teixits provocant una síntesi continua de glucosa per part del fetge, una reducció de la captació de la glucosa per part del múscul i un augment de l'alliberament d'àcids grassos lliures per part del teixit adipós (Qureshi K, 2007). S'ha descrit que una acumulació de greixos comporta en els diferents teixits una alteració dels mecanismes moleculars de transducció del senyal de la insulina (Meshkani R, 2009).



**Figura 1. Obesitat i resistència a la insulina sistèmica.** L'obesitat induïx alteracions en el teixit adipós, en el fetge i en el múscul esquelètic que condueixen a una resistència a la insulina sistèmica i a l'inflamació. FFA: àcids grassos lliures; ER: Reticle endoplasmàtic; IR: resistència a la insulina. Adaptació de la figura 1 extreta d'Olefsky JM, 2010.

## 2.2 Transducció del senyal de la insulina

L'acció de la insulina es dur a terme mitjançant la unió al seu receptor (IR) que promourà tot un seguit de reaccions de transfosforilació (Pessin JE, 2000) (figura 2). El receptor de la insulina pertany a una família de receptors de factors de creixement amb una activitat tirosina quinasa endògena. El receptor de la insulina és una glucoproteïna heterotetramèrica que es compon per dues subunitats  $\alpha$  i dues subunitats  $\beta$ . La insulina s'uneix a la subunitat  $\alpha$  extracel·lular i indueix un canvi conformacional que provoca un apropament de les dues subunitats  $\alpha$ . Això condueix a una ràpida autofosforilació dels receptors en diversos residus de tirosina. La fosforilació de la Tyr 960 crea un lloc de reconeixement pels dominis d'unió a fosfotirosines dels substrats del receptor de la insulina (IRS).



**Figura 2. Cascada de senyalització de la insulina en el fetge.** La unió de la insulina al seu receptor activa la fosforilació en la tirosina. Un cop activats els receptors per autofosforilació propagaran el senyal de la insulina mitjançant la fosforilació intracel·lular de varies proteïnes. PI3K, Grb2 i SHP2 activen les diferents respostes metabòliques de la insulina. Un cop es transdueix el senyal, l'Akt fosforila i inactiva la GSK3, que activarà el factor de transcripció Foxo1 inhibint la gluconeogènesi i la glicogenolisi. IR: receptor de la insulina; FOXO1: *forkhead box-containing* proteïna O 1, GSK3: glicogen sintasa quinasa 3; Grb2: proteïna d'unió al factor de creixement 2, IRS: substrat receptor de la insulina, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa, PKC: proteïna quinasa C; mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*.



S'han identificat 12 IRSs: IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5, IRS-6, Gab-1, tres isoformes de Shc, p62<sup>dok</sup> i APS (proteïna adaptadora que conté un domini PH i SH2) (White MF, 1998). IRS-1 va ser el primer en descobrir-se i és l'encarregat de transmetre el senyal de la insulina cap el transport de glucosa, síntesi de proteïnes, glucogen i lípids, mitogènesi i expressió de gens. A més, IRS-1 conté entre 20-22 llocs de fosforilació en tirosines i més de 30 llocs de fosforilació en serina o treonina (Sun XJ, 1993). Un cop activats els receptors per autofosforilació propagaran el senyal de la insulina mitjançant la fosforilació intracel·lular de varies proteïnes. IRS-1 és clau en l'estimulació del senyal d'insulina i la captació de glucosa en el múscul i en el teixit adipós, mentre que els efectes anabòlics de la insulina en el fetge es duen a terme mitjançant IRS-2. Els IRSs units al receptor de la insulina poden ser fosforilats per aquest en varies tirosines, creant al mateix temps nous llocs d'interacció per altres proteïnes. Una d'aquestes proteïnes és la PI3K. Aquesta proteïna és una quinasa lipídica heterodimèrica amb una gran varietat de funcions cel·lulars. La PI3K està composta per una subunitat reguladora (p85) que conté dos dominis SH2 responsables de la unió al IRS i una subunitat catalítica (p110). Existien com a mínim vuit isoformes de la p85 codificades per tres gens diferents.

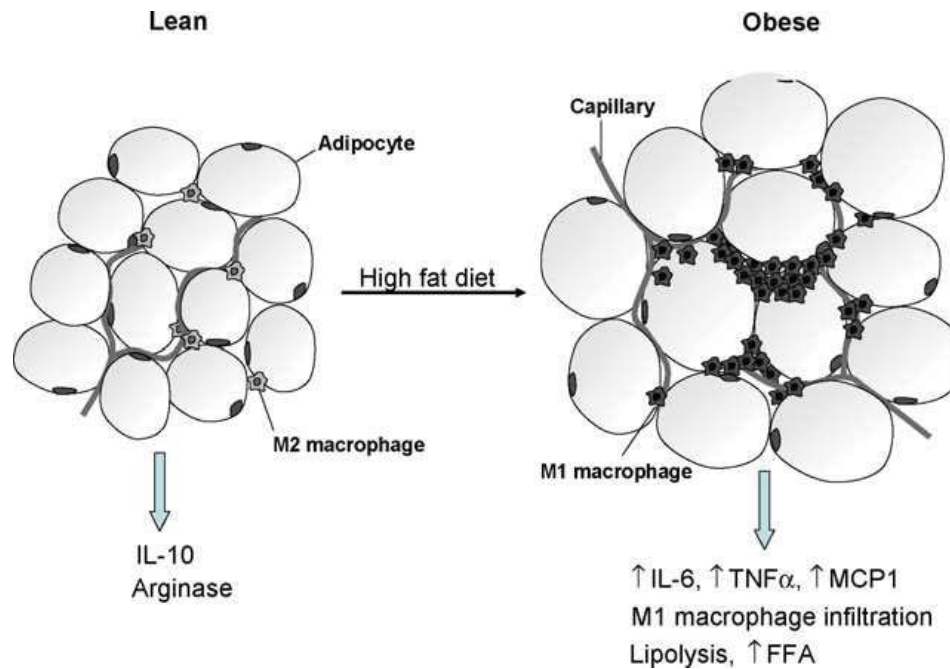
La fosforilació de IRS-2 permetrà l'associació amb la subunitat reguladora p85 de la PI3-quinasa. La subunitat catalítica de PI3-quinasa, p110, fosforilarà els fosfoinositols com el fosfoinositol-4-5-bisfosfat formant el fosfoinositol-3-4-5-trifosfat (Vaan der Kaay J, 1997). Aquesta molècula es comporta com un missatger que pot activar a varies proteïnes com la PDK o algunes isoformes de PKC. Una proteïna efectora del fosfoinositol-4-5-trifosfat és l'Akt, la qual quedarà reclutada a la membrana plasmàtica. L'activació d'Akt també requereix la proteïna PDK-1, que conjuntament amb una altra quinasa duran a terme la fosforilació de l'Akt. D'aquesta manera la PDK és la responsable de l'activació de l'Akt mitjançant la fosforilació de la Ser473 i la Thr308 (Alessi DR, 1996). Existeixen tres isoformes d'Akt/PKB (Akt1, Akt2 i Akt3) que s'expressen de forma ubiqua. Akt1 i Akt2 son les encarregades de conduir el senyal de la insulina en el múscul i el teixit adipós. L'Akt activada és l'encarregada de dirigir el senyal de la insulina cap el transport de glucosa i la síntesi de glicogen. Un cop fosforilada l'Akt en el citoplasma, permetrà la fosforilació i inactivació de la GSK-3, l'enzim responsable de l'últim pas per a la síntesi de glicogen. Aquesta inhibició disminueix el nivell de fosforilació de la glicogen sintasa (GS), augmentant la seva activitat. Per altra banda, la cascada de senyalització induïda per la insulina és capaç també d'activar la proteïna fosfatasa 1 o PP1, que desfosforilarà la glicogen sintasa augmentant la seva activitat (Brady MJ, 1997).

### 3. OBESITAT I INFLAMACIÓ

L'obesitat es defineix com un estat d'inflamació associat a l'acumulació en excés de greix. En els últims temps s'ha relacionat la resistència a la insulina amb un estat crònic d'inflamació i s'ha demostrat que aquesta intervé en el seu desenvolupament (Shoelson SE, 2003).

La primera relació entre obesitat, inflamació i l'acció de la insulina, es va trobar amb un augment de l'expressió de la citoquina proinflamatòria anomenada  $TNF\alpha$  en un estudi de l'any 1993 de Hotamisligil GS i col. (Hotamisligil GS, 1993). Aquest estudi demostrava l'expressió del  $TNF\alpha$  per part dels adipòcits d'animals obesos (rates fa/fa i ratolins ob/ob). Altres evidències del paper clau del  $TNF\alpha$  amb la resistència a la insulina foren els estudis publicats per Uysal et al (Uysal KT, 1997) on la manca del receptor pel  $TNF\alpha$  en ratolins obesos genèticament (ob/ob) milloraven la resposta a la insulina. Aquestes troballes van ser molt similars en humans (Kern PA, 1995). A nivell molecular s'ha demostrat que l'exposició de  $TNF\alpha$  o d'àcids grassos lliures a les cèl·lules estimula la inhibició de la fosforilació de les serines del IRS-1 (Paz K, 1997 i Aguirre V, 2000).

La inflamació és un component més de l'obesitat associada amb la resistència a la insulina. Un potent i important iniciador de la inflamació en l'obesitat és el teixit adipós el qual secreta tot un conjunt de substàncies com la leptina, l'adiponectina, la resisitina, el  $TNF\alpha$ , IL-6, MCP-I (Dandona P, 2004). Estudis recents han demostrat l'increment en pacients obesos dels nivells de  $TNF\alpha$ , IL-6 i de CRP. A més, la ingesta de glucosa i greixos poden induir inflamació activant les principals vies proinflamatòries de les cèl·lules i augmentant l'estrès oxidatiu (Kern PA, 2001 i Pradhan AD, 2001). La ingesta excessiva de greix està associada amb una acumulació de greix en els adipòcits que promouen l'expansió del propi teixit adipós desenvolupant una hipetròfia dels adipòcits que secretaran de manera desmesurada un conjunt de molècules inflammatòries com el TNF, IL-6 i la MCP-I entre d'altres (figura 3). La producció de tot el conjunt de senyals inflamatoris té un efecte local que comporta un estat inflamatori sistèmic (Xu H, 2003).



**Figura 3. L'obesitat augmenta la secreció de citocines proinflamatòries en el teixit adipós.**

L'obesitat induïx alteracions en el teixit adipós, en el fetge i en el múscul esquelètic que condueixen a una resistència a la insulina sistèmica i a la inflamació. FFA: àcids grassos lliures; IL-6: interleucina 6; TNF $\alpha$ : factor necròtic tumoral  $\alpha$ ; MCP-I: proteïna quimioattractant de macròfags 1; IL-10: interleucina 10; M1 i M2: macròfags 1 i 2. Figura 3 extreta de Galic S, 2010.

#### 4. METABOLISME HEPÀTIC EN L'OBESITAT

El fetge és l'òrgan vital en els vertebrats que juga un paper fonamental en la coordinació metabòlica de tot el cos, incloent el metabolisme de carbohidrats, lípids, proteïnes, metabolisme xenobiòtic i destoxificació. Algunes de les funcions més importants del fetge són la gluconeogènesi, la glucòlisi, la glicogènesi, la lipogènesi, la síntesi de colesterol, síntesi de factors de coagulació com el fibrinògen, la conversió de l'amoni a urea, la producció i excreció de la bilis, la síntesi de proteïnes plasmàtiques i la producció de proteïnes inflamatòries (Leclercq IA, 2007). Moltes d'aquestes funcions metabòliques que es duen a terme en el fetge estan controlades per l'acció de varies hormones circulants com la insulina. La insulina és una hormona amb múltiples efectes en el metabolisme del cos. Promou la captació de glucosa per part del teixit adipós i el múscul i frena la producció de glucosa mitjançant la inhibició de la glicogenolisi i la gluconeogènesi en el fetge. La insulina també juga un paper clau en la síntesi i l'emmagatzement de greix, síntesi proteica, creixement cel·lular, proliferació i diferenciació cel·lular (Muniyappa R,

2007). Degut a l'obesitat i el sobrepès moltes d'aquestes funcions queden totalment alterades provocant una desregulació en el metabolisme.

#### **4.1 Alteracions en el metabolisme de la glucosa**

S'ha descrit que els continus nivells elevats de FFA en sèrum estimulen la producció de glucosa hepàtica mitjançant l'activació de la gluconeogènesi i de la glicogenolisi sent en gran part les responsables de la hiperglicèmia en dejú (Staher P, 2003 i 2004). En una situació normal en el fetge, la correcta transducció del senyal d'insulina condueix a una fosforilació de l'Akt, que aquesta, alhora activa el factor de transcripció Foxo1. Aquest intervé en la regulació de la producció de glucosa hepàtica inhibint la via de la gluconeogènesi. L'acumulació en excés d'intermediaris lipídics en el fetge com els DAG, activa a la PKC $\epsilon$ , interferint amb la cascada de senyalització de la insulina no permeten la correcta fosforilació de l'Akt i com a últim pas no s'activaria Foxo1. D'aquesta manera es produeix un augment de la producció de glucosa hepàtica mitjançant un increment dels principals enzims responsables de la gluconeogènesi com la PEPCK i la G6Pasa (Matsuzaki H, 2003). Degut a defectes de l'acció de la insulina en el fetge es veu doncs minvada la translocació dels transportadors de glucosa (Glut2) cap a la membrana dels hepatòcits reduint la captació de glucosa per part del fetge.

Una altra hormona important en el control dels nivells de glucosa és el glucagó. El glucagó promou la síntesi de glucosa durant el dejuni. Generalment, en un estat normal, els propis nivells de glucosa i la ingesta d'aliments redueixen els nivells de glucagó, en canvi, en pacients obesos i/o diabètics mantenen nivells elevats de glucagó. La manca de supressió en la secreció del glucagó afecta a la producció hepàtica de la glucosa activant la gluconeogènesi i la glicogenolisi (Dunning BE, 2007). S'ha reportat àmpliament que defectes en la senyalització de la insulina en el fetge correlacionen directament amb una hiperglicèmia. Animals que presenten una delecció específica en el receptor de la insulina en el fetge mostren una severa intolerància a la glucosa (Michael MD, 2000), mentre que aquesta delecció en el múscul o en el teixit adipós no té efectes sobre els nivells de glucosa i insulina (Brüning JC, 1998 i Kim JK, 2000). Això suggereix, que la resistència hepàtica a la insulina és necessària per desenvolupar hiperglicèmia i intolerància a la glucosa (Pirola L, 2004).

Un altre punt clau en el metabolisme de la glucosa i la resistència a la insulina és el complex de la piruvat deshidrogenasa que controla el flux del piruvat cap a acetil-CoA per ser oxidat en el cicle de Krebs (Sugden MC, 2006). S'ha descrit que en diferents situacions com el dejuni, la diabetis o la ingesta de dietes riques en greixos que provoquen nivells elevats de FFA en el sèrum, aquests augmenten els nivells de la PDK4 en el fetge, inhibint el complex de la piruvat deshidrogenasa i afavorint l'oxidació d'àcids grassos (Roche TE, 2007). Però això, en el cas de la diabetis es tracta d'una mala adaptació, ja que en la diabetis es relaciona amb una hiperglicèmia i la PDK4 ens està frenant la conversió de la glucosa i afavorint l'oxidació d'àcids grassos, que es troba inhibida degut a l'activació de la síntesi lipídica. En resum, en una estat obès i insulinoresistent són varis els mecanismes pels quals incrementen perillosament els nivells de glucosa en sang: 1) la síntesi de glucosa hepàtica es veu fortament augmentada i 2) la captació de glucosa per part del fetge, múscul i teixit adipós es veu reduïda.

## 4.2 Alteracions en el metabolisme lipídic

En un estat de resistència a la insulina s'incrementen els nivells d'àcids grassos lliures (FFA) en el plasma (Gorden ES, 1960), els quals fan augmentar la captació d'aquests per part dels hepatòcits augmentant els seus nivells. Sota condicions de resistència a la insulina la HSL (*hormone-sensitive lipase*) no actua correctament sobre el teixit adipós i no inhibeix la lipòlisi, com a conseqüència d'aquest fet es produeix un alliberament en excés de FFA per part del teixit adipós blanc (Gonzalez-Yanes C, 2005). A més, en un estat d'obesitat, els nivells d'insulina són més elevats i fan incrementar l'expressió de factors de transcripció com el de SERBP-1c, el qual és un activador de la via lipogènica, augmentant la síntesi hepàtica d'àcids grassos lliures, triacilglicèrids, colesterol i fosfolípids (Shimomura I, 1999 i Horton JD, 2003).

Així doncs en el fetge, es veu augmentada l'activitat d'enzims involucrats en la síntesi lipídica de *novo*, com l'acetil-CoA carboxilasa (AAC), responsable de la síntesi del malonil-CoA i de l'àcid gras sintasa (FAS) augmentant les reserves d'aquests en el fetge. Els nivells elevats de FFA es troben en equilibri amb les reserves de TAG emmagatzemats, formant grans vacuoles de greix dins del citoplasma dels hepatòcits (Pessayre D, 2005). En aquesta sobreproducció en la síntesi d'àcids grassos i triacilglicèrids els hepatòcits no s'engrandeixen infinitament i de nou es produeix un equilibri augmentant l'eliminació dels FFA i dels TAG per

part del fetge. Aquest augment de la concentració en els hepatòcits dels FFA fa disminuir la sensibilitat de la CPT1 degut a l'augment de malonil-CoA, el seu inhibidor fisiològic, promou l'activació de PPAR $\alpha$  (Vega RB, 2000) i l'augment dels nivells d'UCP2 (Cortez-Pinto H, 1999) que incrementaran només eventualment en els mitocondris la captació i oxidació de FFA.

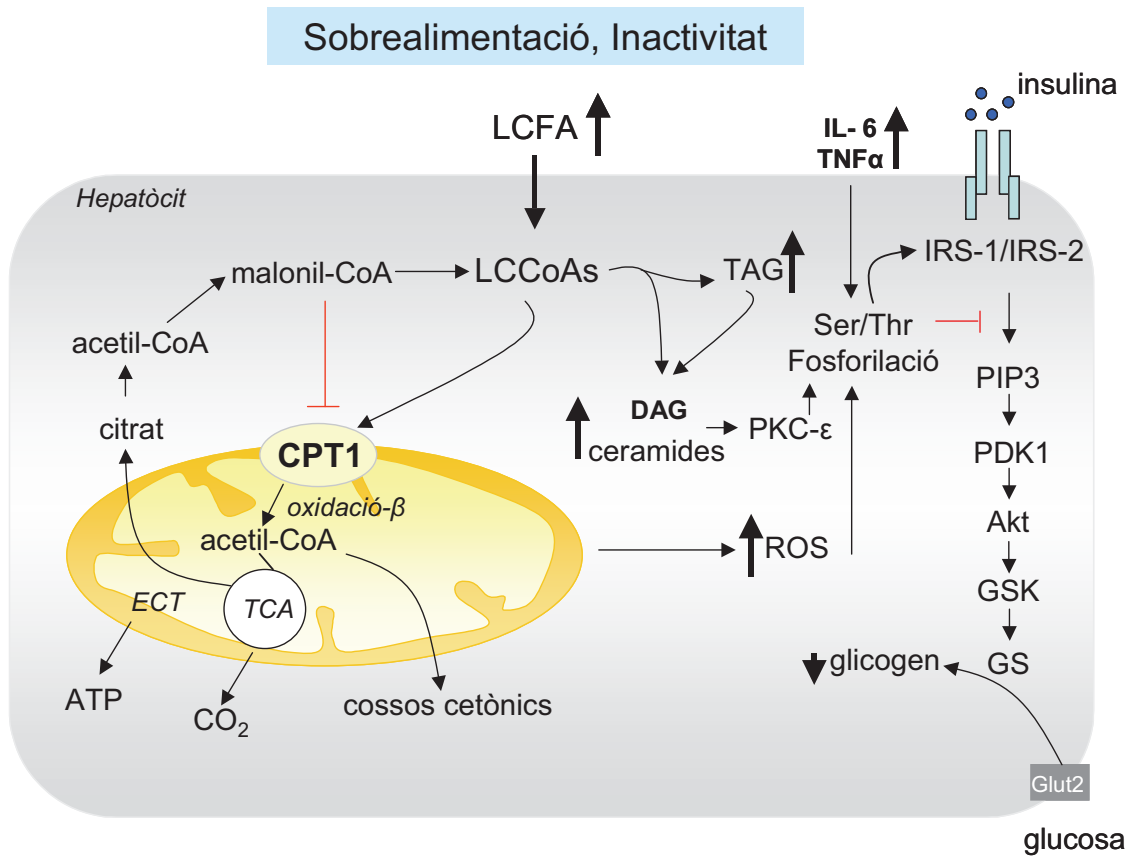
Respecte l'activació de la síntesi de triacilglicèrids en el fetge, són claus l'acció d'enzims com la SCD1, que intervé en la desaturació i elongació dels àcids grassos, monoinsaturant els àcids grassos saturats utilitzant principalment palmitoil- i esteroil-CoAs com a substrats. Aquests dos àcids grassos monoinsaturants són la principal font d'aportació d'àcids grassos dels fosfolípids de membrana, triacilglicèrids i esters de colesterol. A més de formar part de diferents lípids, els àcids grassos monoinsaturats actuen com a mitjancers de transducció de senyals i en la diferenciació cel·lular (Kim JH, 1999 i Ntambi, JM 1999). En estudis recents s'ha descrit que la deficiència en diferents models d'animals de la SCD1 protegeix de l'adipositat i de l'esteatosi hepàtica (Cohen P, 2002 i Ntambi JM, 2002). Un altre enzim clau en la síntesi de TAG és la DGAT que regula l'últim pas per a la formació dels TAG (Zammit VA, 2008). S'han identificat dos gens diferents per la DAGT: DAGT1 i DAGT2 que catalitzen reaccions similars. Estudis fets amb ratolins *Dagt1*<sup>-/-</sup>, suggereixen que la DGAT1 no és un enzim que tingui un efecte directe en el metabolisme de TAG i no és essencial per a la vida (Smith SJ, 2000). En canvi, estudis realitzats amb ratolins *Dgat2*<sup>-/-</sup> han mostrat una severa reducció en els nivells de TAG, demostrant que la DGAT2 és fonamental per a la síntesi de TAG en mamífers i crucial per a la supervivència dels animals (Stone SJ, 2004).

Un altre aspecte en el metabolisme lipídic és que l'increment en les reserves de TAG en el fetge anirà associat a una major secreció de lipoproteïnes (Apo B) i a la secreció augmentada de VLDL (Sparks JD, 1994). Per dur a terme aquest exportació de les VLDL el fetge necessita l'acció conjunta de l'ApoB i de la MTP (Rizzo M, 2010). Així doncs, degut en part a la gran aportació de greix per la dieta, l'alliberament de FFA per part del teixit adipós i de la síntesi activada de la lipogènesi en el fetge, s'acumula un excés de greix que acabarà conduint a una sèrie d'anormalitats metabòliques i a l'esteatosi hepàtica severa (figura 4).

Existeix una relació molt estreta entre l'esteatosi hepàtica i la resistència a la insulina. En molts models de ratolins s'ha demostrat que una disminució en els dipòsits de TAG en el fetge millora la sensibilitat a la insulina per part del fetge (Savage DB, 2006; Dentin R, 2006; Neschen S, 2005). Però a hores d'ara, encara

es desconeix molts dels mecanismes pel qual el fetge desenvolupa resistència a la insulina. Moltes línies d'investigació apunten com a responsables a metabòlits lipídics com acil-CoAs de cadena llarga i diacilglicerols (DAG) com a responsables de la pèrdua de sensibilitat a la insulina en els teixits. A més a més, l'acumulació excessiva de TAG incrementa altres vies metabòliques com la formació de ROS i ceramides (Kohli R, 2007) que acabaran comportant una disfunció mitocondrial (Peysare D, 2007). Un dels mecanismes pels quals això podria succeir es a través dels alts nivells de glucosa que incrementen els nivells de malonil-CoA, el qual per un costat és el precursor de la lipogènesi i per tant de la síntesi de *novo* de lípids i per un altre costat és l'inhibidor al·lostèric de la CPT1, l'enzim limitant de la importació d'acils-CoA de cadena llarga cap a l'interior del mitocondri per a ser  $\beta$ -oxidats (McGarry JD, 2002). Això converteix a la CPT1 en una potencial diana farmacològica pel tractament de desordres metabòlics com l'obesitat, malalties coronàries, resistència a la insulina i diabetis (Ruderman NB, 1999). A més, la insulina inhibeix a nivell hepàtic l'expressió d'enzims implicats en la oxidació- $\beta$  a través de PGC1 $\alpha$  (Muio D, 2007). L'acumulació en excés de TAG en els hepatòcits desencadenaria l'activació de la PKC- $\delta$ , PKC- $\epsilon$  i de la JNK interferint així amb la fosforilació de IRS-1 i IRS-2 dificultant una resposta adequada per part dels hepatòcits enfront la insulina (Virkamaki A, 1999 i Previs SF, 2000). També múltiples treballs realitzats en pacients amb DT2 relacionen l'increment en la producció de les VLDL amb una disminució en l'activitat de PI3-K, dificultant així la cascada de senyalització de la insulina (Burgering BM, 1995).

Tots aquests mecanismes són els responsables de la resistència a la insulina i del desenvolupament de l'esteatosi hepàtica durant situacions de llargs períodes de sobrealimentació. També la ingesta continuada de dietes riques en àcids grassos promou en rosegadors l'acumulació de TAG, acils-CoA de cadena llarga, DAG i ceramides que acaben comportant i desenvolupant resistència a la insulina (Griffin M, 1999; Chavez JA, 2003 i Chavez JA, 2005).



**Figura 4: Desordre metabòlic en el fetge.** La sobrealimentació crònica augmenta els nivells de malonil-CoA, el qual promou la síntesi de *novus* d'àcids grassos i inhibeix la CPT1. Com a resultat, els acils-CoA de cadena llarga deriven cap a la formació de TAG, intermediaris, DAG i ceramides. La sobrealimentació també provoca un augment en els nivells de ROS i en les interleucines que conjuntament amb els intermediaris lipídics suprimiran la cascada de senyalització de la insulina. LC-CoAs: acils CoA de cadena llarga; CPT1: carnitina-palmitoiltransferasa 1; ROS: espècies reactives d'oxigen; TCA: cicle de l'àcid tricarboxílic; ETC: cadena de transport d'electrons; DAG: diacilglicerols; PKC: proteïna quinasa C.

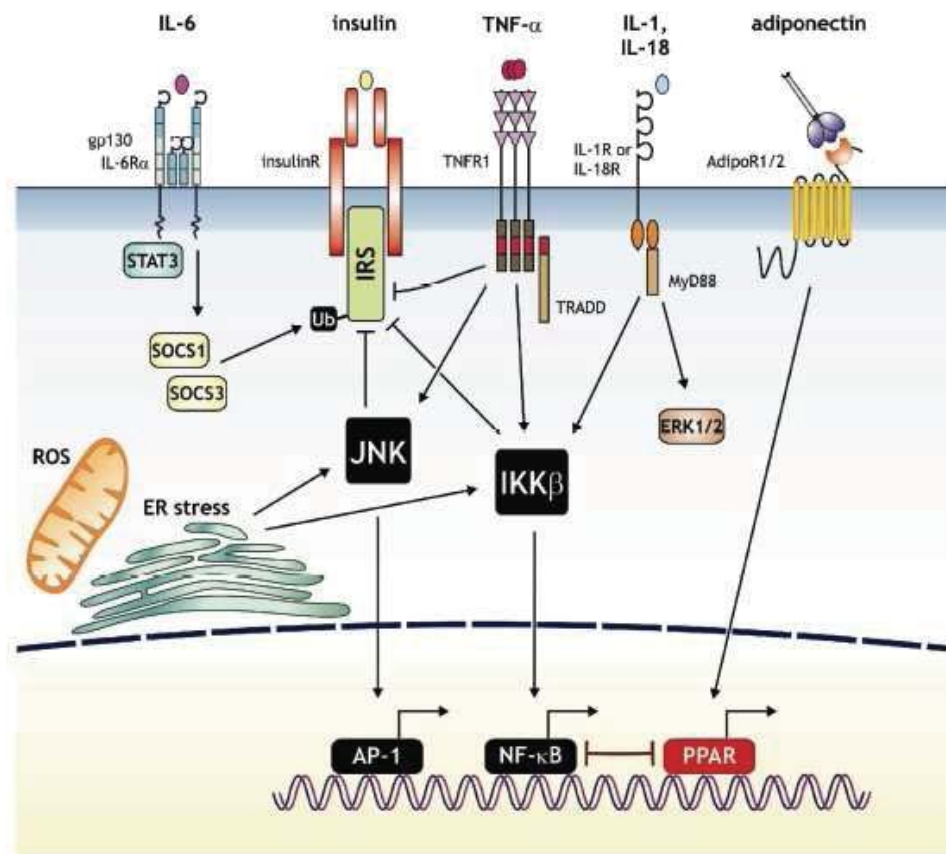


### 4.3 Inflamació i resistència a la insulina

L'acumulació lipídica en el fetge en un estat de sobrepès i obesitat té conseqüències negatives per les funcions del propi fetge, que també comportaran un estat crònic d'inflamació. En l'obesitat s'observa com en el fetge apareix un augment dels nivells d'mRNA de citoquines proinflamàtòries com el TNF $\alpha$ , IL-1 i IL-6 (Shoelson SE, 2006). Aquestes substàncies proinflamàtòries activen la cèl·lules de Kupffer (que són els macròfags residents en el propi fetge), però no el seu nombre, les quals representen un 5% del total de les cèl·lules del fetge (Weisberg SP, 2003). Aquest augment en l'expressió de molècules inflamàtòries es relaciona directament amb un augment de la resistència a la insulina per part del fetge (Arkan MC, 2005).

S'han proposat dos mecanismes pels quals es relaciona l'efecte proinflamatori de l'obesitat amb la resistència a la insulina a nivell hepàtic: 1) la via del NF-kB, la qual és activada pel inhibidor de NF-kB (IKK- $\beta$ ). IKK- $\beta$  és una quinasa que bloqueja directament la cascada de senyalització de la insulina mitjançant la inhibició de la fosforilació del residu serina de IRS-1 o per l'activació de NF-kB, que és un factor de transcripció que estimula l'expressió de molècules proinflamatores com el TNF $\alpha$ , IL-6 (Hotamisligil GS, 2006). 2) Mitjançant la via de la JNK, que és un membre de la superfamília de la MAPK, és una serina/treonina quinasa que és activada per varis factors inflamatoris que estimularan la secreció de TNF $\alpha$  (Tilg H, 2008). A més, ambdues vies es poden activar mitjançant nivells elevats d'àcids grassos, fet que relaciona els nivells d'aquests amb el sistema immunitari. Varis estudis han demostrat tan en *in vivo* com en *in vitro* que l'activació de JNK-i i IKK- $\beta$  és suficient per induir resistència a la insulina sistèmica (Hotamisligil GS, 2006).

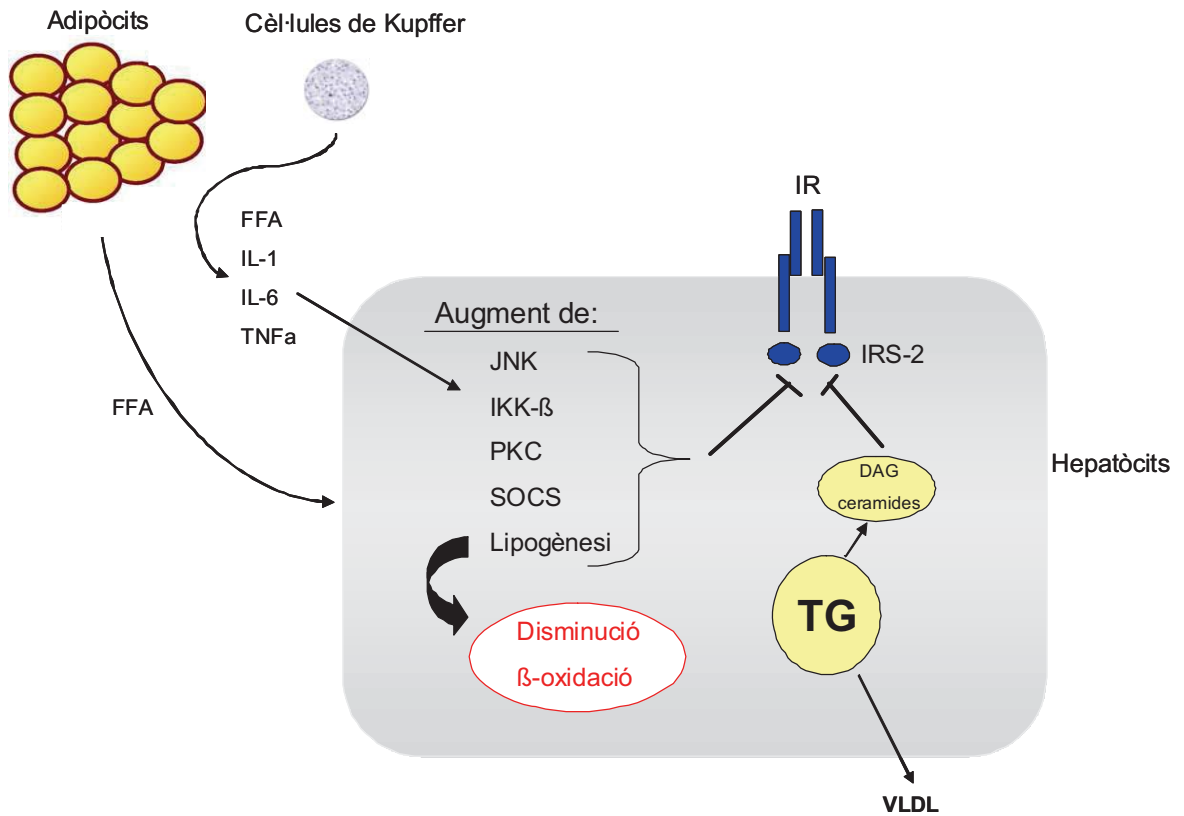
També s'ha descrit en molts estudis com la presència de ROS i ceramides es veuen augmentats degut a l'obesitat i com aquests també activarien les vies de JNK i NF-kB interferint amb la sensibilitat a la insulina (Summers SA, 2006). L'obesitat i les dietes riques en àcids grassos activarien les vies de IKK- $\beta$ /NF-kB i JNK en hepatòcits, però també en adipòcits. L'activació de la via NF-kB comporta l'increment de l'expressió de nombroses mol·lècules proinflamàtòries que poden causar resistència a la insulina, mentre que l'activació de JNK promou la fosforilació de IRS desregulant negativament la cascada de senyalització de la insulina (Cai D, 2005) (figura 5).



**Figura 5: Inflamació i resistència a la insulina.** L'expressió de molècules proinflamatòries com el TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 activa les vies de la JNK i IKK- $\beta$ . La secreció de IL-6 també augmenta els nivells de SOCS interferint en una adequada resposta a la insulina per part dels hepatòcits. Figura 1 extreta de Tilg H, 2008.

La secreció de TNF $\alpha$  i de la IL-6 activen en el fetge la síntesi de les proteïnes SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) supressores del senyal de citoquines tal com indica el seu nom. En concret SOCS3 s'uneix al receptor de la leptina i fosforila la proteïna JAK, i aquesta és capaç d'inhibir el factor de transcripció STAT3. SOCS1 i SOCS3 s'uneixen als IRS desencadenant la degradació dels IRS per ubiquitinació en els protosomes i inhibeixen d'aquesta manera la cascada de senyalització de la insulina (Krebs DL, 2001)

D'aquesta manera, la inflamació deguda a una acumulació ectòpica en excés de greix durant l'obesitat, indueix mitjançant varis mecanismes a la resistència sistèmica a la insulina (figura 6).



**Figura 6. Mecanisme de resistència a la insulina en un estat d'obesitat.** La inflamació crònica associada a l'obesitat induïx resistència a la insulina via la producció de factors circulants com els FFA i les citocines TNFα, IL-1 i IL-6. Aquests factors inhibeixen la senyalització de la insulina en els hepatòcits via l'activació de les proteïnes SOCS, i alguns tipus de quinases com la JNK, IKK-β i PKC.

## 5. PAPER DEL TEIXIT ADIPÓS I DEL MÚSCUL

El teixit adipós és un òrgan endocrí clau molt ben regulat que intervé amb múltiples malalties com l'obesitat, la dislipidèmia, la resistència a la insulina, la DT2, en la inflamació, malalties cardiovasculars i el síndrome metabòlic. Està format per un 50% d'adipòcits i el 50% restant estar constituït per cèl·lules vasculars, preadipòcits, neurals, immunitàries i leucòcits (Compher C, 2008). Els adipòcits, preadipòcits i macròfags del propi teixit adipós secreten un conjunt d'hormones i citoquines com la IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 i la MCP-I. Aquestes adipoquines juguen un paper molt important en la regulació d'altres teixits com són el fetge i el múscul (Isakson P, 2009). A més a més, secreta altres adiponectines com la leptina, la resistina i l'adiponectina que intervenen en la regulació de la ingesta i en el control metabòlic (Marra F, 2009). La leptina es produeix exclusivament en el teixit adipós, exerceix la seva funció central en l'hipotàlem i és important per la correcta regulació de la ingesta. S'ha descrit, que percentatges de greix corporal elevats es correlacionen amb nivells alts de leptina, i dipòsits de greix reduïts s'associen a nivells baixos de leptina. De tal manera, que s'ha relacionat directament la hiperleptinèmia amb la resistència a la insulina.

Els adipòcits són cèl·lules força complexes que en condicions normals intervenen en la síntesi de lípids, emmagatzematge i en la secreció de tot un conjunt de molècules antiinflamatòries i també la secreció de factors inflamatoris com el MCP-I. En l'obesitat la mida dels adipòcits augmenta, disminueix la capacitat de diferenciació dels preadipòcits i es produeix una hipertròfia i engrandiment dels adipòcits que es relaciona amb la resistència a la insulina que desenvolupen els propis adipòcits. Els adipòcits grans són més insulinoresistents, lipolítics, secreten més citoquines proinflamatòries i menys adiponectina (Isakson P, 2009) i mostren un augment en el nombre de cèl·lules mononuclears (Feuerer M, 2009; Liu J, 2009; Lumeng CN, 2009). L'acumulació de macròfags en el teixit adipós es veu augmentada en un estat d'obesitat (Weisbweg SP, 2003).

Molts estudis correlacionen el TNF $\alpha$  i la IL-6 amb la resistència a la insulina associada a l'obesitat com dos dels promotors més importants de la inflamació. Així com la IL-6 és secretada pels mateixos adipòcits, el TNF $\alpha$  és secretat pels macròfags infiltrats dins del teixit adipós, que també faran augmentar la secreció dels nivells de iNOS. Així doncs, el TNF $\alpha$  i la IL-6 promouen la lipòlisi i l'excreció de FFA, els quals contribueixen a l'augment de la producció de glucosa per part del

fetge i a la resistència a la insulina (Hotamisligil GS, 1995). A més a més, l'IL-6 provoca inflamació no només en el propi teixit adipós sinó també en altres cèl·lules com en el fetge (Klover PJ, 2005). L'augment de la secreció de l'IL-6 interfereix en la cascada de senyalització de la insulina en el mateix teixit adipós promouen la resistència a la insulina (Rotter V, 2003). L'IL-6 reduiria l'activitat lipoproteïna lipasa (LLP) en el propi teixit adipós, comportant una menor hidròlisi de les lipoproteïnes riques en TAG, contribuint d'aquesta manera amb la resistència a la insulina (Liu E, 2005).

Una altra adipoquina important en el desenvolupament de la resistència a la insulina és la resistina, que fou descoberta originàriament durant una cerca de gens que s'indueïen durant la diferenciació dels adipòcits (Holcomb IN, 2000). L'administració de resistina inhibeix l'acció de la insulina en ratolins normals (Kim KH, 2001) i en ratolins alimentats amb dieta grassa, els nivells de resistina augmenten desenvolupant la resistència a la insulina (Muse ED, 2004).

Per últim, una altra adipoquina a tenir en compte és la Acrp30 (*adipocyte complement-related protein*) o adiponectina, una proteïna de 30 kDa que la seva expressió augmenta 100 cops durant la diferenciació dels adipòcits (Scherer PE, 1995). Contràriament al que succeeix amb les altres adipoquines, l'expressió de la Acrp30 disminueix en el teixit adipós d'individus obesos (Hu E, 1996). A més aquesta proteïna mostra efectes beneficiosos en la resistència a la insulina i es creu que els seus efectes transcorren en part per un augment de l'oxidació d'àcids grassos en el múscul, mitjançant un mecanisme on intervé l'activació de la AMPK (Yamauchi T, 2002).

Una altre punt clau en el desenvolupament de disfuncions metabòliques relacionades amb l'obesitat i l'excés lipídic és la resposta d'altres teixits com el del múscul. El múscul en repòs és el responsable del 20% del metabolisme de la glucosa, però sota condicions d'estimulació per insulina és el responsable del 80% de la captació de glucosa i més d'un 80% d'aquesta glucosa s'acumula en forma de glicògen. En pacients diabètics, la glucosa captada en resposta a la insulina és un 30-40% menor que en individus no diabètics, i un 90% d'aquesta disminució es deu a la disminució de la captació dels teixits perifèrics com el múscul. Sota certes condicions patològiques pot produir-se una desregulació del senyal d'insulina en el múscul, sent un factor important en l'aparició de la resistència a la insulina. Els mecanismes que poden explicar aquesta desregulació inclouen el TNF $\alpha$ , els àcids grassos i l'estrès cel·lular. Aquests factors poden activar les Ser/Thr quinasas,

possiblement les mateixes que intervenen en el senyal de la insulina. Per exemple, el TNF $\alpha$  és capaç d'induir l'activació de la producció de ceramides, que poden activar la PKC $\zeta$  i amb això el IKK- $\beta$ . El TNF $\alpha$  pot activar també el JNK, que fosforila IRS-1 en la Ser307, desacoplant-lo del receptor de la insulina. Un augment d'àcids grassos degut a una ingesta de dieta grassa pot comportar en el múscul una activació de la PKC $\theta$ , que fosforilarà la Ser 307 de l'IRS-1 i la PKC $\alpha$ , que utilitzen membres de la família de la MAPK per fosforilar a IRS-1 en la Ser612. La fosforilació d'aquesta serina inhibeix la cascada de senyalització de la insulina suggerint un mecanisme de resistència a la insulina (Li J, 1999). A més de les PKCs, els àcids grassos poden activar també la quinasa IKK- $\beta$  mitjançant l'activació de PKC $\theta$  i PKC $\zeta$  atenuant el senyal d'insulina. Així doncs, com en el fetge, els nivells intramusculars d'acils-CoA de cadena llarga, DAG i ceramides en el múscul es correlacionen positivament amb els nivells de TAG i negativament amb la sensibilitat a la insulina (Holland WL, 2007; Hulver MW, 2003 i Shulman GI, 2000).

Finalment, en diferents situacions fisiològiques o patològiques, ja sigui per una fosforilació desregulada en els residus de serina o treonina del IRS-1 que interfereixen amb la fosforilació en les tirosines, o per una desregulació de la desfosforilació d'aquests residus de tirosina, la cascada de senyalització de la insulina es pot veure afectada, produint-se una transducció inadequada i conduint a un estat de resistència a la insulina.

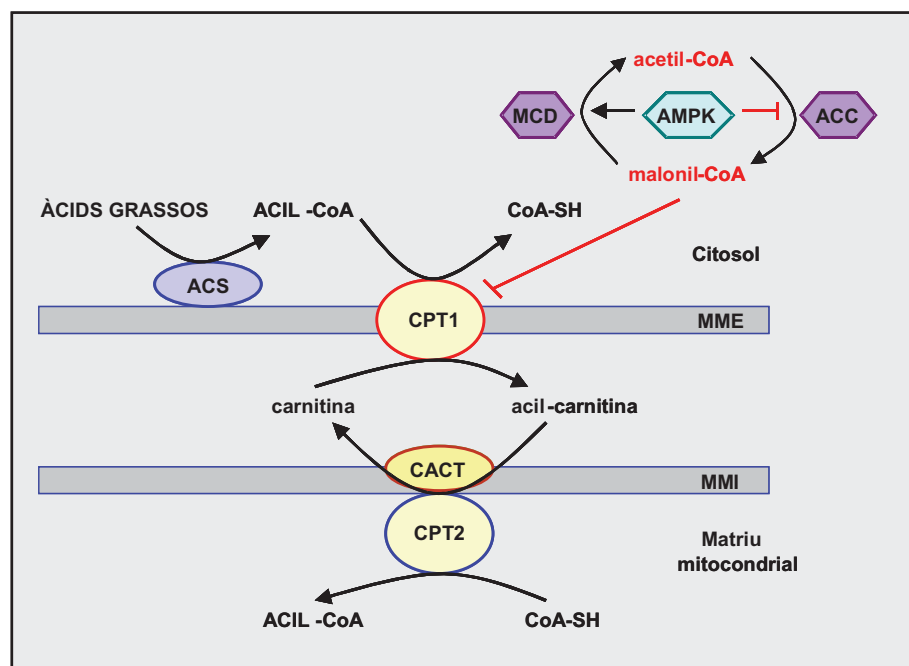
En resum, els canvis metabòlics que comporten l'obesitat en el teixit adipós alteren l'expressió de tot un conjunt de proteïnes amb funció endocrina. Aquesta expressió alterada provoca que aquestes proteïnes exerceixin accions perjudicials en els teixits perifèrics sensibles a la insulina, induint o contribuint a tot un conjunt de desordres metabòlics.

## **6. SISTEMA CARNITINA-PALMITOÏLTRANSFERASA 1: OXIDACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS**

El transport d'àcids grassos de cadena llarga dins del mitocondri es dur a terme pel sistema carnitina-palmitoïltransferasa (CPT). Aquest sistema està format per tres proteïnes (Kerner J, 2000), CPT1, carnitina-acilcarnitinatranslocasa (CACT) i CPT2. En un primer pas, els acils-CoA formats per l'acció de la LCAS en la membrana mitocondrial externa, són convertits en acilcarnitina. Aquest pas està regulat per la carnitina-palmitoïltransferasa I (CPT I), localitzada en la membrana

mitocondrial externa. El complex acil-carnitina és transportat a la matriu mitocondrial en una reacció d'intercanvi facilitada per la CACT, una proteïna integral de membrana mitocondrial interna. En la matriu mitocondrial, la acil-carnitina és reconvertida en acil-CoA per l'acció de la CPT2, localitzada en la cara interna de la membrana mitocondrial interna. La carnitina que s'allibera difon cap al citoplasma i pot tornar a ser utilitzada per la CPT1 (figura 7).

La CPT1 està fortament regulada pel seu inhibidor fisiològic, el malonil-CoA, i per tant és el pas més important i limitant en el control de l'oxidació d'àcids grassos de cadena llarga. Alteracions fisiològiques en les concentracions de malonil-CoA es correlacionen inversament amb els canvis en la oxidació- $\beta$ . Per exemple, durant situacions de dejú i d'exercici físic disminueixen els nivells de malonil-CoA en els teixits i augmenta la oxidació- $\beta$  (Chien D, 2000). Una situació contrària és durant l'alimentació amb carbohidrats on augmenta els nivells de malonil-CoA i disminueix la oxidació- $\beta$  (Saha AK, 1997).



**Figura 7. Transport d'àcids grassos dins del mitocondri mitjançant el sistema CPT.** Els àcids grassos de cadena llarga s'activen a acil-CoA per acció de la acil-CoA sintetasa (ACS). El transport de l'acil-CoA a l'interior del mitocondri es dur a terme per l'acció de la CPT1, que converteix l'acil-CoA en acil-carnitina, la carnitina:acilcarnitina translocasa (CACT), que transporta la acil-carnitina a través de la membrana mitocondrial interna, i la CPT2 que reconverteix la acil-carnitina en acil-CoA. Els nivells de malonil-CoA, inhibidor de la CPT1, estan regulats per les activitats de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) i la malonil-CoA descarboxilasa (MCD). Aquestes dues proteïnes estan alhora regulades per la AMPK. MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna.

Els mamífers expressen tres isoformes de CPT1, la isoforma hepàtica (LCPT1 o CPT1A) (Esser V, 1993 i Britton CH, 1995) i la isoforma de múscul cardíac i esquelètic (MCPT1 o CPT1B) (Yamazaki N, 1995 i 1996), les quals son el producte de dos gens diferents. Els gens humans per ambdues proteïnes estan localitzats en els cromosomes 11q13 (LCPT1) i 22q13.3 (MCPT1) (Britton CH, 1997). CPT1A està formada per 773 aminoàcids (88 kDa) i CPT1B per 772 (88 kDa). La identitat entre la seqüència d'aminoàcids és del 62%, però la seva regulació per malonil-CoA és diferent.

La sensibilitat de la CPT1A pel seu inhibidor depèn de les condicions fisiopatològiques ( $IC_{50} \approx 3-30 \mu M$ ). CPT1A té una gran afinitat pels substrats carnitina ( $K_m \approx 30 \mu M$ ) i acil-CoA de cadena llarga ( $K_m$  pel substrat palmitoil-CoA  $\approx 40 - 150 \mu M$ ). CPT1B mostra una afinitat més dèbil pel substrat carnitina ( $K_m \approx 500 \mu M$ ) però una afinitat pels acil-CoA de cadena llarga semblant a la isoforma hepàtica. La seva sensibilitat a la inhibició per malonil-CoA és de 30 a 100 cops més elevada ( $IC_{50} \approx 0,03 \mu M$ ) que la de CPT1A (McGarry JD, 1983; Mills SE, 1983; McGarry JD, 1997). Així, l'activitat CPT1B dependria únicament de les variacions en les concentracions de l'inhibidor.

Un altre membre de la família, és la CPT1C, que s'expressa principalment en cervell i testicles (Price NT, 2003). La seqüència aminoacídica de la proteïna manté tots els residus importants per l'activitat carnitina aciltransferasa i el domini d'unió a malonil-CoA. Segons un estudi realitzat per Lane i col·laboradors (Dai Y, 2007), es tractaria d'una proteïna integral de membrana present en la membrana mitocondrial externa i capaç d'unir el malonil-CoA amb una constant d'afinitat  $K_D = 0,3 \mu M$ , que es troba dins de les concentracions hipotalàmiques de l'inhibidor (0,1-1,4  $\mu M$ ), el que suggereix que l'activitat de CPT1C pot estar controlada per malonil-CoA (Wolfgang MJ, 2006). La interacció entre malonil-CoA i CPT1C podria ser important per la senyalització en les neurones hipotalàmiques que regulen la ingesta i la despesa energètica perifèrica (Cha SH, 2006).

Estudis recents realitzats en el nostre grup (Sierra AY, 2008), demostren que la sobreexpressió de CPT1C fusionada a la proteïna fluorescent en cèl·lules de cultiu (línia cel·lular embrionària de ronyó humà HEK293T i fibroblasts humans PC-12) indiquen clarament que CPT1C es localitza en el reticle endoplasmàtic en comptes del mitocondri i que la regió N-terminal de CPT1C és responsable de la localització de la proteïna en aquest orgànul. L'estudi demostra que CPT1C utilitza el palmitoil-CoA com a substrat i que mostra una molt baixa activitat carnitina-



palmitoiltransferasa. Degut a la seva localització específica en el cervell, CPT1C no participa en l'oxidació mitocondrial dels àcids grassos sinó que estaria probablement implicada en rutes biosintètiques, facilitant el transport constant del palmitat a través de les membranes del reticle endoplasmàtic, mantenint un equilibri entre les reserves en acil-CoA del citosol i el lumen del reticle endoplasmàtic.

La distribució i les característiques cinètiques de les diferents CPTs es resumeixen en la següent taula:

	<b>CPT1A</b>	<b>CPT1B</b>	<b>CPT2</b>	<b>CPT1c</b>
<b>Mida</b>	88 kDa	88 kDa	70 kDa	88 kDa
<b>IC50MaloniHCoA</b>	2,5 µM	0,03 µM	-	
<b>KmCarnitina</b>	30 µM	500 µM	120 µM	
<b>Locuscromosoma humà</b>	11q13	22q13.3	1p32	19q13.33
<b>Expressió</b>				
<b>Fetge</b>	++++	-	+	
<b>Múscul esquelètic</b>	(+)	++++	+	
<b>Cor</b>	+	+++	+	
<b>Ronyó</b>	++++	(+)	+	
<b>Pulmó</b>	++++	(+)	+	
<b>Melsa</b>	++++	-	+	
<b>Intestí</b>	++++	-	+	(+)
<b>Pàncreas</b>	++++	-	+	
<b>Teixit adipós marró</b>	(+)	++++	+	
<b>Teixit adipós blanc</b>	+	+++	+	
<b>Ovaris</b>	++++	(+)	+	(+)
<b>Testicles</b>	(+)	++++	+	(+)
<b>Fibroblasts humans</b>	++++	-	+	
<b>Cervell</b>				+
<b>Cerevel</b>	-	++++	+	-
<b>Deficiència humana descrita</b>	si	no	si	no

**Taula 1. Característiques cinètiques i distribució tissular de les diferents isoformes de la CPT1.**

## 6.1 Regulació a nivell transcripcional

Pel que fa a la regulació a nivell d'mRNA, s'ha descrit que canvis en la ratio glucagó/insulina provoquen canvis en els nivells de l'mRNA de la CPT1, que a més anirien associats amb nivells elevats d'àcids grassos i disponibilitat reduïda de glucosa (Park EA, 1995). Concentracions elevades d'àcids grassos indueixen un ràpid increment de l'expressió de CPT1A en el fetge (Chatelain F, 1996).

S'ha descrit que en els rosegadors durant l'època de l'alletament augmenten els nivells d'mRNA i l'activitat CPT1A en el fetge. També sota dietes riques en

greixos es manté elevada l'activitat CPT1A, i això no s'aprecia quan s'alimenten amb dietes riques en carbohidrats (Thumelin S, 1994). A més, també s'ha demostrat que els nivells d'mRNA i l'activitat CPT1A augmenten en el fetge de rates dejunades i en rates diabètiques dependents d'insulina (Park EA, 1995).

## 6.2 Regulació per malonil-CoA

El malonil-CoA és l'inhibidor fisiològic de la CPT1, i com a tal és el seu principal regulador. Els nivells cel·lulars de malonil-CoA son determinants en la regulació de CPT1, per tant, el control d'aquests nivells seran també de vital importància. La formació de malonil-CoA està catalitzada per l'acetil-CoA carboxilasa (ACC), de la que se n'ha descrit dues isoformes, ACC1 i ACC2. La primera s'expressa en el citosol de les cèl·lules i majoritàriament en teixits lipogènics com el fetge i el teixit adipós, mentre que l'ACC2 és mitocondrial i s'expressa principalment en el cor i el múscul esquelètic (Postic C, 2008). A més, l'ACC2 presenta una extensió en el seu extrem aminoterminal que li confereix la possibilitat d'anclar-se a la membrana mitocondrial externa, possiblement molt a prop de la CPT1 (Abu-Elheiga L, 2000). L'activitat d'ACC està subjecta a un control agut mitjançant ràpides modificacions covalents (inactivació i activació per fosforilació i desfosforilació respectivament), per una activació per citrat i per una inhibició per àcids grassos (Allred JB, 1997).

A més de l'ACC, una altra proteïna que juga un paper important en el control dels nivells de malonil-CoA, és la malonil-CoA descarboxilasa (MCD). Aquest enzim descarboxila el malonil-CoA per produir acetil-CoA, reduint els nivells cel·lulars de malonil-CoA. Quant les necessitats energètiques son elevades, l'ACC es troba inhibida i la MCD activada, de manera que l'efecte net és una baixada dels nivells de malonil-CoA i això comporta una activació de l'oxidació d'àcids grassos (Postic C, 2008).

A part de la regulació per malonil-CoA, s'han descrit altres mecanismes de regulació de la CPT1 independentment del malonil-CoA. En alguns estudis s'ha suggerit que la CPT1 podria estar regulada per fosforilació (Guzmán M, 1992 i Kemer J, 2004) o que la CPT1 interaccionaria amb altres proteïnes del citoesquelet en la membrana mitocondrial externa (Guzmán M, 1992 i Velasco G, 1998). Altres estudis aporten evidències d'una estimulació de CPT1 per l'AMPK, mitjançant fosforilació de components del citoesquelet (Velasco G, 1998). En aquests estudis

es proposa que la proteïna quinasa II dependent de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina i possiblement la AMPK juguen un paper central, no només activant la CPT1 sinó també fosforilant e inactivant l'ACC i per tant reforça l'activació de la CPT1 mitjançant la baixada dels nivells de malonil-CoA.

Actualment no està resolt quin són els mecanismes pels quals canviaria la sensibilitat de la CPT1A enfront el seu inhibidor fisiològic, el malonil-CoA, segons les condicions fisiològiques (Saggerson D, 2008).

En un estudi del nostre grup (Morillas M, 2003) es va identificar la metionina 593 com l'aminoàcid de la CPT1A crític per a la sensibilitat al malonil-CoA. Aquest aminoàcid està present en totes les carnitina aciltransferases inhibibles per malonil-CoA (CPT1A, CPT1B, i COT) de varis organismes i no està present en les carnitina aciltransferases no inhibibles per malonil-CoA (CPT2, CrAT i colina acetiltransferasa (ChAT)). La mutació d'aquest aminoàcid pel seu equivalent en la CPT2, una serina, va mostrar que la mutació per sí mateixa, M593S, provocava una pèrdua gairebé total de la sensibilitat a malonil-CoA quan aquesta forma mutant s'expressava en llevats. És interessant destacar que aquest mutant va presentar una eficiència catalítica major que la forma no mutada pel substrat palmitoil-CoA. Així doncs, probablement, la presència d'una metionina en aquesta posició s'hagi conservat evolutivament en les carnitina aciltransferases inhibibles per malonil-CoA indicant la seva importància en la sensibilitat a malonil-CoA.

La pèrdua de sensibilitat al malonil-CoA de la forma mutada CPT1AM ha estat estudiada en diferents tipus cel·lulars: en llevats (Morillas M, 2003), en cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques (Herrero L, 2005), en cèl·lules musculars de rata (Sebastian D, 2006 i Henique C, 2010) i en hepatòcits de rata (Akkaoui M, 2009). En tots aquests treballs es demostra una major capacitat oxidativa de la forma mutada CPT1AM comparat amb la isoforma salvatge de la CPT1A independentment dels nivells de malonil-CoA presents en els diferents teixits.

En el present treball, s'ha sobreexpressat tan la forma salvatge (CPT1A) com la forma mutada (CPT1AM) M593S de la CPT1A de rata en el fetge de ratolins per tal de comprovar la hipòtesis de que una major oxidació- $\beta$  reverteix l'obesitat i la resistència a la insulina induïda per una dieta rica en àcids grassos.

## 7. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES EN EL TRACTAMENT DE L'OBESITAT

Cada cop més s'estan realitzant grans esforços dirigits cap a la prevenció i reversió de l'obesitat. L'obesitat està associada a un alt nombre de malalties que disminueix la qualitat de vida dels pacients i causen un gran impacte econòmic i social.

Una de les primeres mesures i més àmpliament utilitzades per la reducció de pes a llarg termini és mitjançant la ingesta de dietes restringents i l'augment de l'activitat física. Però malauradament, només una petita porció dels malalts intervinguts amb una dieta restringent i un augment de l'activitat física aconsegueixen mantenir la pèrdua de pes a llarg termini (Wing RR, 2005).

Una altra opció són els tractaments farmacològics. Tan sols tres medicaments s'han aprovat per la *US Food and Drug Administration* específicament per la pèrdua de pes. Es basen en la reducció de la ingesta energètica actuant a nivell de cervell com la sibutramina (Meridia®/Reductil®) o en la reducció de l'eficiència de l'absorció intestinal com és el cas de l'orlistat (Xenical®, Alli®). Aquests tractaments igualment requereixen canvis en l'estil de vida dels pacients, com l'ús de dietes hipocalòriques i/o exercici, per oferir uns beneficis moderats, i l'aparició d'efectes adversos o la recuperació del pes perdut desencadenen en un abandonament de la teràpia. A més, la manca d'assajos clínics eficaços a llarg termini ha fet limitar el seu ús i posar en dubte la seva eficàcia. Actualment hi ha unes 24 substàncies i/o tractaments diferents que es troben en fase clínica 1 i molts més que es troben en fase d'estudi, però totes elles es basen en la reducció de la ingesta calòrica. Però la pèrdua de pes mitjançant la restricció de la ingesta calòrica ha de superar tres reptes importants. El primer d'ells és que els mamífers estan dissenyats per a fer front a llargs períodes d'escassetat d'aliments i de baix contingut lipídic i qualsevol medicament que vulgui inhibir la gana haurà d'actuar mitjançant varies rutes metabòliques. En segon lloc, l'experiència realitzada amb els antagonistes dels receptors dels endocannabinoids ha demostrat, que el centre del control de la sacietat sovint interacciona amb d'altres vies del cervell, causant efectes psicotròpics (Padwal RS, 2007). I en tercer lloc i probablement el més important, el propi organisme té mecanismes homeostàtics capaços d'augmentar l'eficiència calòrica, com la reducció de la BMR (*basal metabolic rate*), fent que la pèrdua de pes sigui encara més complicada (Redman LM, 2009 i Leibel RL, 1995).

Per últim, una altra opció pel tractament de l'obesitat és la cirurgia bariàtrica. Es considerada actualment la mesura més eficaç, especialment en aquells pacients amb obesitat mòrbida amb un elevat risc de patir problemes de salut associats com malaltia cardiovascular, diabetis i infart, entre altres. En aquests pacients, un 5% de reducció en el pes està associat amb una reducció del 60% dels risc de desenvolupar diabetis tipus 2. En intervencions fetes a pacients diabètics, prop del 85% experimenten millora de la seva diabetis, mentre que el 77% dels casos la cirurgia resol completament la condició, permetent al pacient deixar el seu tractament antidiabètic. Tot i així, la cirurgia no és una pràctica definitiva, ja que entre el 10-15% dels casos fracassen des de l'inici, mentre que el 50% dels pacients recuperen el pes als 10 anys després de la intervenció. A més, els casos d'èxit requereixen igualment modificacions en els hàbits dels pacients. Entre els factors que recomanen la no utilització de la cirurgia es troba l'elevat risc de complicacions postquirúrgiques.

En resum, les diferents estratègies per combatre l'obesitat actualment es basen en: 1) La disminució de la sensació de gana mitjançant fàrmacs que actuïn al SNC inhibint la gana, o bé mitjançant productes substitutius o augmentant la sensació de sacietat. 2) reducció de l'aportació energètica amb productes substitutius amb menys calories, reduint l'absorció de grasses, o facilitant la seva eliminació fisiològica i 3) increment del consum energètic mitjançant exercici físic.

En els últims anys però, hi ha hagut avenços molt interessants sobre les teràpies gèniques, obrint tot un ventall de possibilitats alhora de trobar nous tractaments per l'obesitat.

## **7.1 Models d'estudi d'obesitat**

El desenvolupament de diferents models d'estudi d'animals obesos és de gran importància per la recerca de nous tractaments per combatre l'obesitat. En els últims temps, diferents tipus d'animals com ratolins, rates, hámsters, gossos, porcs i monos s'han utilitzat en l'estudi de la fisiologia i dels factors genètics relacionats amb l'obesitat humana (Speakman J, 2008). Diferents aproximacions com mutacions espontànies, la delecció o sobreexpressió de diferents gens o l'ús de varis tipus de dietes s'han utilitzat per aprofundir en l'estudi de l'obesitat. Els rosegadors en general i més concretament els ratolins es consideren un model ideal degut a les semblances genètiques amb els humans i a les tècniques de

manipulació genètica cada cop més automatitzades. A més, són petits, fàcilment manipulables i el seu cost de manutenció no és molt car. Una de les mutacions espontànies més antigues descrites en ratolins és en el gen *agouti* (Bultman SJ, 1992), mentre que les més conegudes i utilitzades són les mutacions relacionades amb la leptina i amb el seu receptor com són els ratolins *ob/ob* i els *db/db* respectivament (Zhang Y, 1994 i Bahary N, 1990). Les mutacions en els ratolins *ob* i *db* causen una obesitat severa associada a resistència a la insulina i van acompanyades d'una hiperfàgia i una reducció en la despesa energètica. Altres ratolins obesos que s'han utilitzat són els *tubby* (Naggert JK, 1995) i els *carboxypeptidase E* (Kleyn PW, 1996). Els ratolins *tubby* desenvolupen una obesitat tardana i resistència a la insulina, però es desconeixen els mecanismes perquè pateixen la malaltia. Els ratolins *carboxypeptidase E* pateixen també una obesitat tardana i hiperinsulinèmia ja que tenen reduïts els lligands dels receptors de la melanocortina en l'hipotàlem. En rates, un model clàssic de mutació espontània en el receptor de la insulina causant d'hiperfàgia severa són les rates obeses Zucker (*fa/fa*) (Zucker LM, 1965).

Una de les hipòtesis de l'expansió epidèmica de l'obesitat en humans és l'augment en els últims 30 anys d'aliments d'alta densitat i rics en greixos. Existeixen molts treballs realitzats amb rosegadors, els quals caracteritzen la resposta enfront la ingesta de dietes riques en sucres i en greixos. Dels primers treballs en aquesta àrea es basaven en alimentar a rates amb les dietes tipus "cafeteria" (Stock MJ, 1982) les quals promouen un augment de pes. Aquestes dietes però, presenten varis problemes per la composició nutricional dels aliments escollits (Speakman J, 2008). En altres estudis realitzats en rosegadors, com en ratolins C57BL/6, la ingesta de dietes riques en greixos i en sucres van promoure un augment de pes significatiu (Surwit RS, 1988) que van acabar donant el nom de les dietes conegudes com a DIO (*diet-induced obesity*) utilitzades en rosegadors. Aquests tipus de dietes (DIO) són una de les aproximacions més emprades en diferents models d'animals obesos per l'estudi de possibles tractaments per l'obesitat.

## 7.2 Teràpia gènica

La teràpia gènica consisteix en la transferència de DNA o RNA a l'interior de la cèl·lula amb les següents finalitats terapèutiques: incrementar l'expressió d'un gen endògen, la restauració de l'expressió d'un gen funcional quan el gen endògen no és funcional i la inhibició d'un gen endògen amb efectes patològics (Thrasher A,

2005). Els dos principals sistemes de transferència de material genòmic a l'interior de la cèl·lula es poden agrupar en mètodes físicoquímics i mitjançant vectors virals. Els mètodes físico-químics van ser els primers en desenvolupar-se, com ara la micrinjecció, la electroporació, bombardeig de microprojectils, polications i liposomes. Aquests sistemes presenten avantatges com ara que són mètodes senzills, no tenen limitacions en la mida del DNA a transferir, són poc tòxics i no són immunogènics. En canvi, els inconvenients que presenten són la seva baixa eficiència de transducció de les cèl·lules diana i que alguns d'ells només es poden utilitzar *in vitro* (Gardlík R, 2005).

Actualment els virus constitueixen la forma més eficient de transferir gens a l'interior de la cèl·lula diana. Els vectors vírics més utilitzats són els adenovirus, els herpes virus, els retrovirus (oncoretrovirus i lentivirus) i els virus adenoassociats. Al contrari dels mètodes físicoquímics, alguns dels vectors vírics posseeixen una elevada eficiència de transducció. Els virus vectors són virus deficients els quals se'ls ha eliminat una part o tot el seu genoma per tal d'evitar que completin el seu cicle de vida en la cèl·lula hoste. Els virus vectors porten inserit el gen a transferir flanquejat pels mínims elements de DNA/RNA necessaris per replicar l'àcid nucleic i empaquetar-lo en la càpside proteica.

Existeixen però algunes limitacions importants alhora de treballar amb els virus. Un punt clau a considerar en la teràpia gènica *in vivo* és la reacció immunològica de l'organisme receptor i una altra la mida del DNA que s'ha d'empaquetar a l'interior del virus.

Els diferents tipus d'intervenció de la teràpia gènica són per un costat la transferència de DNA codificant, els quals podrien reemplaçar la injecció de proteïnes extracel·lulars com la insulina. Un altre tipus d'intervenció és la transferència de seqüències inhibidores de l'expressió com el DNA de doble cadena amb unitat transcripcional d'un RNA (antisens, ribozima i shRNA precursor del siRNA), un DNA de cadena senzilla que funciona com un oligonucleòtid antisens i un RNA de doble cadena (petit RNA de interferència, siRNA). A més a més, també s'utilitza la transferència d'àcids nucleics DNA/RNA de cadena simple o doble (aptàmers) que són capaços d'interaccionar amb les proteïnes alterant la seva funcionalitat.

El primer fàrmac gènic aprovat va ser el Gendicine (rAdp53), que és un adenovirus capaç d'expressar el supressor del tumor p53. Va ser aprovat a la Xina

l'any 2003. El primer oligonucleotid antisens que va arribar al mercat va ser el Vitravene (ISIS), el qual inhibeix la replicació del CMV, causant de la retinitis. Vitravene s'administra localment en l'ull mitjançant injecció intravitrea. El primer oligonucleotid aptàmer del mercat va ser el Macugen (pegabtanib) dissenyat per tractar la màcula degenerativa, una malaltia ocular. Es tracta d'un oligonucleotid capaç d'unir-se i inhibir el VEGF (*vascular endothelium growth factor*) que té efectes angiogènics i proinflamatoris que contribueixen a la patologia. S'administra per injecció intravítrea. Fou desenvolupat per Eyetech Pharmaceuticals, Inc. i Pfizer el comercialitza des de desembre del 2004. Actualment es troben en fase d'estudi tractaments contra la deficiència de la lipoproteïna lipasa en humans basats amb virus adenoassociats (Burnett JR, 2009).

### 7.2.1 Teràpia gènica en l'obesitat

En els últims anys han aparegut varis estudis abordant el tractament de l'obesitat mitjançant diferents tècniques de teràpia gènica. La majoria de tractaments es basen en decantar el desequilibri energètic mitjançant l'increment de l'oxidació d'àcids grassos per reduir els dipòsits lipídics associats a l'obesitat i els problemes conseqüents que això comporta. Alguns d'aquests estudis s'han centrat en la reducció del malonil-CoA, que és un derivat del metabolisme de la glucosa i és el precursor de la lipogènesi i alhora actua com inhibidor al·lostèric de la CPT1, que és l'enzim clau i els pas limitat per dur a terme la oxidació- $\beta$  en l'interior del mitocondri. Per exemple, Shulman i col·laboradors en varis treballs mostren com un augment de la FAO millora la resistència a la insulina mitjançant la reducció en els nivells lipídics intramiocel·lulars i del fetge (Savage DB, 2005). Aquest treball es basa en la reducció de les dues isoformes d'ACC mitjançant inhibidors oligonucleotids antisens, per tal de reduir els nivells de malonil-CoA en el fetge i d'aquesta manera augmentar la FAO de manera indirecta. Gràcies a l'inhibició de l'ACC1 i l'ACC2 disminueixen els nivells de TAG, els acils-CoA de cadena llarga i els DAG reduïnt la translocació de la PKC $\epsilon$ .

Un altre enzim que s'ha utilitzat com a teràpia gènica diferent a la nostra és la sobreexpressió de la malonil-CoA decarboxilasa, la qual és l'encarregada de realitzar la reacció del malonil-CoA cap a acetil-CoA, reduint els nivells de malonil-CoA presents en el fetge (An J, 2004). En aquest treball es sobreexpressa la MCD en el fetge de rates alimentades amb dieta grassa mitjançant l'administració d'adenovirus injectats a través de la vena de la cua. Els animals tractats presenten una millora de la captació de glucosa i de la resistència a la insulina en el fetge i en



el múscul. Cal dir, que aquests treballs, tan el de Savage DB *et al.* com el de An J *et al.* tenen una curta durada i dificulta la interpretació de quin és realment el paper d'aquest augment de la FAO en els resultats presentats.

En canvi, d'altres estudis encaminats cap augmentar la FAO indirectament en el múscul esquelètic s'han associat a la resistència a la insulina en el múscul (Finck BN, 2005 i Koves TR, 2008) degut, segons els autors, a una saturació del mitocondri i a una FAO incompleta (Muoio DM, 2007). En el treball de Finck BN *et al.* segueixen una estratègia diferent ja que realitzen un *knock out* de PPAR $\alpha$  i en el treball de Koves TR i col·laboradors realitzen un *knock out* de la MCD per tal d'augmentar la FAO. A més, en un estudi recent de Hoehn *et al.* (Hoehn KL, 2010) mostra com un augment de la FAO en el múscul mitjançant l'inhibició de l'ACC2 i una posterior activació de l'AMPK. Tot i que són múltiples els treballs que avalen l'activació de l'AMPK, tan en el múscul com en el fetge, com una teràpia eficaç pel tractament de la DT2 per la seva capacitat d'inhibir la síntesi d'àcids grassos, augmentar la captació de glucosa i reduir la producció de glucosa hepàtica (Zhang BB, 2009).

En aquest punt, s'ha de fer constar, que estudis en els quals sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM i que van en la mateixa direcció que la nostra són treballs realitzats en el múscul com a teixit diana. On un augment de l'oxidació en el múscul disminueix l'acumulació lipídica i millora la sensibilitat a la insulina per part del múscul (Sebastián D, 2007, Bruce CR, 2009 i Henique C, 2010). Aquests treballs es basen en la sobreexpressió de la CPT1 ja sigui mitjançant electroporació (Bruce CR, 2009) o la utilització d'adenovirus (Sebastián D, 2007 i Henique C, 2010). En un treball del nostre grup (Sebastián D, 2007), on es sobreexpressa la CPT1A i la CPT1AM en cèl·lules musculars de rata L6E9 no s'observava una reducció en els dipòsits de TAG, però sí una reducció significativa en el contingut de DAG i ceramides. Aquesta reducció dels diferents intermediaris lipídics tòxics té un efecte directe en la millora de la senyalització de la insulina en el múscul. En un estudi de Perdomo G. *et al.* (Perdomo G, 2004) en el qual sobreexpressen la CPT1A mitjançant adenovirus en cèl·lules musculars de rata no observen una reducció en els nivells de TAG, ni de DAG, ni en els de ceramides, en canvi sí observen una millora de la senyalització de la insulina independentment del contingut lipídic. Suggestint que la millora de sensibilitat a la insulina en el múscul que sobreexpressa la CPT1 és independent del contingut lipídic. També en aquesta mateixa direcció però en el fetge, en un treball de Odoherly *et al.* (Stefanovic-Racic M, 2008) el qual augmenten directament la FAO hepàtica en rates mitjançant la sobreexpressió de la

CPT1A administrant adenovirus, detallen una reducció hepàtica de TAG, però degut a la curta durada de l'estudi no presenten resultats sobre la sensibilitat a la insulina.

Una altra estratègia realitzada per combatre l'obesitat és augmentar la dissipació energètica en el fetge mitjançant la sobreexpressió de la UCP-1 (Ishigaki Y, 2005). Per fer-ho, en aquest treball es van injectar adenovirus per la vena de la cua de ratolins alimentats amb dieta grassa. En aquest treball s'obté una pèrdua de pes significativa dels animals. En l'actualitat tornen a ser d'especial rellevància alguns treballs que es centren en la termogènesi cèl·lular i en el metabolisme del mitocondri en el teixit adipós marró com a possibles teràpies contra l'obesitat (Tseng YH, 2010).

També existeixen varies aproximacions per combatre l'obesitat a nivell hipotalàmic mitjançant la utilització de diferents teràpies gèniques (Stefater MA, 2010).

En el nostre treball s'ha utilitzat com a teràpia gènica virus adenoassociats per tal de sobreexpressar la CPT1A en el fetge de ratolins obesos per tal de revertir el fenotip obès i resistent a la insulina.

### **7.2.2. Virus adenoassociats**

Els virus adenoassociats (AAV) es classifiquen en la família dels *Parvoviridae* i dins del gènere *Dependovirus*. Aquesta classificació es basa en el fet que els AAV depenen per la infecció d'un altre virus o *helper* virus (adenovirus, herpesvirus, citomegalovirus humà o el papilomavirus) per poder infectar i replicar-se (Daya S, 2008). En l'absència d'un virus que faciliti la seva infecció, com el AAV2 pot està en latència integrat en el nucli en el cromosoma 19q13.4, és l'únic virus de mamífer de DNA que es coneix que és capaç d'integrar-se en un lloc específic (Schultz BR, 2008). Actualment s'han descrit uns 14 serotips i múltiples variants trobades en ratolí, primats i teixit humà (Lochrie MA, 2006).

Tots els diferents tipus de serotips dels AAV tenen una mida d'uns 25nm de diàmetre i contenen un genoma format per una cadena simple de DNA d'uns 4.700 nucleotids aproximadament (Muzyczka N, 1992). El genoma està integrat per dues zones ORFs (*open reading frames*), flanquejades pels ITRs (*inverted terminal*

*repeats*). Els ITRs són l'únic element actiu que requereix el genoma per la seva replicació i empaquetament. Una de les regions d'ORF codifica per quatre proteïnes responsables del lloc específic d'integració, unió, activitat helicasa i la regulació dels promotors dins del genoma dels AAVs (Samulski RJ, 1983). La segona regió ORF codifica per les proteïnes víriques estructurals VP1, VP2 i VP3, de les quals 60 subunitats diferents s'empaqueten amb una relació 1:1:10 per formar una estructura icosaedra. Diferències entre les seqüències de les proteïnes de la càpsida dels virus són el que donen el gran ventall de serotips d'AAV. El resultat d'aquestes diferències és la utilització dels diferents receptors per entrar a la cèl·lula, conjuntament amb varis processos alternatius intracel·lulars que donaran a cada serotip el seva preferència i especificitat alhora d'infectar diferents teixits (Daya S, 2008 i Bartlett JS, 2000).

### **7.2.2.1. Infecció dels AAVs**

La infecció vírica és un procés amb múltiples passos que requereix atrevessar tot un seguit de barreres (unió al receptor, entrar a la cèl·lula, trànsit intracel·lular, procés endosomal i entrar al nucli) abans d'introduir el genoma del virus dins del nucli (McCarty DM, 2004).

L'entrada a la cèl·lula per la majoria dels serotips és mitjançant receptors que faciliten l'endocitosi. Alguns estudis han demostrat que la inhibició de les dinamines (GTPases encarregades de la formació de les membranes i l'endocitosi) reduirien fins a 3 cops la transducció vírica (Bartlett JS, 2000). Tot i que l'endocitosi és el mecanisme majoritari per entrar a la cèl·lula existeixen altres mecanismes més minoritaris com el del AAV5 quan infecta cèl·lules HeLa mitjançant l'ús de rutes de l'endocitosi diferents (Bantel-Schaal, U 2002). L'endocitosi dels AAVs està associada a nombroses molècules de diferents rutes de senyalització. Per exemple, s'ha demostrat que en molts casos les integrines poden actuar com a correceptores dels AAVs (Sanlioglu S, 2000).

També s'ha comprovat que l'administració de diferents inhibidors de proteosomes, incloent aldheids triptidils i antraciclins, augmentarien la transducció vírica *in vitro* i *in vivo* mitjançant una millor translocació al nucli (Duan D, 2000). Aquesta troballa s'ha relacionat directament amb l'acció de la ubiquitina (Yan Z, 2004).

### 7.2.2.2 Serotips dels AAVs

Actualment s'han aïllat unes 110 seqüències diferents de càpsides de AAVs (Gao G, 2005). Cada una d'aquestes càpsides que tenen un perfil serològic únic o particular s'han classificat en diferents tipus de serotips d'AAV. En l'actualitat hi ha descrits uns 14 serotips diferents. Entre les càpsides del AAV1 i el AAV6 només difereixen 6 aminoàcids. Del serotip que es disposa major informació i és el més caracteritzat és el serotip AAV2 (Oelze I, 1994) i de les úniques càpsides que s'ha obtingut la seva estructura cristal·lina són el AAV2, el AAV4 i el AAV8 (Xie Q, 2002, Govindasamy L, 2006 i Nam HJ, 2007).

Nombrosos estudis han avaluat i comparat els diferents serotips i el seu poder de transducció i eficiència alhora d'infectar teixits *in vivo* (taula 2). De moment no hi ha un consens sobre quin seria el millor serotip per a cada teixit. Estudis recents destaquen l'alta eficiència dels serotips AAV1, AAV6 i AAV7 pel múscul estriat (Gao GP, 2002; Chao H, 2000; Gregorevic P, 2004). D'altres estudis també destaquen l'alta eficiència pel múscul estriat per part dels serotips AAV8 i AAV9 (Wang C, 2005 i Vandendriessche T, 2007). Els serotips AAV8 i AAV9 també s'han provat amb una alta eficiència amb la transducció d'hepatòcits (Gao G, 2002; Nakai H, 2005 i Inagaki K, 2006). En el sistema respiratori, els serotips AAV6 i AAV9 mostren una major eficiència per l'epiteli, mentre que el serotip AAV5 es limita exclusivament a les cèl·lules alveolars dels pulmons (Halbert CL, 2001 i Bostick B, 2007). Respecte la transducció vírica al sistema nerviós central, els serotips 1, 4, 5, 7 i 8 infecten eficientment varis tipus de neurones a diferents zones del cervell (Davidson BL, 2000 i Allocca M, 2007). També s'han realitzat estudis amb els serotips AAV1 i AAV5 en cèl·lules glials (Davidson BL, 2000 i Wang C, 2003). En els ulls els serotips AAV1, 4, 5, 7, 8 i 9 transdueixen eficientment l'epiteli pigmentat del reticle, mentre que els serotips 5, 7 i 8 transdueixen els fotoreceptors (Weber M, 2003 i Lebherz C, 2008). A més a més els serotips AAV1, AAV8 i AAV9 s'han utilitzat en estudis realitzats en el pàncreas (Nakai H, 2005). El ronyó és un dels òrgans més difícils per transduir eficientment, només s'ha utilitzat el serotip AAV2 amb uns nivells baixos d'infecció (Takeda S, 2004) i el serotip AAV9 pel glumèruls (Bostick B, 2007). Finalment s'han realitzat estudis en el teixit adipós utilitzant el serotip AAV1 (Mizukami H, 2006).

Teixit	Serotip òptim	Referència
Fetge	AAV8, AAV9	Gao G, 2002 i Gao G, 2004
Múscul esquelètic	AAV1, AAV7, AAV6, AAV8, AAV9	Xiao W, 1999; Blankinship MJ, 2004 i Chao H, 2000
SNC	AAV5, AAV1, AAV4	Wang C, 2003
Ulls	AAV4, AAV5, AAV8	Weber M, 2003
Pulmons	AAV9	Gao G, 2004
Cor	AAV8	Wang C, 2005
Pàncreas	AAV8	Loiler SA, 2003 i Wang C, 2004
Ronyó	AAV2	Takeda S, 2004

**Taula 2. Eficiència de transducció dels diferents serotips de AAVs en els principals teixits.**  
Assajos realitzats amb els diferents serotips d'AAVs en varis teixits de models d'animals

### 7.2.2.3 Ús d'AAVs com a teràpia gènica

Els AAV mostren gran habilitat per entrar a la cèl·lula, penetren al nucli satisfactòriament, s'expressen durant llargs períodes de temps i generalment no mostren toxicitat. Una de les característiques més importants és la manca de patogènesi i la poca resposta immunològica que provoquen (Vandenberghe LH, 2009).

Una limitació de la teràpia gènica amb els AAVs és l'existència d'anticossos neutralitzadors dels AAV en la població humana. A dosis molt baixes d'anticossos neutralitzadors poden tenir un gran impacte i veure molt reduït l'eficiència i l'eficàcia de la transducció vírica *in vivo*. La infecció depèn del mitjà per on s'administren els virus, les barreres anatòmiques i altres factors que facilitin el contacte dels anticossos amb les càpsides dels virus. Un estudi de Calcedo i col·laboradors (Calcedo R, 2009) fet en sèrum humà provinent de pacients d'Amèrica del Nord, Àfrica, Austràlia i Europa va trobar que en un 29-59% de la població presentava anticossos neutralitzadors pel AAV2 depenen de la seva regió geogràfica.

Existeix una segona generació de AAV basats en 5 modificacions en la càpside del serotip AAV2 i anomenats AAV2.5 que redueix l'afinitat pels anticossos neutralitzadors en el sèrum humà (Thomas CE, 2004). Les múltiples variants naturals i l'enginyeria de càpsides ofereix un gran ventall de possibilitats per

l'aplicació clínica dels AAV, però també afegeix gran complexitat alhora de triar el serotip més apropiat en cada cas (Vandenberghe LH, 2009).



**OBJECTIUS**

---

---





## OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral és avaluar quin efecte té un augment de l'oxidació d'àcids grassos a llarg termini en el fetge de rosegadors obesos. Per dur a terme aquest augment de l'oxidació- $\beta$  es van utilitzar virus adenoassociats capaços de sobreexpressar únicament en fetge la carnitina-palmitoiltransferasa 1A i una forma mutada de la carnitina-palmitoiltransferasa 1A (M593S) insensible al seu inhibidor fisiològic, el malonil-CoA.

Els objectius d'aquesta tesi s'han desglossat en els següents apartats:

- 1.** Obtenció d'una eina capaç de sobreexpressar la CPT1A i la CPT1AM a llarg termini en el fetge de diferents models d'animals.
- 2.** Estudiar l'efecte de la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM en fetge sobre l'obesitat i la resistència a la insulina induïdes per dieta grassa.
- 3.** Estudiar l'efecte de la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM en fetge sobre la inflamació i l'estrès oxidatiu associats a l'obesitat.
- 4.** Estudiar l'efecte de la sobreexpressió de CPT1AM en fetge de ratolins obesos modificats genèticament (*db/db*).



# **MATERIAL I MÈTODES**

---



## MATERIAL I MÈTODES

### 1. ANIMALS

#### 1.1 Ratolins C57BL/6J

S'han utilitzat ratolins de la soca C57BL/6J de sis setmanes d'edat i adquirits a (*Janvier Laboratories*, França). Els animals es van tenir dues setmanes a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia habituant-se al nou lloc abans de començar els experiments. Els animals es mantenen a 22°C en cicles de 12 hores de fosc i llum amb accés lliure d'aigua i menjar. Els animals abans de ser sacrificats es posen en dejú durant tota la nit i es sacrifiquen per dislocació cervical prèvia anestèsia amb isofluorà. Aquesta s'administrava per via inhalatòria amb una dosi d'inducció al 4% i a una dosi manteniment del 1.5-3%. Tots els protocols han estat aprovats pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (CEEA) que es troben sota la normativa de *The Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

#### 1.2 Ratolins C57BL/KsJR-db/+ i C57BL/KsJR-db/db

S'han utilitzat ratolins de la soca C57BL/KsJR-db de sis setmanes d'edat i adquirits a (*Janvier Laboratories*, França). Aquests ratolins tenen una mutació monogènica recessiva en el gen del receptor de la leptina en el cromosoma 4. Es tracta d'una mutació puntual que crea un codó d'*stop* provocant un domini intracel·lular reduït del receptor. La soca actual és un creuament entre les soques C57BL/Ks J-db i C57BL/6 J-m. A partir dels 10-14 dies d'edat mostren nivells elevats d'insulina i entre les setmanes 4-8 d'edat comencen a mostrar nivells elevats de glucosa en sang. Es van mantenir en les mateixes condicions d'estabulació abans descrites en l'apartat 1.1.

#### 1.3 Rates Wistar

S'han utilitzat rates Wistar mascles de 7 setmanes d'edat aproximadament i adquirides a (*Harlan Laboratories*). Els animals es van tenir dues setmanes a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia habituant-se al nou lloc abans de començar els experiments. Els animals es mantenen a 22°C en cicles de 12 hores de fosc i llum amb accés lliure d'aigua i menjar. Els animals abans de ser sacrificats es posen en dejú durant tota la nit i es sacrifiquen per dislocació cervical prèvia anestèsia amb isofluorà. Aquesta s'administrava per via inhalatòria amb una dosi d'inducció al

4% i a una dosi manteniment del 1.5-3%. Tots els protocols han estat aprovats pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (CEEA) que es troben sota la normativa de *The Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

## **1.4 Dietes emprades**

### **1.4.1 Ratolins C57BL/6J**

Quan els ratolins tenien 8 setmanes d'edat es van dividir en dos grups: un grup alimentat amb dieta control NCD (*Normal Chow Diet*) (*International Products Supplies Limited*, TestDiet D8Y2, 10% kcal de greix, 18,3% proteïna i 71,4%) carbohidrats i l'altre grup alimentat amb dieta grassa HFD (*High Fat Diet*) (TestDiet D8Y1, 60% kcal de greix, 18,3% proteïna i 20,1% carbohidrats). Aquesta dieta s'anomena DIO (*Diet Induced Obesity*) i està àmpliament reportat el seu ús tant per engreixar els animals com per tornar-los resistents a la insulina (Brunengraber DZ, 2003).

### **1.4.2 Ratolins C57BL/KsJR-db/+ i C57BL/KsJR-db/db**

Aquests ratolins van ser alimentats amb la dieta control de Harlan (Global Diet 2014; 12% aigua, 14,5% proteïna, 4% greix, 4,5% fibra i 4,7% cendra) produït i empaquetat pe Mucedola s.r.l. que és la dieta utilitzada normalment a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia.

### **1.4.3 Rates Wistar**

Per realitzar un tipus d'experiment (experiment 1 descrit més endavant) aquestes rates van ser alimentades amb la dieta control de Harlan (Global Diet 2014; 12% aigua, 14,5% proteïna, 4% greix, 4,5% fibra i 4,7% cendra) produït i empaquetat pe Mucedola s.r.l. que és la dieta utilitzada normalment a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia.

Per realitzar un tipus d'experiment (experiment 2 descrit més endavant) quan les rates tenien 7 setmanes d'edat aproximadament es van dividir en dos grups: un grup alimentat amb dieta control NCD (*Normal Chow Diet*) (*International Products Supplies Limited*, TestDiet D8Y2, 10% kcal de greix, 18,3% proteïna i 71,4%) carbohidrats i l'altre grup alimentat amb dieta grassa HFD (*High Fat Diet*) (TestDiet 58V8, 45,7% kcal de greix, 18,3% proteïna i 35,5% carbohidrats). Aquesta dieta s'anomena DIO (*Diet Induced Obesity*) i està àmpliament reportat el

seu ús tant per engreixar els animals com per tornar-los resistents a la insulina (Brunengraber DZ, 2003).

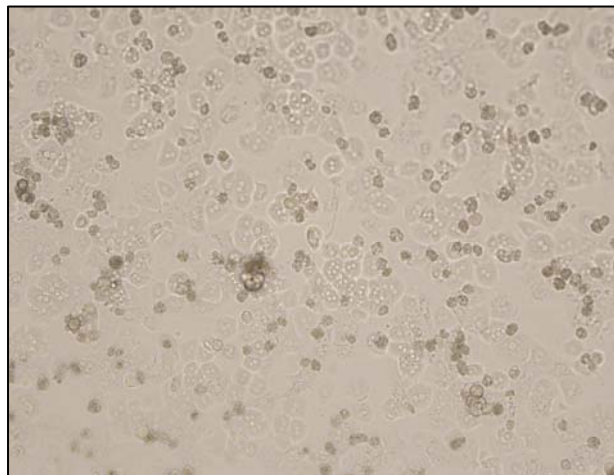
## 2. CULTIUS PRIMARIS

### 2.1 Hepatòcits de ratolí

Els hepatòcits representen entre un 70-80% del total de la massa citoplasmàtica del fetge. Les principals funcions que desenvolupen o en les que intervenen són: filtratge i emmagatzament de la sang, metabolisme dels hidrats de carboni, proteïnes, lípids, hormones i compostos químics estranys, la formació de bilis i l'emmagatzament de vitamines, ferro i la formació de factors de coagulació.

Els hepatòcits són cèl·lules polièdriques amb 1 ó 2 nuclis esfèrics. Presenten un citoplasma acidòfil molt ric amb orgànuls com ribosomes, reticle endoplasmàtic, aparell de Golggi i mitocondris. A més el citoplasma conté múltiples inclusions de glucògen i greix.

Apart dels hepatòcits trobem altres tipus de cèl·lules com serien; les cèl·lules de Kupffer, un tipus de macròfag que fagocita bacteris i altres cossos estranys provinents de la sang de les llacunes hepàtiques i les cèl·lules endotelials típiques.



**Figura 1. Hepatòcits de ratolí en medi de cultiu.** Fotografia d'hepatòcits 24 hores després de ser obtinguts en el nostre laboratori.

L'aïllament dels hepatòcits es fa mitjançant una digestió amb col·lagenasa. En un primer pas es renta el fetge amb una solució isotònica, en la qual s'hi addiciona un agent quelant (EGTA) per tal d'atrapar el calci i trencar les unions



entre les cèl·lules. En el següent pas el fetge es renta amb una solució amb col·lagenasa per tal de separar els hepatòcits del parènquima del fetge.

Mitjançant aquesta tècnica s'aconsegueix una suspensió d'hepatòcits, la qual pot ser sembrada en plaques de 10mm o en ampolles de 25cm<sup>2</sup> per utilitzar immediatament o per criopreservar per congelació (Guillouzo A, 1999). Els hepatòcits en cultiu no proliferen i són extramadament sensibles als cicles de congelació i descongelació tot hi afegir agents crioprotectors, per això s'aconsella la seva utilització en fresc (Hamel F, 2006).

## 2.2 Obtenció d'hepatòcits de ratolí

L'obtenció de cultius primaris d'hepatòcits mitjançant el mètode de perfusió de col·lagenasa per la vena porta es va descriure prèviament per (Moldéus P, 1978).

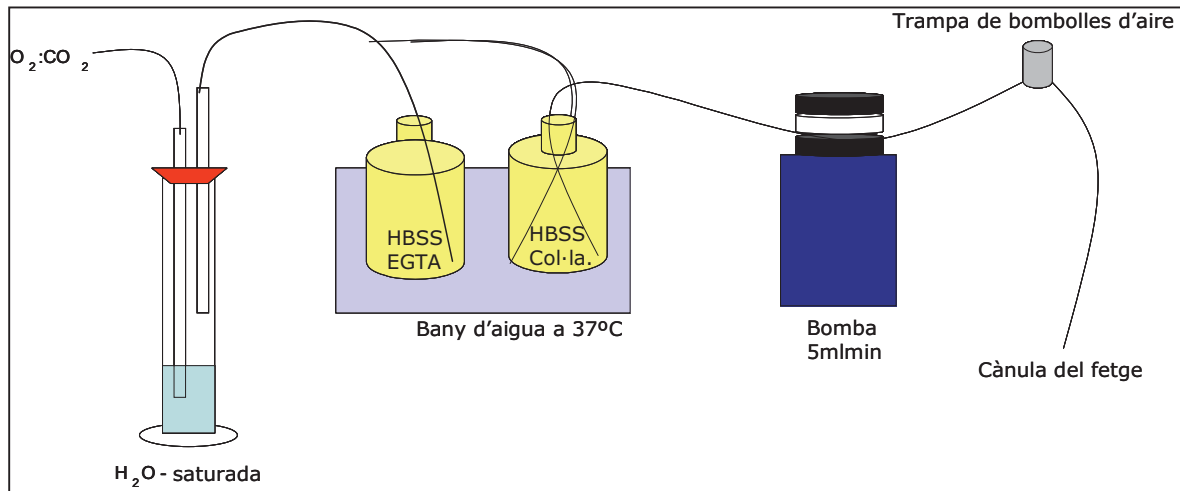
Es segueix el muntatge tal i com s'indica en la figura 2. En un bany a 37°C es dipositen la solució de rentat HBSS+EGTA i la solució de digestió HBSS+col·lagenasa (solució que serveix per disgregar els hepatòcits, però la col·lagenasa s'afegeix en l'últim moment). Ambdues solucions s'especifiquen més endavant. Es comprova la velocitat de la bomba de perfusió (5ml/min.)(GILSON, Model MP Drive Unit, F155001). Es vigila en tot moment que no quedi cap bombolla en tot el circuit del muntatge. S'ha de controlar que tan els tubs (F1825133), com els connectors (F1179951) del muntatge estiguin perfectament nets per tal d'evitar qualsevol tipus de contaminació. Tot seguit es gasifiquen (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) les solucions durant 20 min. abans de començar el procediment.

**HBSS** (*Hank's balanced salt solution*) (138mM NaCl, 50 mM Hepes, 5,56 mM glucosa, 5,4mM KCl, 0,338mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O més 0,44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4 i es filtra amb un filtre de 0,220,22µm).

**HBSS+Col·lagenasa** (preparar extemporàniament) 0.25% Col·lagenasa IV (Sigma, C5138, activitat específica 2.9), 5mM CaCl<sub>2</sub> en HBSS. Ajustar el pH 7,4.

**HBSS+EGTA** (preparar extemporàniament) 0.5mM EGTA (filtrat) amb HBSS; pH 7,4.

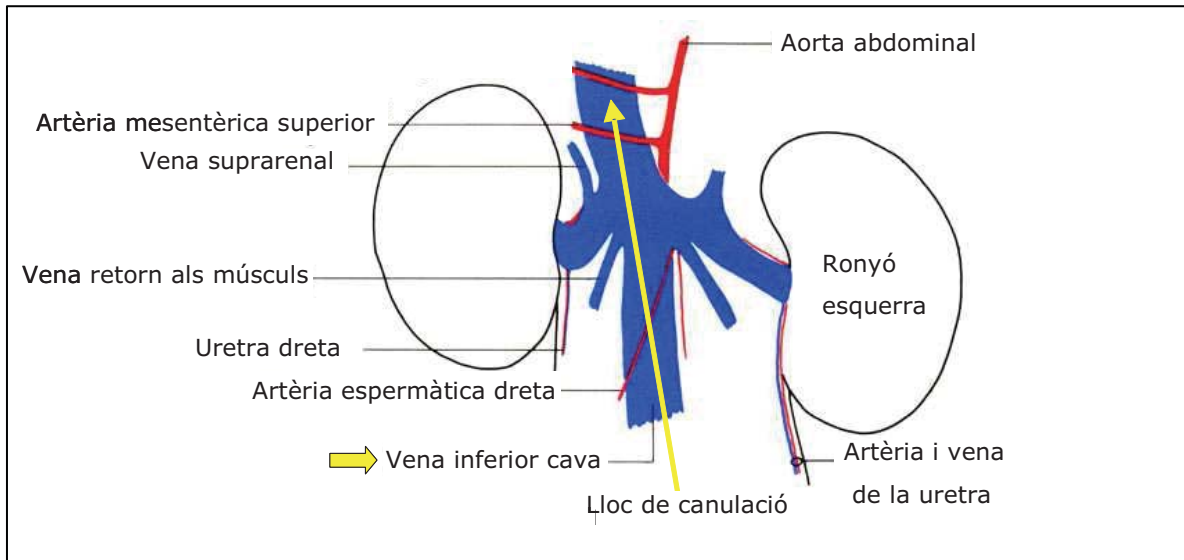
Les solucions han d'estar filtrades i estèrils per tal d'evitar contaminacions.



**Figura 2. Esquema del sistema de perfusió d'hepatòcits de ratolí.** En la figura es mostren les solucions necessàries i la correcta connexió del sistema de perfusió. La gasificació de les solucions és necessària per a la supervivència de les cèl·lules un cop sacrificat l'animal.

S'anestesia el ratolí mitjançant una injecció intraperitoneal 10µl/10g de pes ketamina (100mg/kg) (Imalgene 1000 Merial) i xilacina (10mg/kg) (Rompun 2% Bayer). Es deixen transcorre uns 20min. per tal de que l'anestesia actuï correctament. Abans de començar es presionen les potes posteriors del ratolí amb les ungles per tal de comprovar la correcta administració i eficiència de l'anestesia. S'immobilitza el ratolí per les potes i es renta la pell amb etanol al 70% per tal de desinfectar la superfície i evitar posteriors contaminacions. S'obre l'abdomen i es mou tot el contingut del ventre cap a la dreta, deixant perfectament visible el fetge, la vena porta i la vena cava inferior. S'insereix la cànula (23Gx3/4" TW=0,6x19mm) a la vena cava inferior i es posa en funcionament el flux de la bomba de perfusió (figura 3). Quan s'observa que el fetge comença a estar pàl·lid, significa que la perfusió s'ha realitzat correctament i és el moment de tallar la vena porta per tal de rentar el fetge durant 5min.

A continuació, s'afegeix la col·lagenasa (a la solució de digestió utilitzant un filtre de 0,22µm (Millex GP PES SLGP033RS)). S'atura el flux de la bomba i es canvia ràpidament el tub de la solució de rentat (HBSS+EGTA) a la solució de digestió (HBSS+col·lagenasa). S'espera aproximadament durant 12 min. fins que el fetge adquireix una certa viscositat. En aquest moment s'atura la bomba i per tant el flux i s'extrau el fetge amb la màxima rapidesa possible. En aquest punt és molt important no seccionar l'estómac o els intestins per tal d'evitar futures contaminacions. A partir d'aquest moment es treballa en condicions estèrils sota campana de flux laminar.

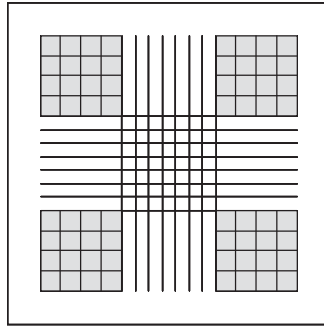


**Figura 3. Esquema de canul·lació de la vena de ratolí.** La fletxa groga indica la direcció i el lloc de perfusió.

Es diposita el fetge en una placa de petri amb solució HBSS+EGTA escalfada previament a 37°C i amb l'ajut de dos fòrceps es va disgregant el fetge per tal d'obtenir els hepatòcits separats. Es filtra la solució amb un filtre de 250µm en un tub de 50ml i a continuació es dur a terme un seguit de rentats dels hepatòcits. S'addicionen 35ml de solució de rentat HBSS+EGTA i es centrifuga a 600 x g durant 2min. a temperatura ambient. Es descarta el sobrenedant i es torna a rentar els hepatòcits afegint uns altres 35ml de la solució de rentat. Es centrifuga a 600 x g durant 2min. a temperatura ambient i finalment es resuspenen els hepatòcits amb 10ml de medi d'aïllament: (DMEM (Gibco 11966), 10mM glucosa, 10% FBS (LABCLINICS SA ref.BC-0005934), 100nM insulina (FW 36.46 g/mol), 100nM dexametasona i estreptavidina-penicilina (100U/ml)).

Abans de sembrar els hepatòcits en plaques s'ha de determinar la seva viabilitat. Quan s'està aïllant els hepatòcits d'un fetge interessa obtenir el màxim nombre d'hepatòcits viables ja que al llarg del procés hi ha diferents punts claus (pH i temperatura de les solucions emprades) que faran que alguns hepatòcits es morin. És aconsellable treballar amb hepatòcits amb una viabilitat superior al 80-85% per tal de poder realitzar experiments de forma repetitiva i reproduïble. Per comprovar la viabilitat dels hepatòcits s'utilitza una solució *Trypan Blue* (SIGMA T8154) que tinta de color blau els hepatòcits morts. Els hepatòcits que romanen vius es queden de color blanc.

Es prepara la següent suspensió per determinar la viabilitat: 100µl suspensió d'hepatòcits + 800µl HBSS+EGTA + 100µl *Trypan Blue*. De la suspensió obtinguda s'agafen 10µl i es dipositen pel lateral de la càmera de *Neubauer* (figura 4) on es compten els hepatòcits blancs (vius) i blaus (morts) que hi ha en cada un dels quatre quadrants de 16 quadrats.



**Figura 4. Càmera de Neubauer.** La zona marcada en color gris és la zona on es compten els hepatòcits.

Viabilitat % =  $\text{Número d'hepatòcits vius} \times 100 / \text{Número total d'hepatòcits}$

Alhora de distribuir els hepatòcits en plaques de cultiu només es tindrà en compte els hepatòcits vius (Taula 1).

Comptatge total d'hepatòcits =  $\text{Mitja d'hepatòcits vius} \times 10.000 \times 10 = \text{hepatòcits totals/ml}$

Finalment es dur a terme el sembrat dels hepatòcits en els diferents tipus de plaques o en ampolles de 25cm<sup>2</sup> pretractades amb gelatina (SIGMA G9391, 0,1% (p/v)). El dia abans d'obtenir els hepatòcits es preparen les plaques i/o ampolles on es sembraran els hepatòcits amb la gelatina que s'escalfa fins a uns 50°C per la seva correcta dissolució.

Plaques	Volum	Hepatòcits
100mm	10ml	5,8x10 <sup>6</sup>
60mm	3ml	1,7x10 <sup>6</sup>
6 pouets	2ml	1,1x10 <sup>6</sup>
Ampolles de 25cm <sup>2</sup>	10ml	3,5x10 <sup>6</sup>

**Taula 1. Distribució del nombre d'hepatòcits per tipus de placa.**

### 3. VIRUS ADENOASSOCIATS

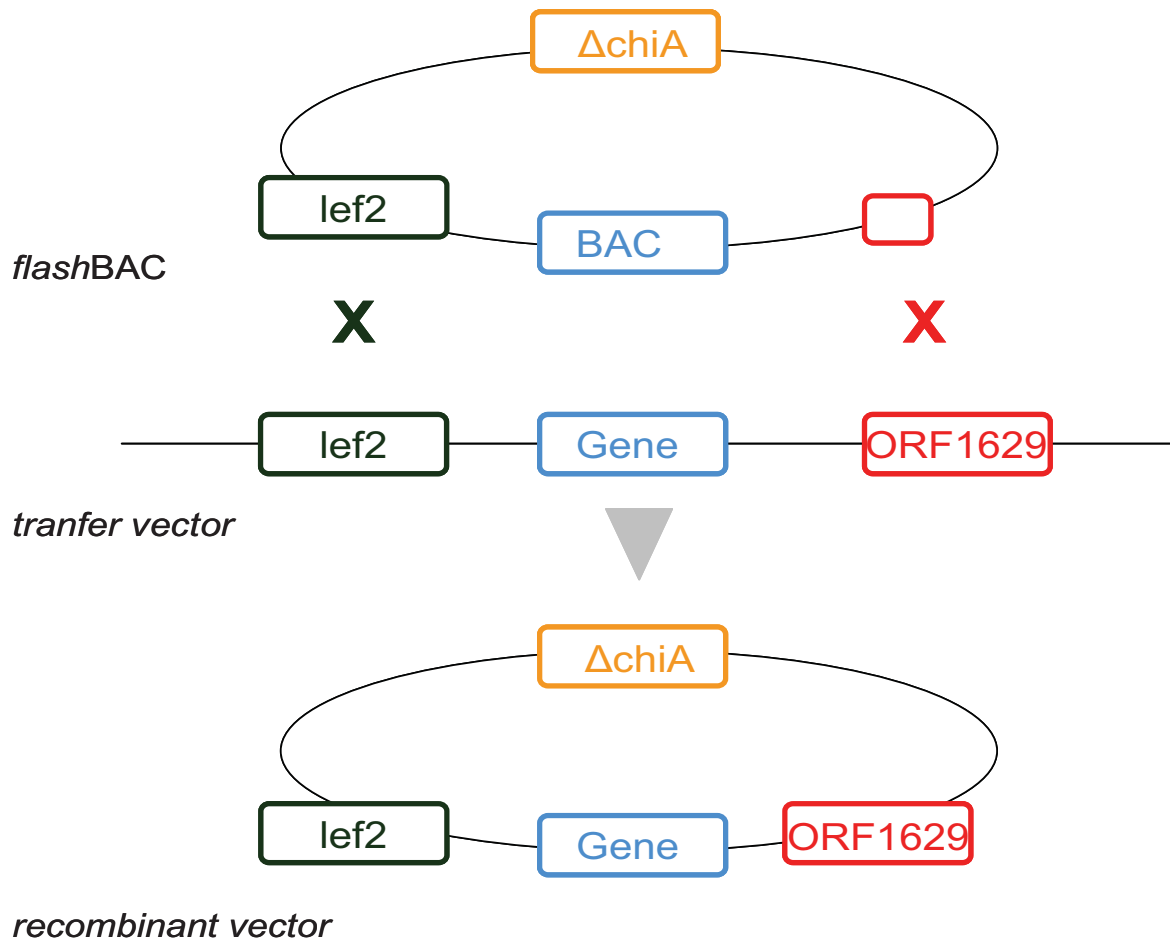
La síntesi i la producció dels virus adenoassociats es va realitzar a les instal·lacions de l'empresa AMT (*Amsterdam Molecular Therapeutics*) fruit d'una col·laboració entre l'empresa i el nostre grup. L'AMT és una empresa de biotecnologia dedicada a la producció de virus adenoassociats per teràpia gènica.

El mètode utilitzat per a la fabricació dels virus adenoassociats per dur a terme aquest estudi és el mètode descrit per Urabe i col. (Urabe M, 2002) que es basa en la formació de tres baculovirus i la posterior producció dels virus adenoassociats en cèl·lules d'insecte Sf9. Un dels baculovirus conté les proteïnes *rep* per la replicació, un altre baculovirus dur integrades les proteïnes de la càpside (*vp o cap*) i per últim un tercer baculovirus que conté el gen d'interès.

Per obtenir el baculovirus que conté el gen d'interès primer s'ha d'obtenir el vector plasmídic corresponent. En el nostre cas el vector plasmídic utilitzat per fer les construccions víriques està integrat per un promotor específic de fetge (EalbAATp) (Kramer MG, 2003), la seqüència de cDNA dels gens que es volen sobreexpressar (GFP o CPT1A o CPT1AM), una regió reguladora posttranscripcional per facilitar o millorar la transcripció [(WPRES; *woodchuck posttranscriptional regularoty element*) GenBank acc AY468 486]] i un senyal de poliadenosina de l'hormona de creixement bovina [bGH poly(A)] (bases 2326-2533 GenBank acc M57764). La construcció va encaixada entre dues zones invertides (ITRs ; *inverted terminal repeats*) que provenen del virus adenoassociats del serotip 2.

Els plasmidis corresponents als baculovirus de les proteïnes *rep* i *vp* serotip 1 foren subministrats per l'empresa AMT.

Per obtenir cadascun dels tres baculovirus Brep, Bvp1 i B(GFP o CPT1A o CPT1AM) es va utilitzar el sistema de flashBAC (figura 5) de la casa comercial nextgensciences ([www.nextgensciences.com](http://www.nextgensciences.com)) seguint les instruccions de la casa comercial. De cadascun d'ells es va utilitzar per l'obtenció dels virus adenoassociats el baculovirus que presenta el títol més elevat i sempre superior a  $1 \times 10^{12}$  (còpies genòmiques/ml).

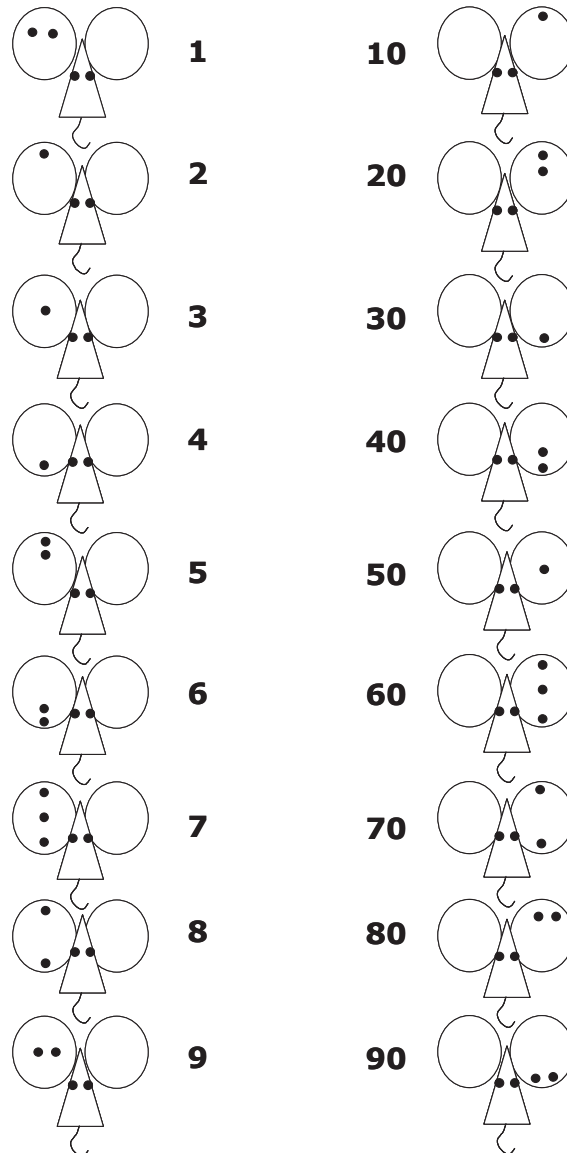


**Figura 5. Sistema flashBAC.** El sistema flashBAC no conté una part essencial del gen ORF1629 que intervé en la replicació del virus. Tanmateix, el sistema flashBAC conté un cromosoma bacterià artificial. La recombinació homòloga entre el DNA del sistema flashBAC i el vector plasmídic que conté el nostre gen d'interès ens dóna lloc un vector recombinant que incorpora el gen ORF1629 i desestima la seqüència BAC.

## 4. PROCEDIMENTS AMB ELS ANIMALS

### 4.1 Identificació dels animals

Per tal de poder identificar correctament cada un dels animals que formaven part dels experiments abans de començar a treballar amb els ratolins es procedia a la seva identificació mitjançant un seguit de forats a les orelles fets amb un trepant especial prèviament esterilitzat .



**Figura 6. Identificació dels ratolins.** En el següent esquema es mostren les orelles de cada ratolí amb els sistema emprat d'identificació. En l'orella dreta es marquen les desenes i en l'orella esquerra es marquen les unitats.

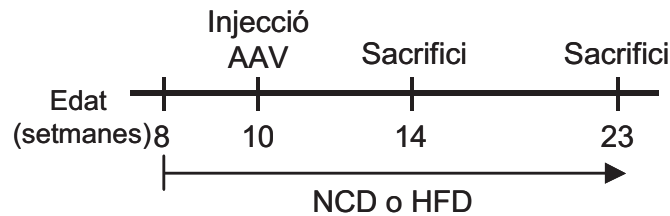
## 4.2 Administració de virus

L'administració dels virus adenoassociats abans descrits es fa per injecció mitjançant la vena de la cua dels ratolins i de les rates. Està descrit que un 90% dels virus injectats d'aquesta manera queden retinguts en el fetge (Nakai H, 2001). La dosi injectada va ser de  $7.5 \times 10^{12}$  gc/kg de pes corporal.

S'anestesien els animals amb isoflurà (veure apartat 1.1) per tal de minimitzar qualsevol tipus d'estrès degut a la seva manipulació. Tot seguit son introduïts en uns poltres on queden encaixats i d'aquesta manera se'ls restringeix tot tipus de moviment. Després s'escalfa la cua dels ratolins mitjançant una bombeta que emet llum vermella (raigs infrarojos) de la marca OSRAM (SICCATHERM 250w E27/ES) durant 1min. aproximadament. Aquest procediment és necessari per tal de visualitzar millor la vena per on seran injectats els virus corresponents. Un cop localitzada la vena s'introdueix molt suaument la dosi pertinent.

## 4.3 Disseny dels experiments

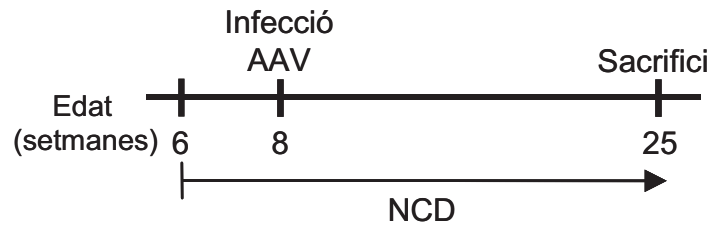
### 4.3.1 Ratolins C57BL/6J:



**Figura 7. Diagrama de l'experiment amb els ratolins C57BL/6J.** S'especifica l'edat del començament de la ingesta de les dietes corresponents, l'edat d'administració dels virus adenoassociats AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM i l'edat de sacrifici dels animals. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.



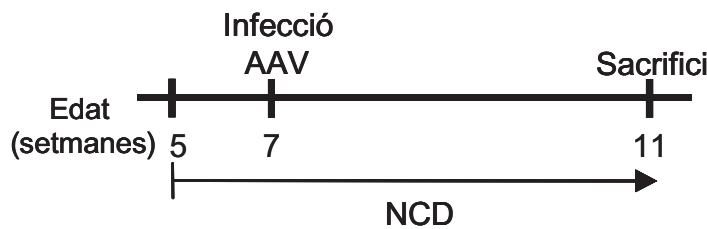
#### 4.3.2 Ratolins C57BL/KSJR-db/db i C57BL/KSJR-db/+:



**Figura 8. Diagrama de l'experiment amb els ratolins C57BL/KSJR-db.** S'especifica l'edat del començament de la ingesta de les dietes corresponents, l'edat d'administració dels virus adenoassociats AAV-GFP i AAV-CPT1AM i l'edat de sacrifici dels animals. NCD: *Normal Chow Diet*.

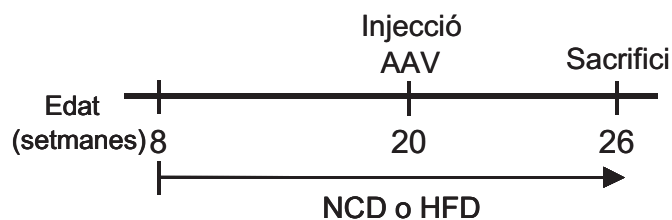
#### 4.3.3 Rates Wistar:

Experiment 1:



**Figura 9. Diagrama de l'experiment amb les rates wistar.** S'especifica l'edat del començament de la ingesta de la dieta corresponent, l'edat d'administració dels virus adenoassociats AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM i l'edat de sacrifici dels animals. NCD: *Normal Chow Diet*.

Experiment 2:



**Figura 10. Diagrama de l'experiment amb les rates wistar.** S'especifica l'edat del començament de la ingesta de les dietes corresponents, l'edat d'administració dels virus adenoassociats AAV-GFP i AAV-CPT1AM i l'edat de sacrifici dels animals. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

## **4.4 Extracció sanguínia per a la determinació de metabòlits**

Els ratolins s'immobilitzen en una mà i amb unes tisores es fa un petit tall a la cua del ratolí. Tot seguit es presiona lleugerament la cua per tal d'extraure les gotes de sang necessàries.

### **4.4.1 Determinació de glucosa**

Per dur a terme la mesura de glucosa es necessita una gota de sang i es determina mitjançant un glucòmetre conjuntament amb les seves tires reactives. (Glucometer Eliter de Bayer).

### **4.4.2 Obtenció de sèrum**

Material necessari: tisores, capil·lars (Fisher Scientific. 200 tubs, Cat. 22-362-574), Tubs separadors de sèrum (Becton Dickinson. 50 tubs. Cat. 365956).

L'extracció de sèrum és important per determinar tot un seguit de paràmetres sèrics com (insulina, leptina, TAG, àcids grassos lliures, cossos cetònics, etc...). Mitjançant l'ajut d'un capil·lar s'extreuen entre 5 i 10 gotes de sang que es posen en tubs separadors de sèrum amb anticoagulant. Al cap de 30 min. aproximadament es centrifuguen 5 min. a 10.000 x g i s'obté el sèrum que es congela a -20°C per la seva conservació.

## **4.5 Test de tolerància a la glucosa**

Material necessari: tisores, glucòmetres (2 mínim), tires reactives, capil·lars, tubs separadors de sèrum, xeringues d'1ml (Becton Dickinson, U-100 insulina, Cat. 329424.), glucosa al 20% (Baxter International. Cat. 2B0124P), tetina per expulsar la sang dels capil·lars (Fisher Scientific. Cat. NC9149076), cronòmetre, ratllador i calculadora.

Els animals són dejunats la nit abans, es pesen per saber la quantitat de glucosa a injectar. Es determina la glucosa a temps zero. Es preparen totes les xeringues dels ratolins (40 ratolins aprox.) sota campana de flux laminar en condicions d'esterilitat. S'administra intraperitonealment la glucosa (2g/kg de pes) a tots els ratolins amb un interval de 20s. entre cada ratolí.

Per realitzar correctament el test, la glucosa ha d'entrar a la sang de la mateixa manera en tots els ratolins. Amb els ratolins no obesos l'agulla es clava amb una inclinació d'uns 45°. En els ratolins obesos, per tal de creuar tot el teixit adipós s'injecta amb un angle de 90°. Després de la injecció es determina la glucosa al cap de 15, 30, 60, 90 i 120 min. amb el glucòmetre i per extracció sanguínia de la cua. Les gotes de sang s'agafen utilitzant el mètode descrit en l'apartat 4.2

#### **4.6 Test de tolerància al piruvat**

Material necessari: Estisores, glucòmetres (2 mínim), tires reactives, capil·lars, tubs separadors de sèrum, xeringues d'1 ml (Becton Dickinson, U-100 insulina, Cat. 329424.), piruvat sòdic (SIGMA P5280) preparat en PBS, tetina per expulsar la sang dels capil·lars (Fisher Scientific. Cat. NC9149076), cronòmetre, ratllador i calculadora.

Els animals són dejunats la nit abans, es pesen per saber la quantitat de piruvat sòdic a injectar. Es determina la glucosa a temps zero. Es preparen totes les xeringues dels ratolins (40 ratolins aprox.) sota campana de flux laminar en condicions d'esterilitat. S'administra intraperitonealment el piruvat (2g/kg de pes) a tots els ratolins amb un interval de 20s. entre cada ratolí. La injecció es realitza de la mateixa manera que s'ha descrit anteriorment pel test de tolerància a la glucosa (apartat 4.5).

La solució de piruvat sòdic es prepara en una solució tampó com el PBS per tal d'evitar que una solució àcida ens provoqui un desequilibri acidobàsic en els animals. La solució es filtra amb un filtre de mida de 0,22µm abans de ser injectada.

Per preparar un litre d'una solució de PBS es dissolen 8g de NaCl, 1,44g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2g de KCl i 0, g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1l d'aigua destil·lada. S'ajusta el pH a 7,4, s'autoclava i es desa a 4°C.

#### **4.7 Inducció de la cascada de senyalització de l'insulina (Akt/pAkt)**

Per tal d'avaluar la cascada de senyalització de la insulina es determina l'activitat de la proteïna Akt que es basa en la immunodetecció de la proteïna fosforilada en la serina 473 (Schmitz-Peiffer C, 1999). L'Akt és activada per la

insulina en la serina 473 i s'utilitza un anticòs específic contra aquesta proteïna fosforilada per determinar el seu nivell d'activació i per tant l'activitat d'Akt, ja que la proteïna és activa quan està fosforilada. El procediment es detalla a continuació.

Els animals són dejunats la nit abans. S'anestesien amb ketamina (100mg/kg) + xilacina (10mg/kg). S'injecta per la vena cava inferior 2.5U d'insulina (Humulin, Lilly) i es sacrifiquen al cap de 5 min. Tot seguit es passa a extraure el teixit adipós epididimal, el fetge, el múscul i la melsa i ràpidament es conserven en nitrogen líquid per ser conservats a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Per tal de fer l'extracte total per després poder processar i detectar l'Akt total i la pAkt mitjançant la tècnica de *Western Blot* es procedeix de la següent manera:

Es polvoritzen els teixits congelats i es politronen (Politró) durant 30s. a màxima velocitat. El tampó de lisi utilitzat és el tampó RIPA (30mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM fenilmetilsulfonil fluoride, 3 $\mu\text{M}$  aprotinina, 10 $\mu\text{M}$  leupeptina, 5 $\mu\text{M}$  pepstatina A, 25mM benzamidina, 25mM vanadat de sodi, 5mM glicerol fosfat, 100mM NaF, 1.0mM molybdat d'amoni, 30mM pyrofosfat de tetrasodi, 5mM EGTA, 10% glicerol, 1% Tritó X-100 i 0.5% deoxycolat de sodi i s'ajusta el pH a 7.4). La solució de RIPA es pot congelar amb alíquotes a  $-20^{\circ}\text{C}$  i s'afegeixen extemporàniament els inhibidors de proteasas i els inhibidors de fosfatasas. Els extractes es barregen durant 1h. en un agitador vertical a  $4^{\circ}\text{C}$  i es centrifuguen 20 min. a 16.500 x g. S'agafa el sobrenedant i es quantifica la proteïna amb el mètode de Bradford (Bradford MM, 1976).

## 5. ANÀLISI DE L'RNA

### 5.1 Obtenció i quantificació de l'RNA total

Per fer l'obtenció de l'RNA de fetge i múscul de ratolí s'ha utilitzat el *RNeasy Mini* kit de QIAGEN (#74107) i per l'obtenció de l'RNA del teixit adipós es va utilitzar el *RNeasy Lipid Tissue Mini* kit de QIAGEN (#74804). Els kits es basen en una extracció de fenol-cloroform i isotiocianat de guanidina (Qiazol), on les molècules de RNA queden atrapades en una membrana de silici que es troba en les columnes proporcionades pel propi kit. L'RNA s'obté després d'una elució de les columnes. En els dos casos es van seguir les instruccions especificades per la casa comercial.

Es mantenen els teixits en nitrogen líquid i es pesen en criotubs 50mg de fetge, 50mg de múscul i 200mg de teixit adipós aproximadament. A continuació s'homogenitzen en 1ml de Qiazol (QIAGEN, Cat#15596-018). Es transfereix l'homogenat en un tub de 2ml i s'incuben 5 min. a temperatura ambient. En aquest punt es poden congelar les mostres a  $-80^{\circ}\text{C}$ . S'afegeixen 200 $\mu\text{l}$  de cloroform i es barreja vigorosament. S'incuben 2-3min. a temperatura ambient i es centrifuga a 12.000 x g durant 15min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Es transfereix la fase aquosa (superior) a un altre tub eppendorf en el qual s'afegeixen 600 $\mu\text{l}$  d'etanol al 70% en aigua DEPC i es barreja. A continuació es transfereix el contingut en les columnes proporcionades pel RNeasy kit i tot el procediment es realitza partir d'aquest moment a temperatura ambient. Es centrifuguen a 8.000 x g durant 30s. i es descarta l'eluent, es repeteix el pas amb la mostra que quedi per processar, en aquest punt l'RNA de la mostra queda atrapat a la membrana de silici de la columna. S'afegeixen 700 $\mu\text{l}$  de la solució RW1 proporcionada pel kit i es centrifuga 8.000 x g durant 30s. En aquest punt es fan un seguit de rentats per tal d'obtenir l'RNA el màxim purificat. Es descarta i es col·loca un nou tub col·lector. S'afegeixen 500 $\mu\text{l}$  de solució RPE proporcionada pel kit i es torna a centrifugar a 8.000 x g durant 30s. Es descarta i es col·loca un nou tub col·lector i es posa la columna amb un nou tub i es centrifuga a 8.000 x g durant 30s. Es transfereix la columna en un nou tub eppendorf i s'afegeix l'aigua lliure de RNAasas al mig del filtre (membrana) de la columna segons la mostra: fetge (150 $\mu\text{l}$ ), múscul (50 $\mu\text{l}$ ) i teixit adipós (30 $\mu\text{l}$ ) per tal d'eluir l'RNA de cada mostra. Es centrifuga a 8.000 x g durant 30s. i en l'eluit ja es pot quantificar l'RNA obtingut.

L'RNA es quantifica espectrofotomètricament mitjançant l'aparell anomenat Nanodrop de la casa comercial Thermo Scientific. Aquest medeix l'absorbància a 260 i 280nm en un volum de mostra de 2 $\mu\text{l}$ . La lectura a 260nm permet calcular la concentració d'àcid nucleic de la mostra i la relació entre les lectures de 260 i 280nm ( $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ ) dona una estimació de la puresa de l'àcid nucleic. Les preparacions pures de l'RNA tenen valors que oscil·len entre 1,8 i 2,0.

## **5.2 Síntesi del cDNA**

Mitjançant la transcripció inversa o RT-PCR podem obtenir cDNA de doble cadena a partir d'mRNA. El procés es realitza en dues etapes, en una primera etapa es dur a terme la transcripció inversa i en una segona etapa l'amplificació del cDNA.

Per fer la síntesi del cDNA es va utilitzar el kit de Roche (Transcriptor First Strand cDNA Síntesis kit) (Cat#04379012001) seguint les instruccions facilitades per la casa comercial. Es va partir d'1µg d'RNA per cada mostra i en la síntesi s'utilitzen Random primers (500ng/ml). Les mostres s'incuben durant 10min. a 65°C per evitar la formació d'estructures secundàries innespecífiques i en acabar les mostres es mantenen en fred.

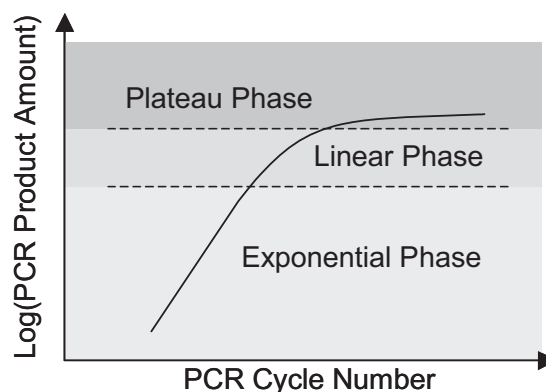
A més de les mostres es prepara un control negatiu el qual conté tots els components menys el Transcriptor RT que en el seu lloc s'addiciona aigua. Un cop s'ha acabat d'afegir tots els reactius del kit (First-Strand Buffer, DTT 100mM, Rnasa OUT més M-MLV RT) s'incuben les mostres 60min. a 50°C per la reacció de la transcripció reversa i 5min. a 85°C on s'atura la reacció. Per últim les mostres es mantenen en fred.

Finalment a cada mostra afegirem una quantitat d'aigua per tal de que ens quedi una concentració final de 2,5ng/µl que s'utilitzarà per la posterior determinació i quantificació de l'expressió gènica per PCR a temps real.

### 5.3 PCR a temps real

La PCR quantitativa o en temps real es realitza en un equip que integra una PCR convencional i un fluorímetre que determina la fluorescència que es produeix en el tub d'amplificació en tot moment al llarg de la reacció (Bustin SA, 2000).

La reacció d'amplificació de la PCR a temps real consta de tres fases:



**Figura 11. Esquema de les diferents fases de la reacció d'amplificació de la PCR a temps real.** Es mostra una fase exponencial o geomètrica, una fase lineal i una fase plateau on s'arriba a una saturació dels reactius i una amplificació mínima.

El fluoròfor estar present constantment en el mitjà de la reacció i el senyal obtingut al final de cada cicle d'amplificació es representa en una gràfica enfront del nombre de cicles i s'obté una corba que mostra el transcurs del procés. L'equip utilitza un làser per a emetre la llum que excita al fluoròfor i la tecnologia de les càmeres de díodes computeritzades (CCD) per a determinar la fluorescència emesa a diferents longituds d'ona en funció del fluoròfor que s'utilitza. La càmera CCD és multicanal, el que li permet realitzar diverses anàlisis simultànies en el mateix tub de PCR.

La quantificació s'assoleix mitjançant la utilització d'una corba patró en la qual es representen les intensitats de fluorescència aconseguides enfront de concentracions inicials conegudes d'un fragment idèntic al que volem quantificar.

En la detecció s'utilitza el SYBR GREEN com agent intercalant o la tecnologia de les sondes marcades fluorescentment, denominades sondes TaqMan (Applied Biosystem) o UPL (Roche) basades en l'apantallament d'energia entre un fluoròfor i una molècula apantallant.

El marcador fluorescent SYBR GREEN és una cianina asimètrica que quan s'uniex al solc menor de la doble cadena del DNA, el complex que forma és capaç d'absorbir llum blava i emetre llum verda. Per tant a major fluorescència emesa es correlaciona directament amb major quantitat de DNA amplificat.

Les mesures es van obtenir amb l'aparell de Roche LightCycler 480 Real-Time PCR System a 530nm. Les amplificacions de la PCR es van fer amb la barreja del LightCycler 480 SYBR Green I Master kit de Roche (Cat. No. 04 887 352 001). La majoria de gens es van analitzar mitjançant el SYBR GREEN. A continuació s'exposen els encebadors utilitzats per detectar els gens analitzats en aquest estudi. Les condicions per realitzar la PCR es van emprar les facilitades per les instruccions de la casa comercial.

gen	for	rev
ACC1	TGGATCCGCTTACAGAGAGACT	GCCGGAGCATCTCATTCCG
ACC2:	CCAGTCTTCCGTGCCTTTGTAC	CTCATCCCTCGCTCTGAACG
ACTINB:	ATGCTCCCCGGGCTGTAT	CATAGGAGTCCTTCTGACCCAT
CPT1A:	GACCCTAGACACCACTGGCCG	GAGAGGACCTTGACCATAGCC
DGAT2:	GCACAGAGGCCACAGAAGTG	CCCTCAACACAGGCATCG
G6Pase:	AGGAAGGATGGAGGAAGGAA	TGGAACCAGATGGGAAAGAG
IL-1 $\alpha$ :	GCCCATCCTCTGTGACTCAT	AGGCCACAGGTATTTTGTCTG
IL-6:	CTGCAAGAGACTTCCATCCAGT	GAAGTAGGGAAGGCCGTGG
iNOS:	CGAAACGCTTCACTCCAA	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
MCP1:	TCCAATGAGTAGGCTGGAG	AAGTGCTTGAGGTGGTTGTG
MTP:	GTGGAGGAATCCTGATGGTGA	TGATCTTAGGTGACTTTTGCCC
PDK4:	TTTCTCGTCTCTACGCCAAG	GATACACCAGTCATCAGCTTCG
PEPCK:	GTCAACACCGACCTCCCTTA	CCCTAGCCTGTTCTCTGTGC
SCD1:	TTCTTGCGATACACTCTGGTGC	CGGGATTGAATGTTCTTGTCTG
SOCS3:	CCTTCAGCTCCAAAAGCGAG	GCTCTCCTGCAGCTTGCG
UCP2:	CCGGGGCCTCTGGAAAG	CCCAAGCGGAGAAAGGA

**Taula 2. Seqüències dels encebadors.** Es mostren les seqüències for i rev en direcció 5'-3' dels encebadors utilitzats per la PCR a temps real utilitzant per a la detecció el SYBR Green.

En la determinació d'alguns gens degut al seu baix nivell d'expressió és necessari l'ús de sondes per a la seva quantificació. En el nostre cas s'ha determinat mitjançant aquesta tècnica els nivells d'mRNA del TNF $\alpha$ . S'han utilitzat les sondes (UPL) de Roche. La pròpia casa comercial mitjançant la seva pàgina web ens proporciona tot un seguit d'informació i programes en línia sobre quin són els encebadors i sondes que es poden utilitzar per a la determinació de qualsevol gen d'estudi. Universal ProbeLibrary Assay Design Center. (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>).

Com a gen normalitzador s'ha fet servir la  $\beta$ -actina (ACT-B #05046190001) i pel TNF $\alpha$  s'han utilitzat els següents encebadors (5'-CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT-3' i 5'-AAGCAAAAGAGGAGGCAACA-3' amb la sonda #103, #04692217001 de la llibreria de Roche). El kit de Roche utilitzat per la detecció en aquest cas és el Light Cycler 480 Probes Master (Cat. No. 04 887 301 001).

Tots els experiments s'han fet a un volum final de 10 $\mu$ l repartits de la següent manera:



Cada pouet de la placa conté:

SYBR GREEN (reactiu)	5µl
H <sub>2</sub> O	2µl
Solució d'encebadors (10µM)	0,5µl
cDNA	2,5µl

**Taula 3. Barreja de reacció per PCR RT amb SYBR Green.** Es detallen els volums utilitzats de cada un dels components.

UPL probe (reactiu)	5µl
H <sub>2</sub> O	2µl
Solució d'encebadors (10µM)	0,5µl
cDNA	2,5µl

**Taula 4. Barreja de reacció per PCR RT amb UPL probe.** Es detallen els volums utilitzats de cada un dels components.

Per obtenir la solució d'encebadors utilitzada es barregen 10µl de l'encebador for 100µM més 10µl de l'encebador rev 100µM més 80µl H<sub>2</sub>O.

En el cas d'analitzar un gran nombre de mostres es prepara primer la barreja amb tots els reactius per tantes mostres com es tinguin i es distribueix la barreja amb 7,5µl per pouet de les plaques de 384 pouets, un cop addicionada la barreja de reacció s'afegeix el corresponent cDNA (2,5µl) de cada mostra. Es cobreix la placa amb un adhesiu transparent (Cat# 4311971) i es centrifuga a 1400 x g durant 30s. a 4°C. Un cop la placa estar preparada ja es pot començar el procés de la PCR a temps real seguint les condicions facilitades per la casa comercial en les instruccions del kit.

### 5.3.1 Quantificació i anàlisi de dades

Existeixen múltiples tipus i subtipus de mètodes per a la quantificació de l'expressió gènica per PCR a temps real. Cada un d'aquests mètodes té els seus propis requeriments, complexitat i fiabilitat. Però tots aquests mètodes d'anàlisi es poden englobar dins de dos grans grups: la quantificació relativa que s'expressa com a normalització de la relació entre el gen d'estudi i el gen normalitzador o de referència (Pfaffl MW, 2004); la quantificació absoluta que s'expressa en valor absolut. En el nostre cas es va escollir l'opció de *Relative Quantification (Advanced*

*Analysis*). Programa que proporciona la pròpia casa comercial Roche amb el software del LightCycler 480 anomenat *E-Method*. Per dur a terme la quantificació relativa s'ha de triar un gen de referència d'una expressió constant en els teixits, per això els gens utilitzats per la quantificació relativa són generalment gens *housekeeping*. En el nostre cas es va utilitzar com a gen *housekeeping* el gen de la  $\beta$ -actina.

El mètode proporcionat per la casa comercial per fer els càlculs de la quantificació relativa es basa en la comparació dels valors de Ct i l'eficiència de la reacció de la PCR com a factor de correcció (Pfaffl MW, 2001) tal i com es mostra en la figura 11.

Els valors de Ct es determinen per la identificació del cicle en el qual l'emissió de la intensitat del marcador fluorescent s'eleva per sobre del soroll de fons en la fase exponencial de la reacció de la PCR.

L'eficiència és la capacitat de la reacció de duplicar un número de còpies de les cadenes de DNA o cDNA en cada cicle (Bustin SA, 2004). Les eficiències de la PCR en temps real es calculen a partir de les pendents de la corba estàndard obtingudes després de realitzar dilucions seriades en les reaccions de la PCR en temps real (Pfaffl, 2004) d'acord amb la següent fórmula ( $E=10[-1/\text{slope}]-1$ ).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

**Figura 12. Equació de la ratio.** Equació emprada pel software de Roche en el càlcul de la ratio per obtenir la quantificació dels gens d'estudi.  $E_{\text{target}}$  representa l'eficiència de la PCR en temps real de l'amplicó d'estudi;  $E_{\text{ref}}$  representa l'eficiència de la PCR en temps real del gen de referència;  $\Delta CP_{\text{target}}$  és la desviació de la Ct del control menys la Ct del gen en estudi; i  $\Delta CP_{\text{ref}}$  és la desviació de la Ct del control menys la Ct del gen de referència.

## 6. ANÀLISI DE PROTEÏNES

### 6.1 Quantificació pel mètode de Bradford

El mètode de determinació de la concentració proteica descrit per (Bradford MM, 1976) es basa en que alguns colorants, quan interaccionen amb les proteïnes canvien el seu espectre d'absorció. El reactiu de Bradford conté coure en un medi

d'àcid ortofosfòric i metanol. Quan la proteïna s'uneix al coure, el seu màxim d'absorció canvia de 465nm a 595nm. Aquest mètode és altament sensible i lineal.

La quantificació proteica es realitza seguint les instruccions del fabricant (Bio-Rad *protein assay*, ref. 500-0006) utilitzant BSA com estàndard en el rang de 1-25µg/µl. El reactiu de Bradford es dilueix 1/5 en el moment d'utilitzar i es prepara la quantitat necessària per a cada determinació. La solució *stock* de l'estàndard de BSA es prepara a 1 µg/µl i les absorbàncies del blanc, dels patrons i de les mostres es medeixen a 595nm en un volum final de 1 ml en cubetes de plàstic d'1 cm de pas de llum.

<b>Mostra</b>	<b>Volum</b>	<b>Tampó</b>	<b>Bradford 1/5</b>
Blanc	-	50 µl	q.s.p. 1 ml
2 µg BSA	2 µl	48 µl	q.s.p. 1 ml
5 µg BSA	5 µl	45 µl	q.s.p. 1 ml
10 µg BSA	10 µl	40 µl	q.s.p. 1 ml
20 µg BSA	20 µl	30 µl	q.s.p. 1 ml
50 µg BSA	50 µl	-	q.s.p. 1 ml
Mostra problema	5-40 µl	45-10 µl	q.s.p. 1 ml

**Taula 5. Protocol per determinar la concentració proteica pel mètode de Bradford.** Volums necessaris per realitzar la recta patró i preparació de les mostres a analitzar.

## 6.2 Western Blot

Mitjançant la tècnica del Western Blot detectem una proteïna específica entre una mostra de proteïnes que han estat separades mitjançant electroforesi i transferides a una membrana de nitrocel·lulosa o de polivinilidenofluorur (PVDF) (GE Healthcare). La tècnica s'ha aplicat per la detecció de les proteïnes CPT1A,  $\beta$ -actina, HMGSCoA2, Akt total i pAkt (Ser 473). La tècnica del Western Blot consta dels següents passos:

### 6.2.1 Electroforesi

L'electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) és una tècnica molt utilitzada per a la separació de proteïnes segons el seu pes molecular. En aquests

tipus de gels les proteïnes o les seves subunitats migren cap a l'ànode segons el seu pes molecular i en condicions desnaturalitzants.

Les mostres que s'han emprat procedien d'extractes totals de fetge, de fraccions enriquides amb mitocondris o dels extractes per a la determinació de la cascada de senyalització de la insulina. Per cada mostra es sol sembrar entre uns 10-60µg de proteïna amb 6µl de tampó de càrrega 4X. Aquest tampó 1X conté Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% i blau de bromofenol 10%. Es conserva a -20°C en alíquotes d'1ml. Els agents desnaturalitzants SDS i el β-mercaptoetanol redueixen els ponts disulfur. Les mostres es bullen 5 min. a 95°C en un bany sec. Després es centrifuguen breument i es posen en gel fins a ser carregades en el gel d'electroforesi. Les mostres poden conservar-se en tampó de càrrega a -20°C durant 4-6 mesos.

Els gels d'electroforesi que s'han utilitzat són del 8% de poliacrilamida i de 0,75mm i 1,5mm de gruix. Per a la preparació dels gels s'ha utilitzat el kit Mini-Protean III de Bio-Rad o el kit Criterion també de la casa Bio-Rad segons les mostres a processar. Es prepara el gel separador i s'afegeix la barreja entre els dos vidres del cassette d'electroforesi prèviament rentats amb etanol. Per ajudar a la correcta formació del gel és aconsellable afegir una petita quantitat d'isopropanol per tal de que ens quedi la superfície uniforme i sense la presència de bombolles d'aire. La polimerització s'indueix amb el TEMED i el persulfat d'amoni. Un cop el gel separador ha polimeritzat, es treu l'isopropanol i s'addiciona la barreja del gel apilador i la pinta de 0,75mm ó 1,5mm de gruix entre els dos vidres depenent de la seva mida. La polimerització dels dos gels triga aproximadament uns 25min.

Abans de dur a terme l'electroforesi es treu la pinta, es prepara el tampó d'electroforesi (Tris 25mM, glicina 192mM i SDS 0,1%) i s'omple la cubeta. Les mostres i el marcador de pesos moleculars (Invitrogen, ref. LC5925 - See Blue Plus 2) es carreguen en el gel i l'electroforesi es realitza a una corrent constant de 30mA durant aproximadament 1 hora o 2 hores depenent del kit utilitzat i la proteïna d'estudi. L'electroforesi s'atura quan el blau de bromofenol del tampó de càrrega es troba a punt de sortir del gel.

Preparació dels gels SDS-PAGE d'un 1,5mm de gruix:

<b>Gel separador 7,5ml</b>	<b>8%</b>	<b>Gel apilador 2,5 ml</b>	<b>6%</b>
H <sub>2</sub> O destil·lada	4 ml	H <sub>2</sub> O destil·lada	1,8 ml
Acrilamida 40%	1,9 ml	Acrilamida 40%	0,4 ml
Tris-HCl 1,875M; pH 8,8	1,5 ml	Tris-HCl 1,875M; pH 6,8	0,25 ml
SDS 10%	75 µl	SDS 10%	25 µl
Persulfat d'amoni 10%	25 µl	Persulfat d'amoni 10%	8,5 µl
TEMED	3,75 µl	TEMED	2,5 µl

**Taula 6. Gel separador i gel apilador.** Volums necessaris per la preparació dels gels que s'utilitzaran per l'electroforesi.

L'acrilamida és un potent agent neurotòxic. El contacte amb la pell així com la seva inhalació s'ha d'evitar. S'ha utilitzat acrilamida/bis 40% solució 29:1 (3,3%C) (Bio-Rad, ref. 161-0146). El persulfat d'amoni al 10% es prepara dissolent 0,5g de persulfat d'amoni en 5ml de H<sub>2</sub>O destil·lada. Es prepara sempre extemporàniament.

### 6.2.2 Transferència

Un cop acabada l'electroforesi es procedeix a la transferència de les proteïnes del gel a una membrana de nitrocel·lulosa o de PVDF per a la posterior immunodetecció. Primer es separa el gel apilador del gel separador i aquest últim s'utilitza per a la transferència. Es situen, en aquest ordre, d'abaix cap d'alt i prèviament empapats amb tampó de transferència: una esponja, 2 papers de Whatman, el gel, la membrana de nitrocel·lulosa o de PVDF, 2 papers de Whatman i una altra esponja. Tot el muntatge es submergeix en tampó de transferència (Tris 20mM, metanol 20% i glicina 150mM) evitant la formació de bombolles d'aire que ens podrien impedir una bona transferència.

La transferència es dur a terme a 4°C i a 250mA 1 hora o 125mA 2 hores. També es pot deixar tota la nit a la cambra freda a 30mA. Un cop acabada la transferència, la membrana es renta amb PBS 1X i es comprova l'eficiència de la transferència submergeint la membrana en solució de Ponceau (Sigma-Aldrich, ref. P-7170). Aquesta solució tenyeix les bandes de proteïna d'un color vermellós i permet comprovar si les proteïnes s'han transferit correctament. Per a eliminar

aquesta tinció es renta la membrana amb PBS-Tween 0,1% durant uns minuts fins que desapareix el color vermellós del colorant.

### **6.2.3 Bloqueig de la membrana**

Els llocs d'unió inespecífics de la membrana es bloquegen submergint la membrana en solució de bloqueig (PBS-Tween i 5% de llet desnatada) i s'incuba 1h. a temperatura ambient en un agitador orbital. Passat aquest temps, la membrana es renta un cop durant 10 min. i dos cops durant 5 min. amb PBS-Tween en l'agitador orbital.

També es pot utilitzar per bloquejar la membrana una solució comercial *SuperBlock Dry Blend (TBS) Blocking Buffer* de Thermo Scientific (#37545) (1 sobre en 200ml de TBS, més 4mg d'azida i es conserva a 4°C) que funciona de la mateixa manera bloquejant els llocs inespecífics que queden lliures a la membrana. Es pot reutilitzar durant un parell de mesos.

### **6.2.4 Incubació amb anticossos**

#### **6.2.4.1 CPT1A**

Anticòs primari: L'anticòs primari utilitzat és un anticòs policlonal anti-CPT1A contra els aminoàcids 317-430 de la CPT1 de fetge de rata produït en conill a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia. L'anticòs es prepara 1/6.000 en PBS-Tween i 5% BSA. La incubació es realitza durant tota la nit a 4°C en un agitador orbital. Després d'aquest temps i abans de posar l'anticòs secundari, en tots els casos, la membrana es renta amb PBS-Tween (un rentat de 10min. i dos rentats de 5min.). L'anticòs es pot reutilitzar varis cops i es conserva a -20°C.

Anticòs secundari: Anti-conill (1/10.000) en PBS-Tween 1 hora temperatura ambient.

Sistema de detecció: ECF

#### **6.2.4.2 Actina**

Anticòs primari: Sigma 11459 (1/6.000)

Anticòs secundari: Anti-conill (1/10.000) en PBS-Tween 1 hora temperatura ambient.

Sistema de detecció: ECF

#### 6.2.4.3 HMGCS2

Anticòs primari: L'anticòs primari utilitzat és un anticòs policlonal anti-HMGCS2 contra els aminoàcids 307-321 de la HMGCS de fetge de rata produït en conill a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia. L'anticòs es prepara 1/6.000 en PBS-Tween 5% BSA i 0,02% azida.

Anticòs secundari: Anti-conill (1/10.000) en PBS-Tween 1 hora temperatura ambient.

Sistema de detecció: ECF

#### 6.2.4.4 Akt total

Anticòs primari: (1/1000) Cell Signaling #9272

Anticòs secundari: Anti-conill 1/1000 en TBS-Tween 1 hora temperatura ambient.

Sistema de detecció: ECL

#### 6.2.4.5 pAkt (Ser-473)

Anticòs primari: (1/1000) Cell Signaling #4051S

Anticòs secundari: Anti-ratolí 1/3000 en TBS-Tween 1 hora temperatura ambient.

Sistema de detecció: ECL

Solució **TBS-Tween 10x**: 0.5M Tris Base, 9% NaCl, 0.5% Tween 20; pH 8.4. Es pot desar a temperatura ambient i es dilueix 1/10 abans de ser utilitzada. Si és necessari es torna a ajustar el pH abans del seu us.

Els anticossos comercials s'han preparat amb TBS-Tween, 5% BSA més 0,02%  $\text{NaN}_3$ .

#### 6.2.5 Detecció

Per a la immunodetecció s'han utilitzat dos sistemes diferents: el *Enhanced ChemiFluorescence (ECF) Western Blotting kit* (Amersham Biosciences, ref. RPN 5781-*anti rabbit*), que permet l'ús d'un sistema d'escaneig (Storm 840, Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) per quantificar per fluorescència la intensitat de les bandes. La immunodetecció s'ha realitzat utilitzant un anticòs

secundari anti-conill que té lligat l'enzim de la fosfatasa alcalina seguit de la incubació amb el substrat ECF. La fosfatasa alcalina catalitza la conversió del substrat ECF en un producte altament fluorescent a 540-560nm. La membrana s'incuba durant 2min. amb 1,3ml de substrat ECF. Passat aquest temps es deixa assecar la membrana, s'escaneja i després la quantificació es realitza amb el programa Dynamics de la casa Kodak.

Per una altra banda s'ha utilitzat el *Enhanced Chemiluminescenc (ECL) Western Blotting kit (anti-mouse i anti-rabbit)* que emet luminiscència gràcies a l'enzim HRP (*Horseradish* peroxidasa) que es troba unit al anticòs secundari que oxida el luminol (diacilhidrazida cíclica) i es detecta mitjançant un revelador. La detecció es realitza mitjançant l'exposició amb films de fotografia a diferents temps.

S'ha utilitzat el kit de la casa comercial Biological Industries seguint el protocol de la casa comercial. Es barregen 2ml de la solució A amb 2ml de la solució B, es deixen 5 min. i s'addicionen per sobre de la membrana durant 2min. Després es mantenen en contacte en un cassette la membrana i el film durant els temps que calgui, tot seguit es revela el film mitjançant un Medical X-Ray Processor de la casa comercial Kodak. Després es pot escanejar i quantificar amb el programa Dynamics de Kodak de tractament d'imatges.

### 6.2.6 Stripping

Moltes vegades és necessari reutilitzar la membrana per fer altres immunodeteccions. En aquests casos es realitza un *stripping* de la membrana que consisteix en la separació dels anticossos per poder procedir a una altra incubació amb altres anticossos sense que hi hagi una interferència entre ells. Primer s'incuba la membrana 50°C durant 30min. en agitació amb solució de *stripping* ( $\beta$ -mercaptoetanol 100mM, SDS 2%, Tris-HCl 62,5mM; pH 6,7) i després es renta amb PBS 1X . La membrana queda llesta per tornar a ser utilitzada en un altre *Western Blot*. En el cas que la membrana hagi estat revelada utilitzant el mètode de ECF, abans de la incubació amb la solució de *stripping* es fa una incubació amb metanol al 40% (v/v) durant 30 min. a temperatura ambient.



## 7. ASSAIG DE L'ACTIVITAT CPT1

Per a la determinació de l'activitat CPT1 s'han utilitzat fraccions enriquides en mitocondris obtinguts a partir d'hepatòcits en cultiu o de fetge de ratolí. L'assaig d'activitat es realitza amb fraccions fresques sense congelar, per evitar la pèrdua d'activitat degut al procés de congelació i l'aparició de l'activitat CPT2 (localitzada dins el mitocondri) degut a la ruptura del mitocondri, que podria conduir a dades errònies de l'activitat CPT1.

### 7.1 Obtenció de fraccions enriquides amb mitocondris

#### 7.1.1 Obtenció de mitocondris d'hepatòcits

Per obtenir mitocondris provinents d'hepatòcits s'ha de partir com a mínim d'unes 4 plaques de 100mm sembrades amb les condicions descrites en l'apartat 2. Es retira el medi de cada una de les plaques i s'addicionen 5ml de PBS a cada placa mentre es mantenen sobre gel. Es rasquen els hepatòcits amb una espàtula per tal de desenganxar-los de les plaques. Es recullen en tubs de 15ml i es centrifuga 5min. a 7.000 x g i a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es resuspen el precipitat amb 2ml de solució d'extracció (sacarosa 70mM, manitol 220mM, HEPES 5mM i EDTA 2mM; pH 7,4). Es transfereix el contingut en un homogenitzador de vidre (Wheaton) i s'homogenitza 20 cops amb el *douncer loose* i 20 cops amb el *douncer tight*. Es transfereix en un eppendorf de 2ml i es centrifuga 3min. a 2.000 x g. Finalment el sobrenedant es torna a centrifugar 30min. a 16.000 x g. El precipitat ric en mitocondris es resuspen en 50-150µl de solució d'extracció. La concentració d'aquesta suspensió es determina mitjançant el mètode de Bradford i l'assaig d'activitat es realitza amb 10 µg de proteïna. Les alíquotes obtingudes es poden desar a -80°C.

#### 7.1.2 Obtenció de mitocondris de fetge

Per a l'obtenció de mitocondris de fetge de ratolí s'extreu el fetge i s'homogenitza en 20 volúms de solució d'extracció (sacarosa 70mM, manitol 220mM, HEPES 5mM i EDTA 2mM; pH 7,4) utilitzant un homogenitzador mecànic (Politró de Tefló) durant 1min. aproximadament i a màxima velocitat. L'homogenat es centrifuga a 600 x g 15 min. a 4°C. Es torna a centrifugar el sobrenedant a 12.000 x g durant 20min. El precipitat obtingut en aquesta centrifugació és ric en mitocondris i ara es procedeix a fer un parell de rentats resuspenent el precipitat amb 2ml de solució d'extracció i tornant a centrifugar a 7.000 x g i durant 10 min.

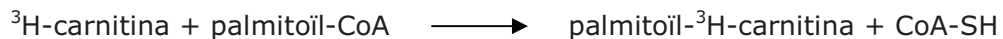
Finalment es resuspen el precipitat amb 1ml de solució d'extracció. La concentració d'aquesta suspensió es determina mitjançant el mètode de Bradford (Bradford MM, 1976) i l'assaig d'activitat es realitza amb 10 µg de proteïna.

És molt important conservar sempre les mostres en gel i realitzar totes les centrifugacions a 4°C per mantenir el màxim la integritat dels mitocondris.

## 7.2 Assaig radiomètric

L'activitat CPT1 es determina utilitzant un mètode radiomètric prèviament descrit (Esser, V 1996 i Morillas M, 2000). L'activitat CPT1 s'assaja en fraccions enriquides en mitocondris obtinguts com s'ha descrit anteriorment, on es procura que els mitocondris es mantinguin el més intactes possible. L'assaig es realitza sempre en fraccions sense congelar, per evitar la ruptura dels mitocondris i l'aparició de l'activitat CPT2.

Els substrats per a l'assaig d'activitat son L-[metil-<sup>3</sup>H]carnitina hidrocloreu (Amersham Biosciences, ref. TRK762) i el palmitoïl-CoA. La reacció es dona en la següent direcció:



El procés es basa en la formació de palmitoïlcarnitina marcada radioactivament que és soluble en un medi orgànic de butanol, mentre que el excés de carnitina radioactiva que no ha reaccionat és soluble en aigua. D'aquesta manera, mitjançant una extracció amb butanol saturat d'aigua podem separar la palmitoïlcarnitina.

La concentració final dels components de la barreja de reacció és de 105mM Tris-HCl pH 7,2, 2mM KCN, 15mM KCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM ATP, 250µM GSH, 50µM palmitoïl-CoA, 400µM L-[metil-<sup>3</sup>H]carnitina (0,3 µCi), 0,1% BSA (lliure d'àcids grassos).

Les desacilasas converteixen el substrat acil-CoA en l'àcid gras i CoA-SH generant ATP. Aquest procés pot reduir la disponibilitat del substrat palmitoïl-CoA en la reacció. És per aquest motiu que és necessària la presència d'ATP, ja que d'aquesta manera s'inverteix l'equilibri de la reacció de les desacilasas i s'estimula la reacció de les acil-CoA sintetases que regeneraran el substrat palmitoïl-CoA. El

KCN s'afegeix per evitar l'oxidació mitocondrial ja que inhibeix la cadena de transport electrònic. El GSH (glutatió reduït) s'afegeix com agent reductor en lloc del DTT (ditiotreitòl) o DTE (ditioeritrol) perquè aquests últims redueixen la sensibilitat a malonil-CoA (Saggerson ED, 1982). El BSA sense àcids grassos s'addiciona per protegir els mitocondris de l'efecte detergent dels àcids grassos. Tanmateix, la concentració de BSA no pot superar el 0,1% perquè sinó podria donar un efecte sigmoidal en la cinètica de l'enzim respecte a l'acil-CoA. Per últim, el KCl s'afegeix per incrementar l'activitat de l'enzim (Saggerson ED, 1982).

El procediment per a l'assaig d'activitat CPT1 es detalla a continuació. Primer es prepara la barreja de reacció que es manté a 4°C. El GSH es dissol en aigua just abans de ser utilitzat i cada mostra s'assaja per duplicat. La barreja de reacció conté els següents reactius per tub:

<b>Barreja de reacció CPT1/tub</b>	
Aigua destil·lada	92,33µl
Tampó CPT1 4X	40µl
Palmitoil-CoA 1 mM	10µl
ATP 80 mM	10µl
BSA 30%	0,67µl
GSH 25 mM	2µl
<sup>3</sup> H-carnitina 16 mM	5µl
Volum total	160µl

**Taula 6. Barreja de reacció de l'assaig CPT1A.** Assaig realitzat en un bany d'aigua a 30°C.

En segon lloc es prepara la barreja de la proteïna. Les mostres es preparen en tubs eppendorf de 1,5ml diluint la proteïna en tampó CPT1 4X (Tris-HCl pH 7,2 420 mM, KCN 8 mM, KCl 60 mM i MgCl<sub>2</sub> 16 mM) i ajustat a un volum final de 40µl amb aigua destil·lada. El blanc només conté aigua destil·lada i tampó CPT1 4X.

<b>Mostra (proteïna)</b>	
Proteïna (suspensió de mitocondris)	5-20 µg
Tampó CPT1 4X (4°C)	10 µl
Aigua destil·lada q.s.p.	40 µl

**Taula 7. Mostra de proteïna per l'assaig de CPT1A.** És important mantenir en fred la proteïna que es farà servir per fer l'assaig d'activitat.

Un cop preparades la barreja de reacció i la barreja de proteïna l'assaig s'inicia afegint 160µl de la barreja de reacció en cada tub de mostra de proteïna. Les mostres es barregen i es posen en un bany a 30°C durant exactament 5min. La reacció s'atura afegint 200µl de HCl 1,2N. Les mostres es barregen de nou i es poden deixar a temperatura ambient. En aquest punt podem deixar l'assaig o continuar el procediment amb les extraccions amb butanol. Per això s'addicionen 600µl de butanol saturat amb aigua, es barregen vigorosament i es centrifuguen a 16.000 x g durant 2 min. per separar la fase aquosa de la fase orgànica. S'agafen 400µl de la fase orgànica superior i s'afegeixen a una altra sèrie de tubs que contenen 200µl d'aigua destil·lada. Les mostres es barregen i es centrifuguen de nou, i s'agafen 250µl de la fase superior i s'afegeixen en un vial amb 5ml de líquid de centelleig (Ecolite, ICN). La radioactivitat es compta en un comptador de centelleig RackBeta durant 1min.

L'activitat específica de l'enzim es calcula de la següent manera:

$$\text{A.E. (nmol x mg prot}^{-1} \text{ x min}^{-1}) = (\text{cpm x 600 } \mu\text{l}) / \text{R.E. x mg prot. x min x 250 } \mu\text{l})$$

On les cpm son les comptes per minut i R.E. és la radioactivitat específica de la <sup>3</sup>H-carnitina (aproximadament 3.000 cpm/nmol).

Per preparar la <sup>3</sup>H-carnitina 16 mM es dissolen 6,6mg de carnitina en 982,3µl d'etanol 95% més 982,3µl d'aigua destil·lada i finalment s'addicionen 125µl de L-[metil-<sup>3</sup>H]carnitina hidrocloreur (80 Ci/mmol). Es fan alíquotes de diferents volums i es conserven a -80°C.

### 7.3 Assaig d'inhibició amb malonil-CoA

Per l'assaig d'inhibició amb malonil-CoA es procedeix de la mateixa manera que la descrita anteriorment, però afegint diferents quantitats de malonil-CoA en la barreja de proteïna ajustant el volum final a 40µl. L'estoc de malonil-CoA a 2mM es prepara en una solució d'acetat de sodi 1M pH 5,9 i es conserva a -20°C.

Les mostres i el malonil-CoA es barregen i es preincuben 1min. abans de l'addició de la barreja de reacció.

## 8. ASSAIG D'OXIDACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS

Per l'avaluació del metabolisme d'àcids grassos s'ha emprat l'oleat (oxidació controlada per CPT1A) marcat amb  $^{14}\text{C}$ . Els assajos d'oxidació es van realitzar amb hepatòcits. L'oxidació d'àcids grassos es determina quantificant la producció de  $^{14}\text{CO}_2$  (Collins CL, 1998) i la producció dels metabòlits àcids solubles (ASP) que són principalment intermediaris del cicle de Krebs: acetil-CoA i oleoilcarnitina (Veerkamp JH, 1986).

L'oxidació d'oleat a  $\text{CO}_2$  indica l'oxidació total de la molècula d'àcid gras, però també hi ha molècules d'àcid gras que no han estat totalment oxidades i queden productes intermediaris àcids, o productes solubles àcids (ASP). L'àcid perclòric afegit per aturar la reacció precipita l'excés d'oleat radioactiu unit a BSA deixant els ASPs en solució.

### 8.1 Assaig d'oxidació d'oleic en hepatòcits (ampolles 25cm<sup>2</sup>)

Aquest mètode (Roduit R, 2004) utilitza ampolles de 25cm<sup>2</sup> en les quals el  $\text{CO}_2$  queda atrapat en un paper mullat amb KOH 0,1N. Aquest mètode representa una millora en termes de difusió o fuites de  $\text{CO}_2$  però suposa una major despesa de cèl·lules i reactius emprats en l'experiment. La reacció s'atura injectant àcid perclòric a l'ampolla. Això té dues conseqüències: en primer lloc deté l'oxidació al matar les cèl·lules i en segon lloc acidifica el medi provocant l'evaporació del bicarbonat radioactiu dissolt en el medi en forma de  $\text{CO}_2$ . El fet d'afegir àcid perclòric inhabilita les cèl·lules per determinar la proteïna per Bradford (Bradford MM, 1976), per aquest motiu és necessari preparar un punt extra per determinar la proteïna.

En primer lloc s'obtenen els hepatòcits preferiblement de bon matí (veure apartat 2.2). Un cop obtinguts i sembrats en les ampolles 25cm<sup>2</sup> es deixen reposar 4 hores en medi d'obtenció per tal de que s'adhereixin correctament. Després d'aquest temps es canvia del medi d'obtenció (descriu en l'apartat 2.2) al medi de diferenciació (DMEM (Gibco ref.311885, 5mM glucosa, 10%FBS, 100U/ml-100ug/ml Penicilina-Estreptomicina (Gibco ref.15140).) i es deixen reposar a l'incubador fins l'endemà.

Es preparen les solucions següents i s'atemperen al bany a 37°C.

**KRB 5X:** 135mM NaCl, 3,6mM KCl, 0,5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5mM MgSO<sub>4</sub> i 1,5mM CaCl<sub>2</sub>

**KRBH (100ml):** 20ml KRB5x, 100 mM NaHCO<sub>3</sub> 1 M HEPES; pH 7,4

Tot seguit es renten els hepatòcits amb 3ml per ampolla amb una solució KRBH més 0,1% BSA. Per tal de determinar la concentració de proteïna es desenganxen els hepatòcits d'una de les ampolles amb 1ml de PBS.

Un cop descartada la solució de rentat s'incuben els hepatòcits amb 2ml per ampolla amb una solució KRBH més 1% BSA durant 30min. a 37°C. Es preparen els papers de Whatman (2 x 2cm) humits amb 100µl de KOH 0,1N. Passats els 30min. es retira la solució KRBH més 1% BSA i es tornen a rentar amb la solució KRBH més 0,1% amb 3ml per ampolla.

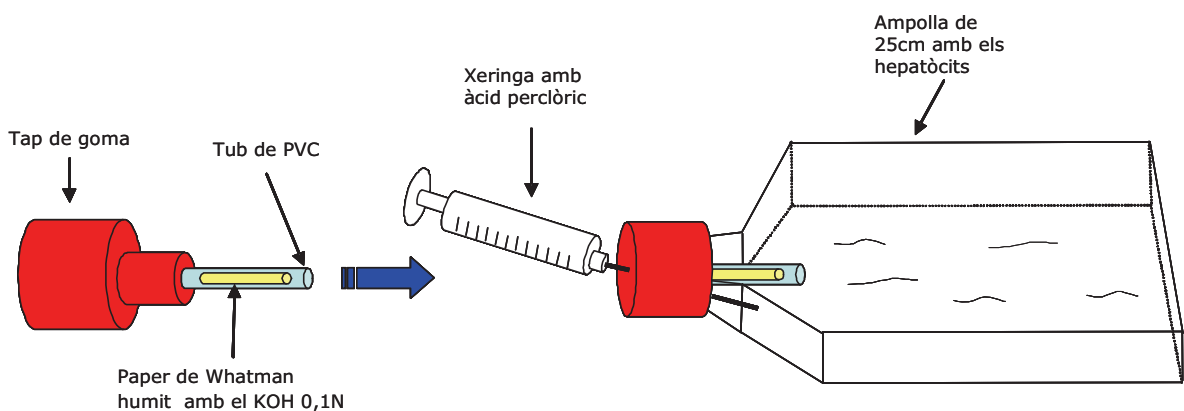
Després de rentar els hepatòcits s'afegeix 2ml de la barreja de reacció (1,6ml KRBH, 200µl 3mM [1-<sup>14</sup>C]oleat més 200µl (25mM glucosa més 8mM carnitina) per cada ampolla. A més a més es prepararan per cada experiment un parell d'ampolles sense hepatòcits que serviran com a blancs.

Per a preparar l'oleat radioactiu 3mM unit a 1% de BSA, s'afegeixen 500µl d' [1-C<sup>14</sup>]àcid oleic (GE Healthcare, ref. CFA243-50 µCi) en un tub de 1,5ml i es deixa evaporar la solució de toluè sota la campana d'extracció de gasos. Un cop evaporat, en el mateix tub es pesen 4,567mg d'oleat sòdic i es dissolen en 1ml de NaOH 1N calentat a 80-100°C fins que la solució és transparent. Per un altre costat es dissolen 0,5g de BSA lliure d'àcids grassos (Sigma-Aldrich, ref. A-6003) en 4,5ml de NaCl 0,9%. Es manté aquesta solució entre 45-50°C. Un cop la solució d'oleat és transparent, s'afegeix gota a gota sobre la solució de BSA i es va agitant lentament. D'aquesta manera s'aconsegueix que l'oleat es conjugui amb l'albúmina.

La solució resultant es filtra a través d'un filtre de  $0,45 \mu\text{m}$  i es desa en alíquotes de 1ml a  $-20^\circ\text{C}$  obtenint una concentració final de  $0,3\text{mM}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oleat, 1% BSA i  $1\mu\text{Ci/ml}$ .

Es tanca el sistema (veure figura 12) i s'incuben les ampolles a  $37^\circ\text{C}$  a l'incubador lliure de  $\text{CO}_2$  durant 1-4 hores.

Passat el temps d'incubació s'afegeixen  $200\mu\text{l}$  de  $\text{HClO}_4$  al 40% amb una xeringa per aturar la reacció i es barreja bé el contingut. S'embolica el tap de totes les ampolles amb parafilm per tal d'assegurar que el sistema quedi ben tancat hermèticament i que no s'escapi res de dins les ampolles. Després es deixa reposar tota la nit fora dels incubadors ja que la reacció es troba aturada.



**Figura 13. Sistema d'oxidació d'oleat en ampolles de  $25\text{cm}^2$ .** La barreja d'oxidació d'oleat s'afegeix a cada ampolla que contenen els hepatòcits adherits. El sistema es tanca amb un tap de goma que disposa d'un tub de PVC que porta en el seu interior un paper Whatman humit amb en KOH. Les ampolles s'incuben a  $37^\circ\text{C}$  durant 3 h.

Es transfereix el paper de Whatman en un tub de plàstic per comptar la radioactivitat amb 5ml de líquid de centelleig i es deixa reposar tota la nit.

Finalment es compten els vials amb el protocol 4 ( $^{14}\text{C}$  1 min.) afegint un vial amb  $50\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ oleat-BSA per saber les comptes totals.

Per calcular els ASPs, es centrifuga 1ml del medi d'incubació de cada una de les ampolles a  $16.000 \times g$  durant 10min i es compten  $800\mu\text{l}$  del sobrenedant amb 5ml de líquid de centelleig.

Càlcul del resultat d'oxidació:

$$\text{nmol d'oleat.mg prot.h} = (\text{cpm-cpm blanc}) \times 600 / (\text{cpm totals} \times \text{mg prot} \times \text{h})$$

Les cpm totals és el resultat de comptar en un vial de centelleig 200µl d'oleat 1-<sup>14</sup>C 3mM utilitzat en cada ampolla, el 600 fa referència als nmols d'oleat que hi ha per ampolla, i h són les hores d'incubació.

Càlcul d'ASPs:

$$\text{nmol d'oleat mg prot.h} = (\text{cpm-cpm blanc}) \times 600 \times (2200/800) / (\text{cpm totals} \times \text{mg prot} \times \text{h})$$

Les cpm totals és el resultat de comptar en un vial de centelleig 200µl d'oleat 1-<sup>14</sup>C 3mM utilitzat en cada ampolla, 600 són els nmols d'oleat que hi ha per ampolla, 2200/800 és el factor de dilució i h les hores d'incubació.

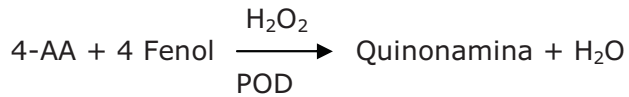
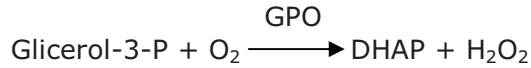
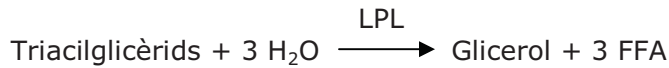
## 9. DETERMINACIONS EN SÈRUM

### 9.1 Determinació de triacilglicèrids

La determinació de TAG en sèrum o plasma obtingut com s'ha descrit anteriorment s'ha realitzat mitjançant un kit Cromatest (LiNEAR Chemicals. S.L. Ref: 1155010) basat en un mètode enzimàtic colorimètric. El mètode es basa en la hidròlisi enzimàtica dels triacilglicèrids sèrics a glicerol i a àcids grassos lliures (FFA) per acció de la lipoproteïna lipasa (LPL). El glicerol és fosforilat per l'ATP en presència de glicerolquinasa (GK) per formar glicerol-3-fosfat (G-3-P) i adenosina difosfat (ADP). El G-3-P és oxidat per la glicerol fosfat oxidasa (GPO) en dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i peròxid d'hidrogen.

En presència de peroxidasa (POD) el fenol i la 4-aminoantipirina (4-AA) es condensa per acció del peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formant-se un cromògen vermell proporcional a la concentració de triacilglicèrids presents a la mostra.





S'equilibren els reactius i les mostres a T ambient.

<b>Cubetes</b>	<b>Blanc</b>	<b>Mostra</b>	<b>Patró</b>
Monoreatiu	1 ml	1 ml	1 ml
Mostra	-	10 µl	-
Patró	-	-	10 µl

**Taula 8. Determinació de triacilglicèrids.** Protocol proporcionat per la casa comercial.

Es barreja i es deixen reposar les cubetes 15 min. a temperatura ambient o 5min. a 37°C.

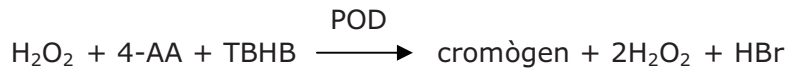
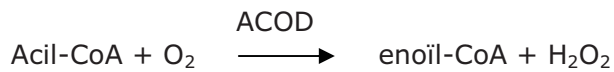
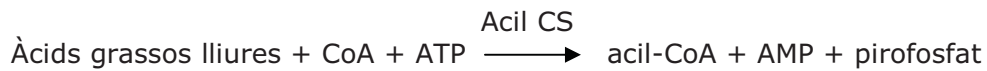
Finalment es llegeix l'absorbància de la mostra i del patró a 500nm envers el blanc.

Càlculs:

Concentració de triacilglicèrids (mg/dl) = Abs. mostra/ Abs. Patró x C patró (200mg/dl).

## 9.2 Determinació d'àcids grassos lliures

La determinació d'àcids grassos lliures en sèrum o plasma obtingut com s'ha descrit anteriorment (veure apartat 4.2) s'ha realitzat mitjançant un kit (Roche Ref: 11 383 175 001) basat en un mètode enzimàtic colorimètric. En la presència de l'enzim acil-CoA sintetasa (Acil CS) i de l'ATP, els àcids grassos lliures passen a acils-CoA, AMP i fosfat. Els acils-CoA reaccionen amb l'oxigen en la presència d'acil-CoA oxidasa (ACOD) per formar 2,3-enoil-coenzim A (enoil-CoA). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> format converteix l'àcid 2,4,6-tribrom-3-hidroxi-benzoic (TBHB) i el 4-aminoantipirina (4-AA) en un cromògen de color vermell en la presència de POD.



Els reactius es preparen segons les instruccions del kit.

	<b>Blanc</b>	<b>Mostra</b>	<b>Patró</b>
Reactiu A	1 ml	1 ml	1 ml
Patró	-	-	0.05 ml
Mostra	-	0.05 ml	-
H <sub>2</sub> O destil·lada	0.05 ml	-	-

**Taula 9. Determinació d'àcids grassos lliures.** Protocol proporcionat per la casa comercial.

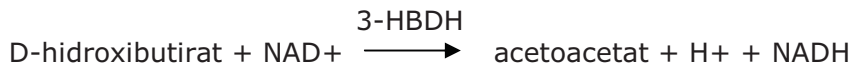
Es barreja i es deixen a temperatura ambient 10min. aproximadament, després s'afegeixen 0.05ml del contingut de l'ampolla 3 del kit, la qual conté una solució de N-etil-maleinimida necessària per eliminar l'excés de CoA abans de que actuï l'ACOD. Es barreja i es llegeix l'absorbància a 546nm. Un cop obtinguda la primera lectura d'absorbància es segueix amb la reacció afegint 0.05ml del reactiu B (el qual conté l'enzim ACOD), es deixa reposar 15min. a temperatura ambient i es torna a fer la lectura de l'absorbància a 546nm.

Càlculs:

$$\text{Concentració d'àcids grassos lliures (mM)} = 1.192 \times \Delta\text{Abs.}$$

### 9.3 Determinació de cossos cetònics

La determinació dels cossos cetònics en sèrum o plasma obtingut com s'ha descrit anteriorment (veure apartat 4.2) s'ha realitzat mitjançant un kit (RANDOX Ref: RB 1007) basat en un mètode enzimàtic colorimètric. El kit ens permet mesurar el D-3-hidroxiacetat en sèrum o en plasma. El mètode es basa en l'oxidació del D-3-hidroxiacetat en acetoacetat per l'enzim 3-hidroxiacetat deshidrogenasa (3-HBDH). Conjuntament amb aquesta oxidació el NAD<sup>+</sup> és reduït a NADH i aquest canvi d'absorbància pot ser directament relacionat amb la concentració del D-3-hidroxiacetat.



	<b>Blanc</b>	<b>Mostra</b>	<b>Patró</b>
Reactiu	1 ml	1 ml	1 ml
Patró	-	-	25 µl
Mostra	-	25 µl	-
H <sub>2</sub> O destil·lada	25 µl	-	-

**Taula 10. Determinació de cossos cetònics.** Protocol proporcionat per la casa comercial.

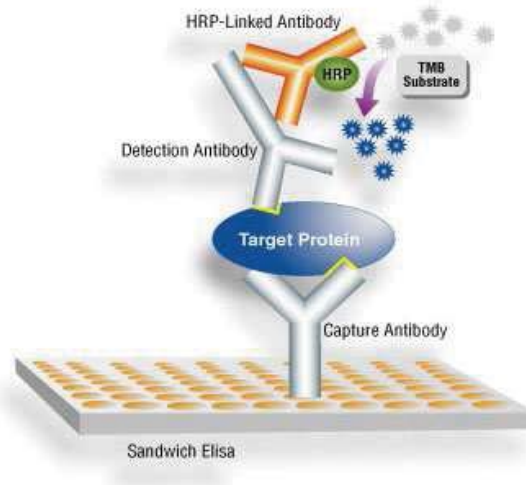
Es barreja el contingut de la cubeta i s'incuba 60s. a 37°C i es llegeix l'absorbància al cap d'1 i 2 min. a 340nm.

Càlculs:

Concentració del D-3-hidroxi butirat (mmol/l) =  $\Delta\text{Abs. mostra} / \Delta\text{Abs. patró} \times C$  del patró (1 mmol/l)

#### 9.4 Determinació d'insulina

Per dur a terme les mesures d'insulina en sèrum s'ha emprat el kit ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de Millipore del tipus "sandvitx" de fase sòlida (figura 14), en el qual als pous de les placa hi ha adsorbit un anticòs policlonal específic per a la insulina de ratolí (Cat. #EZRFI-13K) i s'han seguit les instruccions de la casa comercial. La insulina queda atrapada entre un anticòs de ratolí monoclonal i un anticòs policlonal. Després es dur a terme un rentat de totes les mostres i s'afegeix l'enzim HRP (*horseradish* peroxidasa) a l'últim anticòs. L'activitat de l'enzim HRP en la presència del substart 3,3',5,5' -tetrametilbenzidina (TMB) es mesura espectrofotomètricament a 450nm i corregit a 590nm. El lector de plaques emprat per fer les lectures d'absorbància ha estat el Modulus microplate de la casa comercial Turner Biosystems.



**Figura 14. Tècnica ELISA. "Sandvitx"** de fase sòlida, capturació de la insulina i determinació.

## 9.5 Determinació de leptina

Per dur a terme les mesures de leptina en sèrum s'ha emprat el kit ELISA de Millipore del tipus "sandvitx" de fase sòlida, en el qual als pous de la placa hi ha adsorbit un anticòs policlonal específic per a la leptina de ratolí (Cat. #EZRMI-82K) i s'han seguit les instruccions de la casa comercial.

## 10. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS EN FETGE

### 10.1 Determinació de TAG

Per poder fer la determinació del contingut de TAG en fetge de ratolí primer s'ha de realitzar una extracció amb cloroform dels greixos del fetge.

Es parteix d'uns 100mg de fetge congelats i es posen en un tub eppendorf de 2ml. S'addicionen 500µl de PBS. S'homogenitza amb el Politró durant 20s. a màxima velocitat. Es desen 100µl de l'homogenat per determinar la concentració de proteïna (utilitzar una dilució 1/20). Es transfereix l'homogenat en tubs de vidre i s'afegeixen 1,5ml de cloroform. Es barreja vigorosament. Es deixa agitant tota la nit a temperatura ambient tapat amb paper d'alumini. Es centrifuga 5min. a 10.000 x g. Es transfereix el sobrenedant i la fase de sota (la fase intermitja) en un nou tub de vidre. S'addicionen 500µl de NaCl 0,9%. S'agafa la fase orgànica que es troba a la part inferior del tub, si no es veu clarament s'afegeix més cloroform. Es barreja 1min. i es centrifuga 5 min. a 10.000 x g. Es transfereix la fase de sota en un nou tub de vidre i es reconstitueix en 250µl d'isopropanol. En aquest moment ja

es pot mesurar el contingut de TAG amb el kit de LINEAR Chemicals S.L. (descriu en l'apartat 9.1).

## 10.2 Determinació de malonil-CoA

El mètode per a la determinació de malonil-CoA en teixit s'ha posat apunt a partir d'una adaptació de varis articles (Gao L, 2007 i Minkler PE, 2006) amb canvis mínims als Serveis Científicotècnics del Parc Científic de Barcelona.

El mateix mètode s'ha posat a punt per quantificar el malonil-CoA i el  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA, que tot i tenir el mateix pes molecular (853,58 g/mol) el mètode permet separar químicament els dos compostos i per tant s'elueixen en temps diferents i es poden quantificar d'una mateixa mostra.

### 10.2.1 Extracció de la mostra

L'extracció s'ha posat apunt amb els següents tipus de teixits: fetge, cor, múscul i hipotàlem. Es mantenen els teixits en nitrogen líquid i s'agafa una quantitat coneguda entre (0.2-0.3g) aproximadament amb 5 $\mu$ l de patró intern (malonil-CoA  $^{13}\text{C}$  50ppm). S'homogenitza amb un politró durant 30s. a màxima velocitat en 1ml de TCA al 10%-15% amb 50 $\mu$ M de DTT. L'homogenat es barreja 5s. i es centrifuga 15min. a 14.000 x g a 4°C. Es filtra amb un filtre de 0.22 $\mu$ m i la mostra ja estar preparada per injectar, analitzar i quantificar per HPLC/MS.

### 10.2.2 Procediment i condicions de l'HPLC/MS

S'injecta a l'HPLC/MS una recta patró de 2ppb fins a 100 ppb on a cada punt de la recta s'hi addiciona una quantitat coneguda de patró intern (5  $\mu$ l de 50ppm de malonil- $^{13}\text{C}$ ).

Columna: Luna C18 (25cm x 4.6 $\phi$ ) i 5 $\mu$ m de partícula.

Fase mòbil A: 100mM acetat d'amoni, pH = 4,6 (àcid acètic).

Fase mòbil B: 70% A i 30% MetOH.

Fase mòbil C: Postcolumna d'acetona

Aparell: Triple Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer (API 3000)

Forn: 40°C (recinte on s'emmagatzema la columna)

Volum d'injecció: 20 $\mu$ l

Temps (min.)	A (%)	B (%)	C (%)
0,1	10	90	0
7	35	60	5
12	47	40	13
13	60	10	30
14	10	90	0
19	10	90	0

**Taula 11. Gradient emprat en l'HPLC/MS.** Els diferents tipus de fases mòbils es preparen extemporàniament.

### 10.2.3 Quantificació

Tenint en compte la recta patró i la quantitat de mostra de la qual es partia s'obtenen els nmol/g de teixit de malonil-CoA.

## 10.3 Determinació de $\beta$ -hidroxibutirat-CoA

### 10.3.1 Extracció

El procés d'extracció és el mateix sistema emprat en el mètode d'extracció pel malonil-CoA (veure apartat 10.2).

### 10.3.2 Procediment i condicions per l'HPLC/MS

Procedim a injectar a l'HPLC/MS una recta patró de 2 ppb fins a 100 ppb amb les mateixes condicions descrites en l'apartat 10.2.

### 10.3.3 Quantificació

Tenint en compte la recta patró i la quantitat de mostra de la qual es partia s'obtenen els nmol/g de teixit de  $\beta$ -hidroxibutirat-CoA.

## 10.4 Determinació de ROS (espècies reactives d'oxigen)

Per fer la determinació de ROS s'ha utilitzat extracte total de fetge obtingut amb solució d'extracció de mitocondris i s'ha dut a terme mitjançant el kit de Millipore OxyBlot<sup>TM</sup>, el qual és un mètode sensible i simple per la detecció i quantificació de proteïnes modificades per l'acció de radicals lliures d'oxigen i altres espècies reactives.

En múltiples processos fisiològics i patològics es produeixen modificacions de l'estat d'oxidació de les proteïnes per l'acció dels radicals lliures d'oxigen i altres espècies reactives com l'hidroxinonenal. Com a conseqüència d'aquestes modificacions, s'introdueixen grups carbonil en les cadenes de les proteïnes per un mecanisme lloc-específic.

El kit d'OxyBlot™ ens permet avaluar per immunodetecció els grups carbonil com a indicador de l'estat d'oxidació de les proteïnes. Els grups carbonils de les proteïnes són derivatitzats a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) per l'acció del 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Les mostres de proteïnes derivatitzades-DNP es separen per electroforesi en un gel de poliàcrilamida i es detecten i quantifiquen mitjançant un Western Blot realitzat amb els anticossos que ens proporciona el propi kit (Anticòs primari: Anticòs de conill Anti-DNP i anticòs secundari: cabra anti-conill IgG (HRP-conjugat)).

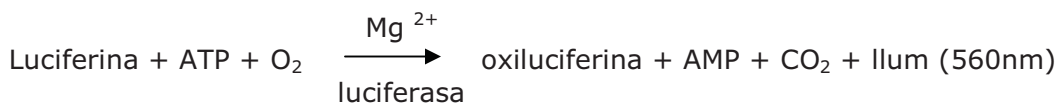
En la preparació de les mostres és molt recomanable afegir a l'extracte proteic un agent reductor per prevenir l'oxidació de proteïnes un cop s'han trencat les cèl·lules. Es pot utilitzar com a agent reductor el  $\beta$ -mercaptoetanol (1-2 %) o el DTT (50 mM) per inhibir l'oxidació i a més a més no té cap efecte advers en la reacció de derivatització del protocol a seguir pel kit.

Es necessiten dues alíquotes per cada mostra a analitzar. Una alíquota es tractarà amb la reacció de derivatització mentre l'altra servirà com a control negatiu, substituint la solució Control de derivatització 1X per la Solució de DNPH 1X. Es transfereixen 5  $\mu$ l de l'extracte proteic (cru o purificat) en 2 tubs eppendorf (0.5-1.5ml). El volum de les mostres a processar pot variar en funció de la concentració de les proteïnes de les mostres. Si s'utilitza un volum superior a 5 $\mu$ l s'han d'ajustar els volums del kit. Generalment per a la reacció de derivatització es recomana utilitzar entre 15-20 $\mu$ g de proteïna. Es desnatura cada alíquota (5 $\mu$ l) mitjançant l'addició de SDS (12%) per tal de que s'obtingui una concentració final al 6% de SDS. Es derivatitzen les mostres afegint 10 $\mu$ L de la solució DNPH 1X a un dels tubs. A l'alíquota que s'utilitza com a control negatiu se l'hi afegeix 10 $\mu$ L de la Solució Control de Derivatització 1X enlloc de la solució DNPH 1X. S'incuben tots els tubs a temperatura ambient durant 15 min. En aquest punt no es recomana deixar la reacció més de 30 min. S'addicionen 7.5 $\mu$ L de Solució de Neutralització a tots els tubs i si en la preparació dels extractes proteics no s'ha utilitzat un agent reductor, en aquest punt del procés es pot afegir  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentració final del 0,74M (1-1.5 $\mu$ l; 5%v/v). Tan l'extracte

tractat com el control negatiu de cada mostra es poden córrer en un gel de poliacrilamida i detectar els grups carbonil per immunodetecció seguint la tècnica del Western Blot. En aquest punt del procés les mostres es poden conservar a 4°C durant una setmana.

### 10.5 Determinació d'ATP

Per la determinació d'ATP en el fetge s'ha utilitzat el kit de bioluminiscència de la casa comercial Invitrogen (A22066). El kit es basa en l'oxidació de la luciferina conjuntament amb l'ATP per emetre llum. El mètode és extremadament sensible. Els extractes es van obtenir dels fetges congelats i homogenitzats amb HClO<sub>4</sub> al 40% i posterior incubació de 10 minuts. Es centrifuga a 10,000xg durant 10 minuts per tal d'extraure les proteïnes que han precipitat degut al medi àcid. Tot seguit es neutralitzen 300µl del sobrenedant amb KHCO<sub>3</sub> 5M. Finalment s'utilitzen 10µl per la quantificació de l'ATP barrejats amb 90µl de la solució de reacció proporcionada pel mateix kit. Les concentracions d'ATP es van calcular per extrapolació d'una corba patró i la luminiscència es va detectar mitjançant l'aparell Turner System.



## 11. ESTUDI HISTOLÒGIC DE FETGE I DE TEIXIT ADIPÓS

El processament (fixació, inclusió i talls dels blocs de parafina) i la tinció amb Hematoxilina-Eosina de les mostres de fetge i de teixit adipós s'han realitzat al servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Les fotografies de les mostres s'han pres amb un microscopi de la casa comercial Leica CTR4000 al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.

En primer lloc s'extreu un petit fragment de fetge o teixit adipós tenint cura que sempre s'extregui del mateix punt per ser el màxim de repetitius i poder comparar entre les diferents mostres dels animals. Es fixa el teixit mantenint els fragments submergits en formalina al 10% (SIGMA HT5014) en 10 vegades el volum de la mostra. Es deixa com a mínim 24 hores per tal de que les mostres quedin ben fixades.



A continuació abans de procedir a la deshidratació de les mostres es renten amb PBS 10min. un parell de cops. Tot seguit s'especifiquen els protocols seguits en la deshidratació del fetge i del teixit adipós i es treballa sota campana de flux laminar. Per evitar l'inhalació de gasos.

### 11.1 Deshidratació de les mostres de fetge

Component	Temps
Alcohol 70%	1x1h
Alcohol 96%	2x1h
Alcohol 100%	2x1h
Xilol	2x1h
Parafina a 58-60°C	1x1h
Parafina a 58-60°C	Tota la nit
Confecció dels blocs de parafina	

**Taula 12. Protocol de deshidratació del fetge.** Quan es treballa amb el xilol es realitza sota campana de flux laminar per tal d'evitar els vapors.

### 11.2 Deshidratació de les mostres de teixit adipós

Components	Temps
PBS	5min.
Alcohol 50%	20min.
Alcohol 70%	20min.
Alcohol 95%	2 x 20min.
Alcohol 100%	20min.
Alcohol 100%	2 x 30min.
Xilol	2 x 30min.
Parafina	30min.
Parafina	45min.

**Taula 13. Protocol de deshidratació del teixit adipós.** Quan es treballa amb el xilol es realitza sota campana de flux laminar per tal d'evitar els vapors.

Es procedeix a realitzar els talls dels blocs de parafina amb un gruix de 4µm i es tenyeix amb Hematoxilina-Eosina (H&E).

### 11.3 Procediment de tinció per H&E:

Procés	Component	Temps
<b>Desparafinació</b>	Xilol	5 min.
<b>Hidratació</b>	Alcohol 100%	5 min.
	Alcohol 90%	5 min.
	Alcohol 70%	5 min.
	Aigua mQ	3 min.
<b>Tinció</b>	Hematoxilina	30s en agitació
	Aigua mQ	2 x 3min.
	Etanol 70%	5 min.
	Eosina alcohòlica 1%	10-30s en agitació
<b>Deshidratació</b>	Alcohol 95%	2 x 30s-60s
	Alcohol 100%	2 x 30s-60s
	Xilol	1 x 1min.
	Montatge DPX	

**Taula 14. Protocol per la tinció H&E.** L'hematoxilina és un colorant catiònic que tenyeix les estructures àcides de color blavós, porpra i l'eosina és un colorant aniònic que tenyeix els components bàsics de color rosat.

## 12. SERVIDORS EN LÍNIA I PROGRAMES D'ÚS FREQUENT

Al llarg d'aquesta tesi s'han utilitzat de forma extensiva diferents bases de dades i diferents eines bioinformàtiques disponibles en línia. A continuació es detallen les més emprades.

### 12.1 Servidors

**NCBI:** Portal del *National Center for Biotechnology Information* estadounidenc que agrupa bases de dades d'accés públic de nucleòtids i proteïnes, bibliogràfiques, de malalties hereditàries, així com eines d'alineament de seqüències. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

**Swisprot:** és una base de dades de proteïnes anotades de forma manual, integrada amb altres bases de dades i ben documentada. L'anotació consisteix en la

descripció de la funció proteica, les seves modificacions postraduccionals, els seus dominis i llocs catalítics, la seva estructura secundària, la seva estructura quaternària, la similitud amb altres proteïnes, les enfermetats associades a la proteïna i les variants de la seqüència. La font de les dades solen ser les publicacions científiques. [www.expasy.org](http://www.expasy.org)

## 12.2 Programes i principals eines bioinformàtiques

### 12.2.1 Cerca d'homologia de seqüències

La cerca d'homologies de seqüència del DNA permet un primer acostament a la funció biològica d'un nou gen. Les seqüències del DNA es van obtenir de les següents bases de dades

**GenBank** del NCBI (Benson DA, 2007).

**EMBL** del EBI (*European Bioinformatics Institute*).

L'eina utilitzada per la cerca d'homologies ha estat el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul SF, 1997; Wheeler D, 2007), que consisteix en un algoritme de cerca de similituds aplicable a qualsevol seqüència de DNA o de proteïna. El programa compara les seqüències de nucleòtis o proteïnes amb bases de dades de seqüències i calcula la significació estadística dels aparallaments. Amb aquesta eina es pot, entre d'altres coses, trobar a partir d'un cDNA el gen que el codifica i delimitar aquest gen en exons i introns.

En aquest treball s'han utilitzat aquestes eines, fonamentalment, per comparar les seqüències de les diferents isoformes de l'enzim carnitina palmitoil transferasa I.

Existeixen 5 aplicacions diferents del programa BLAST: BLASTN, BLASTX, TBLASTX, BLASTP i TBLASTN. Els tres primers s'utilitzen per analitzar seqüències de nucleòtids i els dos últims per analitzar proteïnes.

**BLASTN:** busca una seqüència de nucleòtids en bases de dades de seqüències nucleotídiques. Permet la identificació de gens semblants.

**BLASTX:** tradueix la seqüència de nucleòtids problema en les sis pautes de lectura possibles i busca en bases de dades de proteïnes. Permet identificar productes

gènics semblants als codificats per la seqüència genòmica. Serveix per a trobar regions codificants.

**TBLASTX:** tradueix una seqüència de nucleòtids i busca en bases de dades de seqüències traduïdes. Permet identificar gens ortòlegs i paròlegs.

**BLASTP:** busca proteïnes semblants en bases de dades de proteïnes.

**TBLASTN:** busca seqüències de proteïnes en bases de dades de seqüències de DNA traduïdes en les sis pautes de lectura possibles.

Aquestes cerques es realitzen sobre la base de dades GenBank, que forma part de l'*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, organisme que està integrat pel *DNA DataBank of Japan* (DDBJ) i el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL).

### 12.2.2 Cerca d'encebadors per a PCR a temps real

**RT Primers Data Base** és una base dades pública (Pattyn F (2003, 2006)) de seqüències d'encebadors i sondes utilitzades per PCR a temps real per diferents mètodes (*SYBR Green*, *Taqman* o *Hybridisation Probes*) que han estat publicats en els diferents articles científics. Aquesta base de dades utilitza el nom oficial dels gens de les bases de dades Entrez, Ensembl Gene o l'SNP. <http://medgen.ugent.be/rtpimerdb>

## 13. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Tots els resultats s'expressen com la mitja  $\pm$  SEM. La comparació dels resultats es realitza mitjançant la t de Student-Newman-Keuls de dades no aparallades. Les dades es consideren significatives quan  $* P \leq 0,05$ .



**RESULTATS**

---

---



## RESULTATS

### 1.OBTENCIÓ DE VIRUS ADENOASSOCIATS

Es va obtenir 3 virus adenoassociats (AAV) del serotip 1 en col·laboració amb l'empresa *Amsterdam Molecular Therapeutics* (AMT). Per l'obtenció dels AAVs es va seguir la metodologia descrita per Urabe i col. (Urabe M, 2002) d'obtenció de virus AAVs a gran escala a partir de baculovirus i cèl·lules d'insecte (apartat 3 del material i mètodes). Les preparacions utilitzades per fer els estudis tenien una titulació de  $1 \times 10^{12}$  còpies genòmiques (cg)/ml pel virus AAV-GFP, de  $7.6 \times 10^{11}$  cg/ml pel virus AAV-CPT1A i de  $7.5 \times 10^{11}$  cg/ml pel virus AAV-CPT1AM.

El genoma víric contenia la CPT1A o la CPT1AM (forma de CPT1A insensible al malonil-CoA) de rata o la GFP flanquejats en el seu extrem 5' per una regió promotora específica (EalbAATp) de fetge i en el seu extrem 3' per un estabilitzador (WPRE) transcripcional i un senyal de poliadenilació (figura 1). Ambdues regions estan a la vegada flanquejades per dues seqüències ITR necessàries per l'inserció i replicació del gen d'interès.

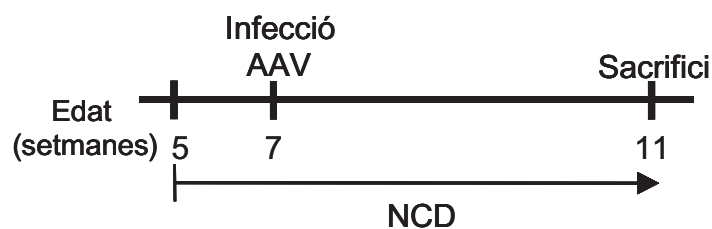


**Figura 1. Diagrama del genoma dels virus adenoassociats.** ITR: (*inverted terminal repeats*) del serotip 2, EalbAATp: promotor específic de fetge, GFP/CPT1A/CPT1AM gens d'interès, WPRE: *woodchuck posttranscriptional regularoty element*, facilita el transport del transcript d'RNA del nucli al citoplasma i bGH: senyal de poliadenilació del gen de la hormona de creixement.



## 2. EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE CPT1A I CPT1AM DE RATA EN FETGE DE RATES ALIMENTADES AMB DIETA CONTROL

Per tal de comprovar la capacitat infectiva dels virus AAVs en fetge de rata es van injectar en la vena de la cua els virus AAV-GFP, com a grup control, el AAV-CPT1A i el AAV-CPT1AM amb una càrrega vírica de  $7,5 \times 10^{11}$ gc/kg, en rates de 7 setmanes d'edat, que correspon en uns 200g de pes aproximadament i alimentades amb dieta control. Al cap de quatre setmanes després de l'administració dels virus es van analitzar els nivells de proteïna i d'activitat CPT1A i CPT1AM en el fetge dels animals tractats després de ser dejunats durant la nit (12h) (figura 2).

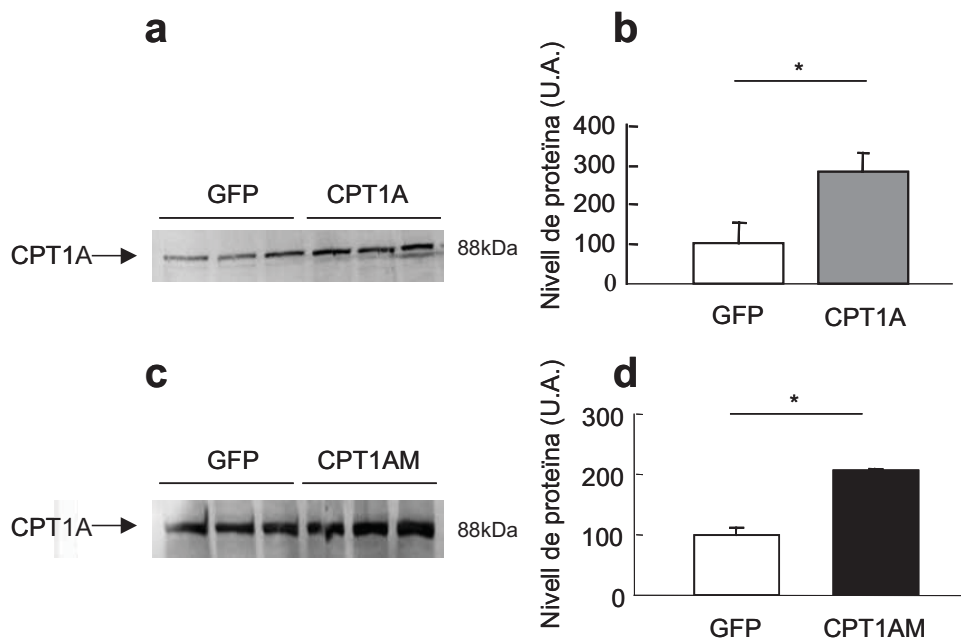


**Figura 2. Diagrama de l'experiment realitzat amb rates Wistar.** Inici de l'experiment, administració dels virus adenoassociats AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM per la vena de la cua a les 7 setmanes d'edat i sacrifici dels animals en dejú a les 11 setmanes d'edat. NCD: *Normal Chow Diet*.

### 2.1. Anàlisi dels nivells de proteïna CPT1

Al cap de 4 setmanes després de l'administració vírica es van analitzar els nivells de proteïna de CPT1A i CPT1AM sobreexpressats en fraccions enriquides amb mitocondris de fetge mitjançant Western Blot. Per la detecció i posterior quantificació es van emprar anticossos específics contra la CPT1A de rata prèviament obtinguts en el nostre laboratori (veure material i mètodes apartat 6.2.4.1).

Com s'observa en la figura 3 els nivells de proteïna de la CPT1A i CPT1AM de rata augmenten significativament en 2,95 i 2,03 vegades respecte els nivells dels animals tractats amb el virus AAV-GFP.

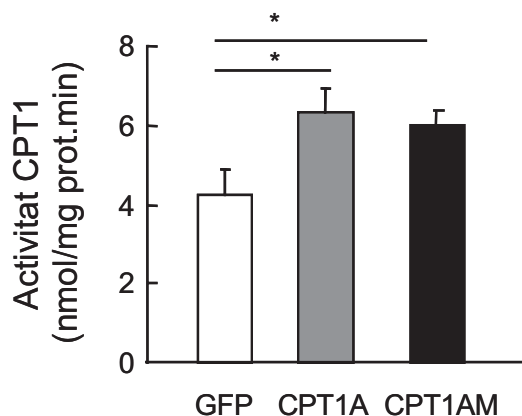


**Figura 3. Anàlisi dels nivells de proteïna de CPT1A per Western Blot** **a)** Western Blot representatiu de fraccions enriquides amb mitocondris (50µg) de fetge de rates infectades amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1A. **b)** Quantificació (U.A.) del Western Blot. **c)** Western Blot representatiu de fraccions enriquides amb mitocondris (50µg) de fetge de rates infectades amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM. **d)** Quantificació (U.A.) del Western Blot. n=5. \*P ≤ 0,05 respecte el grup GFP. Es normalitza prenent el valor de 100 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

## 2.2. Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1

Un cop comprovat l'increment de proteïna es va verificar mitjançant un assaig d'activitat CPT1 si aquest comportava un augment d'activitat CPT1. Per això es va determinar l'activitat CPT1 d'extractes mitocondrials obtinguts de fetge dels animals tractats mitjançant el mètode radiomètric descrit en l'apartat 7.2 del material i mètodes.

Tal com mostra la figura 4 l'activitat CPT1 va augmentar en 1,55 i 1,47 vegades en les rates tractades amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM respecte a les rates tractades amb el virus AAV-GFP.



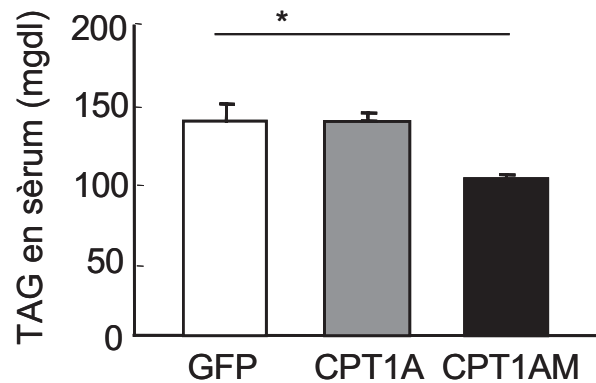
**Figura 4. Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1.** Activitat CPT1 (nmol/mg prot.min) en fraccions mitocondrials (10µg) de fetge de rates infectades amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM. n= 5. \*P ≤ 0,05 respecte el grup GFP.

Dels resultats obtinguts es pot concloure que els vectors vírics preparats presentaven capacitat infectiva i de sobreexpressió de la CPT1A i CPT1AM de rata en el fetge dels animals tractats.

### 2.3 Nivells de TAG en sèrum

Durant la realització d'aquest estudi es va publicar un treball de Stefanovic-Racic, M i col. (Stefanovic-Racic M, 2008) on observà que la sobreexpressió de la CPT1A mitjançant adenovirus en fetge de rata produïa una disminució de TAG en els fetges dels animals. Per això es va analitzar si aquest augment significatiu d'activitat CPT1A en el fetge de les rates infectades amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM afectava als nivells de TAG en sèrum.

Tal i com es mostra en la figura 5 no es van veure canvis significatius en els nivells de TAG en sèrum de rates infectades amb el AAV-CPT1A respecte al grup de rates control, però si que es va observar una disminució significativa del 20,1% en els TAG en sèrum de les rates infectades amb el virus AAV-CPT1AM.

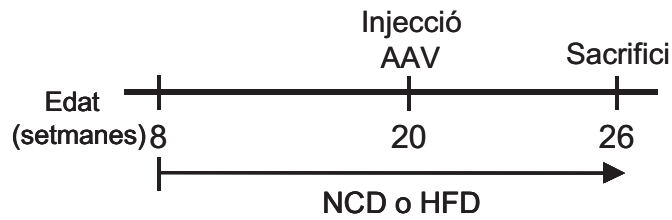


**Figura 5. Anàlisi dels nivells de TAG en sèrum.** Determinació dels nivells de TAG en 10 $\mu$ l de sèrum de les rates infectades amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM. n=3-5. \*P  $\leq$  0,05 respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP.

### 3. EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE CPT1AM DE RATA EN FETGE DE RATES ALIMENTADES AMB DIETA GRASSA I DIETA CONTROL

S'ha descrit que animals alimentats amb una dieta rica en greixos durant un temps aproximat de 12 setmanes presenten desordres metabòlics i acaben desenvolupant hiperglucèmia, hiperinsulinèmia i obesitat (Ding S, 2010). Per tal de comprovar si una sobreexpressió de la forma insensible al malonil-CoA de CPT1 era capaç de revertir aquest fenotip es va realitzar el següent experiment.

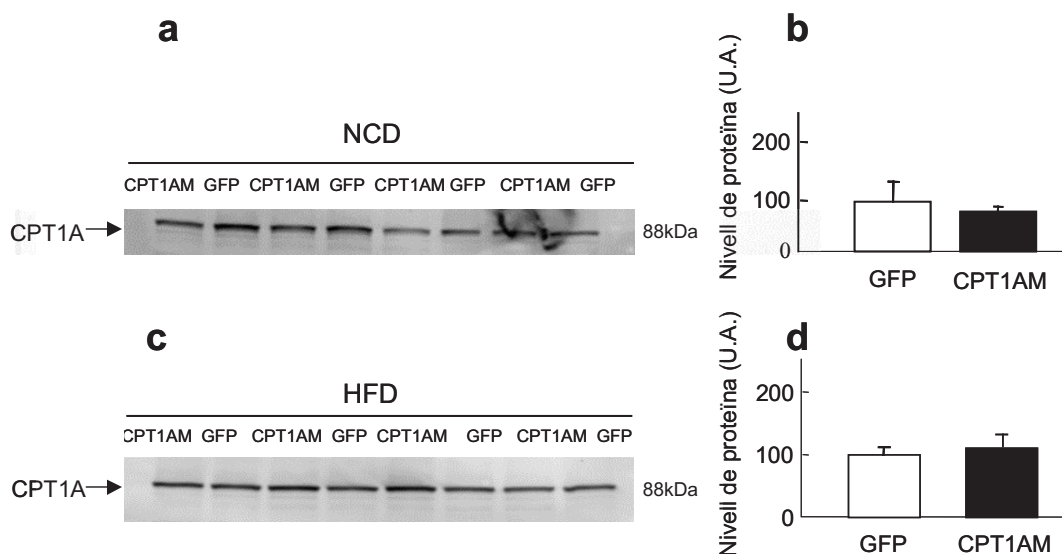
Es va partir de 2 grups de 20 rates, un grup de 20 rates es van alimentar amb una dieta control i l'altre grup de 20 rates es van alimentar amb una dieta grassa (45%). Dins de cada grup es van separar els animals en 10 rates, que van ser tractades amb el virus AAV-GFP com a grup control i en l'altre grup de 10 rates, que van ser tractades amb el virus AAV-CPT1AM. Les dietes es varen administrar a partir de la setmana 8 d'edat i els virus es van injectar a la setmana 20 d'edat (figura 6). Els virus es van injectar en una dosi corresponent a  $1,25 \times 10^{12}$  gc/kg. Durant tot l'experiment es va seguir administrant a cada grup la seva dieta corresponent, es van sacrificar els animals 6 setmanes després de l'administració vírica, que correspon a la setmana 26 d'edat i s'obtingueren els extractes mitocondrials de fetge per tal d'analitzar els nivells de proteïna i d'activitat CPT1A.



**Figura 6. Diagrama de l'experiment amb rates Wistar obeses.** S'especifica l'edat de començament de l'experiment i administració de la dieta corresponent (NCD: *Normal Chow Diet*. HFD: *High Fat Diet*), l'edat d'injecció dels virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM per la vena de la cua i l'edat de sacrifici dels animals.

### 3.1. Anàlisi dels nivells de proteïna CPT1

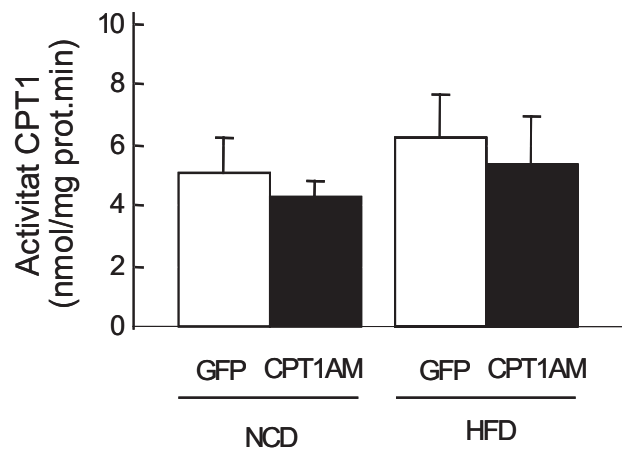
Es van quantificar els nivells de proteïna CPT1A sobreexpressats de les rates tractades amb el virus AAV-CPT1AM tant en el grup alimentat amb dieta control com en el grup alimentat amb dieta grassa (figura 7). El resultat obtingut mostra que no hi ha canvis significatius en els nivells de proteïna CPT1A en les rates tractades amb el virus AAV-CPT1AM alimentades amb ambdues dietes.



**Figura 7. Anàlisi dels nivells de proteïna CPT1A (88kDa) per Western Blot** **a)** Western Blot representatiu de fraccions enriquides amb mitocondris (50µg) de fetge de rates infectades amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM i alimentades amb dieta control. **b)** Quantificació (U.A.) del Western Blot. **c)** Western Blot representatiu de fraccions enriquides amb mitocondris (50µg) de fetge de rates infectades amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM i alimentades amb dieta grassa. **d)** Quantificació (U.A.) del Western Blot.  $n = 7-10$ .  $*P \leq 0,05$  respecte el grup GFP. Es normalitza prenent el valor de 100 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

### 3.2. Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1

A continuació es va determinar l'activitat CPT1 (figura 8). El resultat de l'assaig CPT1 de les rates tractades amb el virus AAV-CPT1AM o GFP és que en totes les mostres analitzades hi ha la mateixa activitat CPT1 i no s'observen canvis significatius.



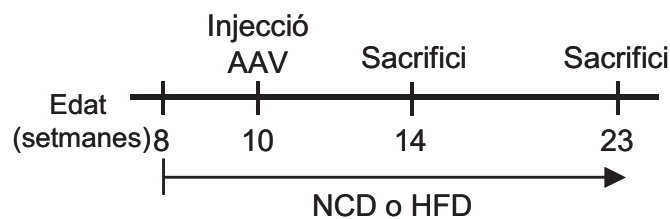
**Figura 8. Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1.** Activitat CPT1 en fraccions mitocondrials (10µg) (nmol/mg prot.min) en els grups GFP i CPT1AM a les 26 setmanes d'edat que correspon a 6 setmanes després de l'administració vírica. n=7-10. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

Aquests resultats en els nivells d'activitat CPT1 concorden perfectament amb els resultats obtinguts de l'anàlisi dels nivells de proteïna CPT1 (figura 7). Per tant es pot concloure que la infecció per part del virus AAV-CPT1AM no ha estat suficient per veure augments d'activitat CPT1.

Dues podrien ser les causes d'aquest resultat: 1) una menor capacitat infectiva dels virus degut a l'edat dels animals (20 setmanes) en aquest segon experiment respecte el primer experiment (7 setmanes) on sí s'observà un augment de l'expressió de CPT1AM. 2) que la dosi administrada fos insuficient tot i haver-la augmentat. Donat que es disposava d'una preparació de virus que no es podia concentrar i per tal de poder augmentar la dosi a administrar es va considerar la utilització del ratolí com animal d'experimentació. Al canviar de rata a ratolí s'incrementà fins a 6 vegades la dosi injectada anteriorment a les rates, aconseguint administrar una dosi de  $7,5 \times 10^{12}$  gc/kg en els ratolins.

#### 4. EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIONIÓ DE CPT1A I CPT1AM DE RATA EN FETGE DE RATOLINS ALIMENTATS AMB DIETA GRASSA I DIETA CONTROL

Per tal de comprovar quin és l'efecte de la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM de rata en el fetge de ratolins alimentats amb dieta grassa es va procedir de la següent manera: es van dividir 2 grans grups d'animals; un grup alimentat amb dieta control i un altre alimentat amb dieta grassa. Dins de cada grup es van separar els animals tractats amb el virus AAV-GFP com a grup control, els que es van tractar amb el virus AAV-CPT1A i els tractats amb el virus AAV-CPT1AM. Les dietes es van començar a administrar a partir de la setmana 8 d'edat i els virus es van administrar a la setmana 10 d'edat (figura 9). Es van injectar els virus a una dosi de  $7,5 \times 10^{12}$  gc/kg. Durant tot l'experiment es va seguir administrant a cada grup la seva dieta corresponent.



**Figura 9. Diagrama de l'experiment amb els ratolins C57BL/6J.** S'especifica l'edat de començament de l'experiment, l'edat d'administració de les dietes corresponents (NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*), l'edat d'injecció dels virus AAV-GFP, AAV-CPT1A o AAV-CPT1AM per la vena de la cua i l'edat de sacrifici dels animals a les 14 o 23 setmanes d'edat que correspon a 4 o 13 setmanes després de l'administració vírica.

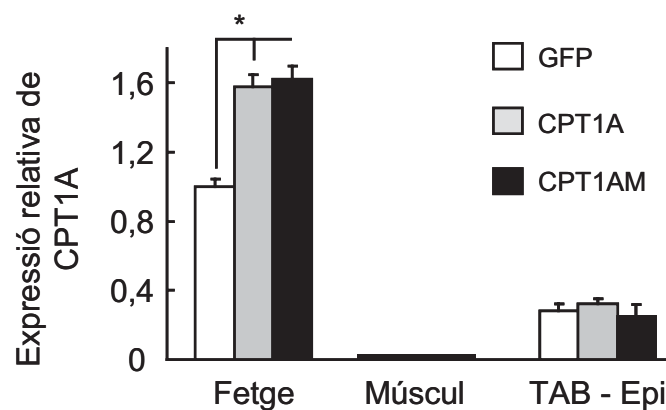
##### 4.1 Anàlisi dels canvis en l'expressió relativa de l'mRNA de CPT1A en diferents teixits

Per tal de comprovar i quantificar els nivells d'mRNA de CPT1A i CPT1AM en el fetge de ratolins infectats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM, es va obtenir l'RNA dels fetges a les 4 setmanes després de l'administració dels virus (figura 10). L'anàlisi es va dur a terme per PCR a temps real utilitzant uns encebadors capaços de detectar alhora la isoforma CPT1A de ratolí i les isoformes CPT1A i CPT1AM de rata. A més, es va estudiar si la infecció dels virus afectava a altres teixits, també determinant i quantificant els nivells d'mRNA de CPT1A i

CPT1AM de rata en el múscul (*gastrocnemius*) i en el teixit adipós blanc epididimal. Els encebadors no detectaven la isoforma CPT1B de múscul.

Els nivells d'mRNA de CPT1A i CPT1AM en fetge van ser 58% i 62% més elevats que els nivells d'mRNA de CPT1A en els ratolins control infectats amb els virus AAV-GFP i alimentats amb dieta grassa.

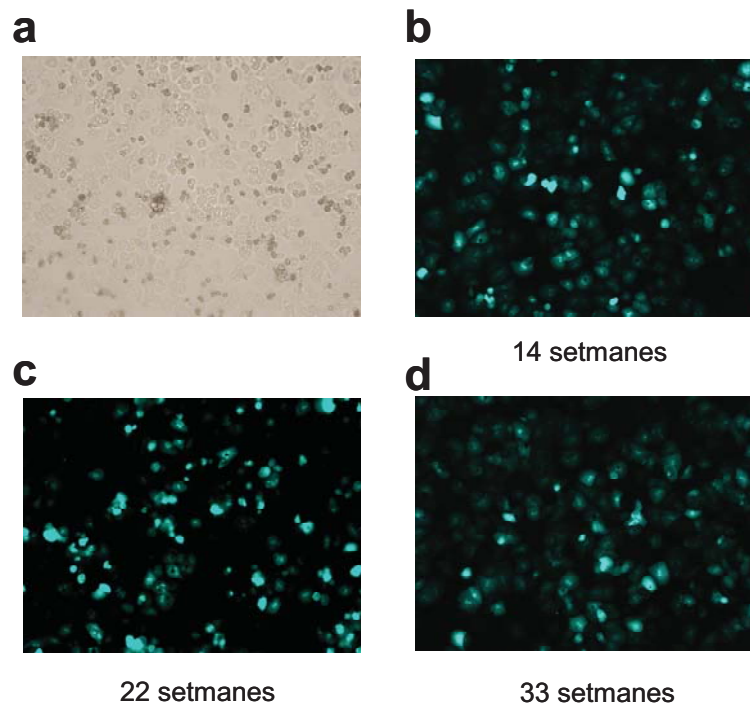
No es van observar diferències significatives en els nivells d'mRNA de CPT1A i CPT1AM de rata en el múscul i en el teixit adipós dels ratolins. Això indicava que l'expressió de CPT1A i CPT1AM estava localitzada i restringida únicament en el fetge tal i com calia esperar.



**Figura 10. Anàlisi dels canvis d'mRNA de CPT1A en diferents teixits de ratolí.** Canvis d'mRNA de la CPT1A en fetge, múscul i teixit adipós blanc epididimal a les 14 setmanes d'edat dels ratolins alimentats amb la dieta grassa i 4 setmanes després de l'administració vírica. n=6-10. \*P ≤ 0,05 respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP. Es normalitza prenent el valor d'1 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

Per tal de determinar el temps en que els virus eren capaços de mantenir l'expressió dels gens estudiats, es va analitzar l'expressió dels virus AAV-GFP a llarg termini. Per això, es van obtenir hepatòcits a les 4, 12 i 23 setmanes després de l'administració del virus AAV-GFP a ratolins de 10 setmanes d'edat. Com s'observa en la figura 11d, l'expressió de GFP a la setmana 33 d'edat dels ratolins encara segueix persistent i amb uns alts nivells d'expressió, indicant que l'expressió es manté al menys al llarg de 6 mesos. També s'aprecia en la figura 11 que l'expressió de GFP es produeix en un 30% dels hepatòcits, aquest fet ens indica que la infecció del virus AAV-GFP té una eficiència aproximada del 30%.



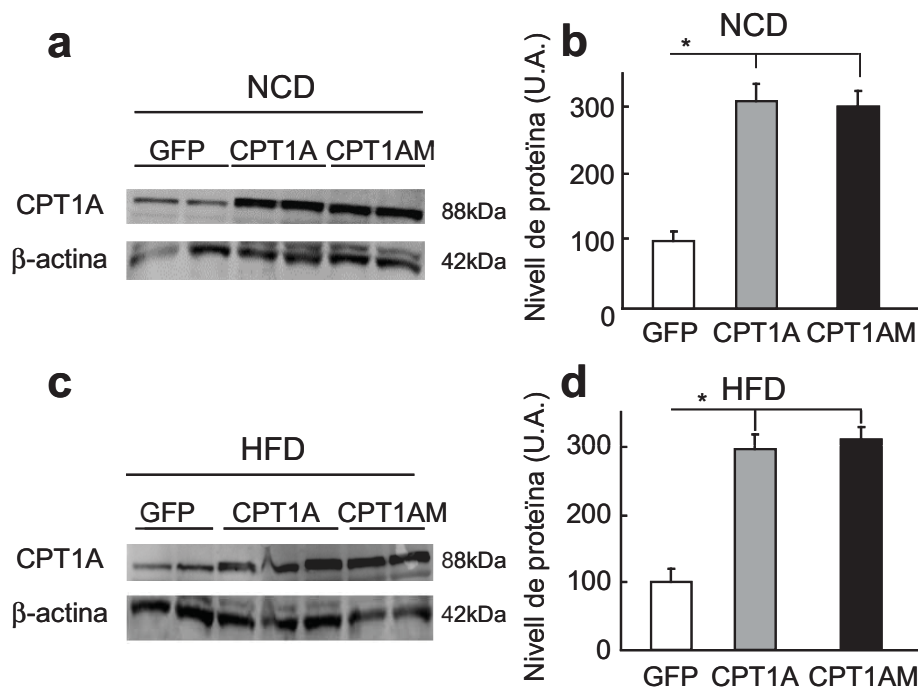


**Figura 11. Anàlisi de l'expressió de GFP al llarg del temps.** a) Hepatòcits de ratolí en cultiu 24h després de ser obtinguts. b,c,d) Hepatòcits de ratolí obtinguts a les 4, 12 i 23 setmanes després de l'administració del virus AAV-GFP a animals de 10 setmanes d'edat i visualitzats al microscopi de fluorescència. Fotografies preses a 20x augments.

#### 4.2. Anàlisi dels nivells de proteïna CPT1

Un cop verificat l'augment dels nivells de l'mRNA de CPT1A i CPT1AM de rata en els fetges dels ratolins infectats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP, es van determinar els nivells de proteïna. Per això es va realitzar un Western Blot de fraccions enriquides amb mitocondris de fetge (figura 12) utilitzant l'anticòs que reconeixia tant la isoforma CPT1A de rata com la isoforma CPT1A de ratolí.

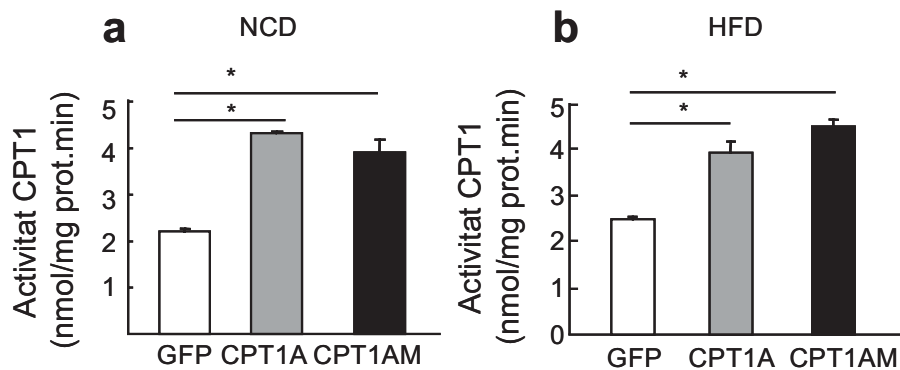
Els nivells de proteïna CPT1A i CPT1AM en els animals amb dieta control presenten uns augments significatius de  $3,08 \pm 0,05$  i  $3,01 \pm 0,08$  vegades respectivament comparat amb els animals tractats amb el virus AAV-GFP. Els nivells de proteïna de CPT1A i CPT1AM en els ratolins alimentats amb dieta grassa es veuen significativament augmentats en  $3,02 \pm 0,09$  i  $3,09 \pm 0,04$  vegades respectivament comparat amb els ratolins que sobreexpressen la GFP i alimentats amb dieta grassa.



**Figura 12. Anàlisi dels nivells de proteïna CPT1A i CPT1AM de rata per Western Blot.** **a)** Western Blot representatiu dels nivells de CPT1A en fraccions enriquides amb mitocondris de fetge (50 $\mu$ g) de ratolins alimentats amb dieta control a les 14 setmanes d'edat i que correspon 4 setmanes després de l'administració vírica. **b)** Quantificació del Western Blot utilitzant com a normalitzador la actina- $\beta$  (42kDa) **c)** Western Blot representatiu dels nivells de CPT1A en fraccions enriquides amb mitocondris de fetge (50 $\mu$ g) de ratolins alimentats amb dieta grassa a les 14 setmanes d'edat i que correspon 4 setmanes després de l'administració vírica. **d)** Quantificació del Western Blot utilitzant com a normalitzador la actina- $\beta$  (42kDa). n=5 \*P  $\leq$  0,05 respecte els animals infectats amb el virus AAV-GFP. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. Es normalitza prenent el valor d'100 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

### 4.3. Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1

Es va determinar l'activitat CPT1 de fraccions enriquides amb mitocondris de fetge de ratolins dejunats que duen 4 setmanes amb els virus corresponents. Tal i com s'observa en la figura 13 l'activitat dels grups tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM es troba incrementada en  $1,95 \pm 0,08$  i  $1,81 \pm 0,16$  vegades respecte el grup tractat amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta control. En el cas dels animals tractats amb dieta grassa i que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM es quantifica un augment d'activitat de  $1,57 \pm 0,21$  i  $1,8 \pm 0,12$  cops respecte els animals injectats amb el virus AAV-GFP.



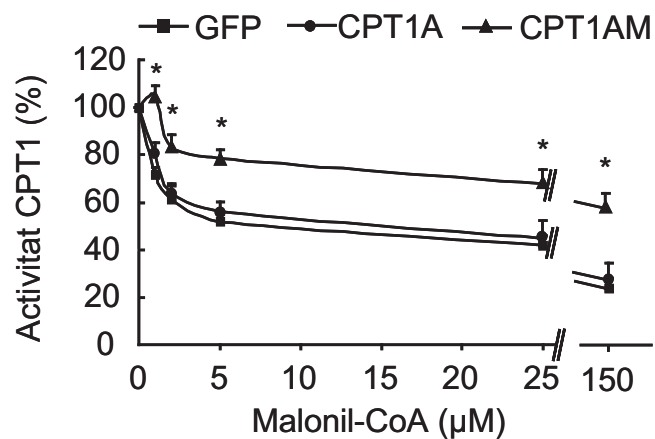
**Figura 13. Anàlisi dels nivells d'activitat CPT1.** a) Activitat CPT1 de fraccions enriquides amb mitocondris de fetge (10 $\mu$ g) d'animals alimentats amb la dieta control i tractats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM. b) Activitat CPT1A de fraccions enriquides amb mitocondris de fetge d'animals alimentats amb la dieta grassa i tractats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM. L'assaig es va realitzar per triplicat i amb una n=5. \*P  $\leq$  0,05 respecte els animals infectats amb el virus AAV-GFP. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

Els resultats obtinguts mostren que els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM són capaços d'augmentar els nivells de proteïna i activitat CPT1A tant en els animals tractats amb dieta control com en els animals tractats amb dieta grassa.

#### 4.3.1 Inhibició de l'activitat CPT1A i CPT1AM per malonil-CoA

El nostre grup, en estudis previs, havia demostrat que l'activitat de CPT1AM no s'inhibeix per malonil-CoA en diferents tipus cel·lulars. Per tal d'avaluar si els ratolins infectats amb els virus que contenien la isoforma mutada de CPT1A (CPT1AM) era també insensible al malonil-CoA, es va analitzar la capacitat d'inhibició del malonil-CoA sobre l'activitat CPT1A. D'aquesta manera, es va determinar l'activitat CPT1A a concentracions creixents de malonil-CoA en fraccions mitocondrials de fetge dels ratolins que duïen 4 setmanes amb els virus injectats (figura 14).

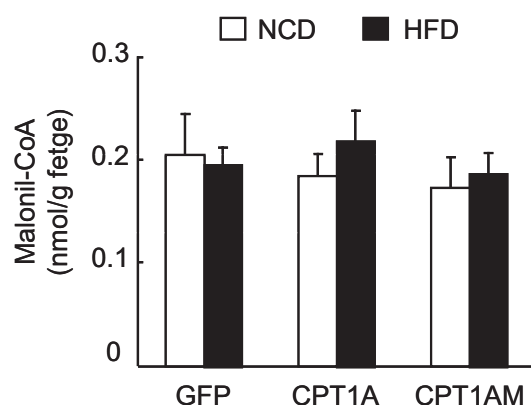
A concentracions fisiològiques de malonil-CoA (1-10 $\mu$ M) l'activitat present en el grup tractat amb el virus AAV-CPT1AM és del 78%, mentre que en el grups tractats amb el virus AAV-CPT1A i AAV-GFP és del 48%. Això significa que els hepatòcits que sobreexpressen la proteïna CPT1AM mostren més activitat CPT1A de forma independent de quins siguin els nivells de malonil-CoA presents.



**Figura 14. Efecte del malonil-CoA sobre l'activitat CPT1.** Activitat CPT1 expressada en % en mitocondris de fetge a concentracions creixents d'1, 2, 5, 25 i 150µM de malonil-CoA. L'assaig es va realitzar per triplicat i amb una n=5. \*P < 0,05 respecte els animals infectats amb el virus AAV-GFP.

A continuació es van determinar i quantificar per HPLC/MS els nivells de malonil-CoA en fetge per cada un dels grups d'animals tractats pel mètode descrit en l'apartat 10.2 del material i mètodes.

En els resultats obtinguts, no es van apreciar diferències significatives en les concentracions de malonil-CoA en fetge entre els animals tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP (figura 15). Aquest resultat s'observa tant en els ratolins alimentats amb dieta control com en els ratolins alimentats amb dieta grassa.



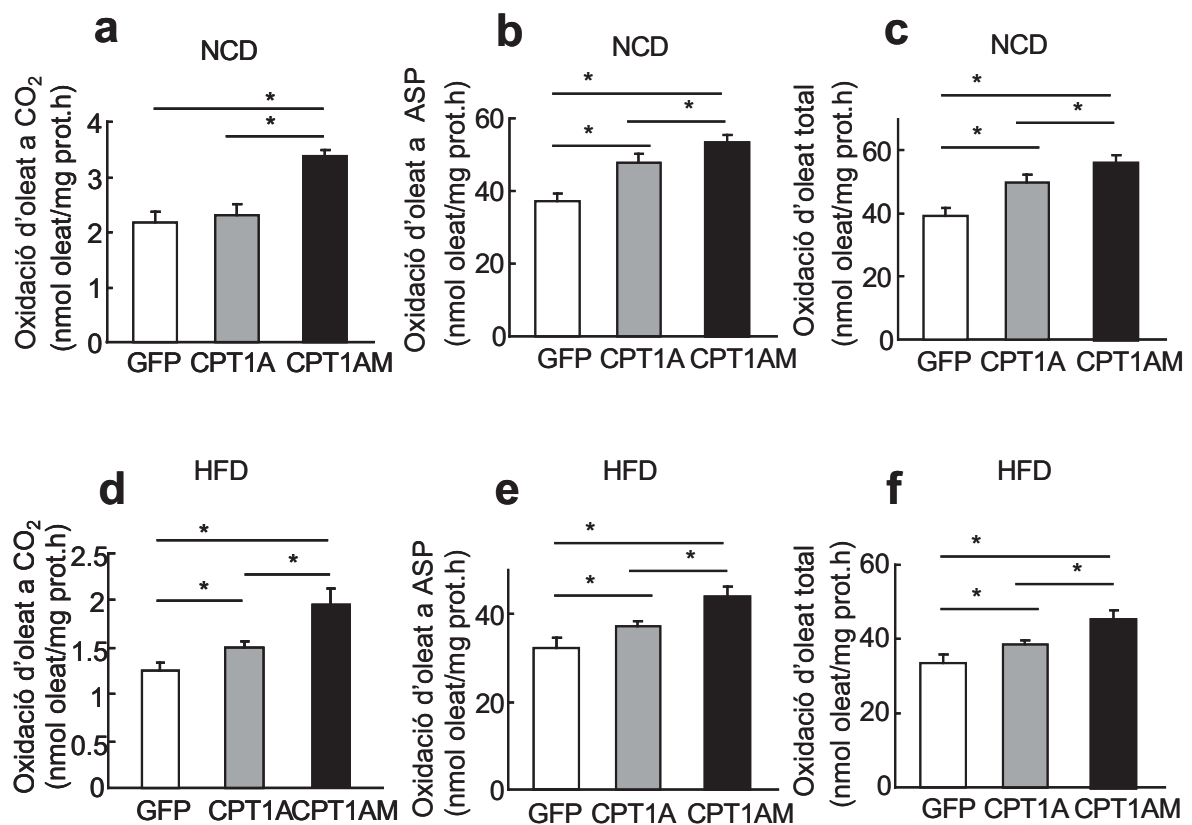
**Figura 15. Anàlisi dels nivells de malonil-CoA en fetge.** La determinació dels nivells de malonil-CoA es va dur a terme mitjançant HPLC/MS pel mètode descrit en material i mètodes. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. n=6-10.

#### 4.4. Anàlisi dels nivells d'oxidació d'àcids grassos

Un cop examinats els augments en els nivells d'mRNA, de proteïna i d'activitat CPT1A es va quantificar el nivell d'oxidació d'àcids grassos que mostren els fetges infectats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM. Per fer-ho es van obtenir cultius primaris d'hepatòcits dels animals alimentats amb dieta control i dels grups d'animals alimentats amb dieta grassa (veure apartat 2 del material i mètodes). L'oleat va ser el substrat utilitzat per analitzar l'oxidació total, l'oxidació a CO<sub>2</sub> i els compostos acidis solubles (ASP) (figura 16).

Els hepatòcits dels animals alimentats amb dieta control i tractats amb els virus AAV-CPT1A no mostren diferències significatives en els nivells de CO<sub>2</sub> respecte els hepatòcits dels animals tractats amb els virus AAV-GFP. En canvi, els hepatòcits dels animals tractats amb els virus AAV-CPT1AM mostren un augment significatiu del 56% en els nivells detectats de CO<sub>2</sub> respecte als hepatòcits dels animals tractats amb el virus AAV-GFP i AAV-CPT1A (figura 16a). Pel que fa la quantificació dels ASP en els hepatòcits dels animals alimentats amb dieta control i tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM es van detectar uns augments del 27,8% i del 42,9% respecte als hepatòcits dels animals que expressen la GFP (figura 16b). L'oxidació d'oleat total dels animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta control es troba incrementada significativament amb un 27% i un 43,6% respecte als hepatòcits dels animals que expressen la GFP (figura 16c).

LA sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM en els animals alimentats amb dieta grassa produeix un augment significatiu del 20,9% i del 56,4% en els nivells de CO<sub>2</sub> mesurats respecte als hepatòcits dels animals que expressen la GFP (figura 16d). En la quantificació dels ASPs es van detectar augments del 15,5% en els hepatòcits dels animals alimentats amb dieta grassa i que expressen la CPT1A i del 35,8% en els hepatòcits dels animals que expressen la CPT1AM respecte als hepatòcits dels animals que expressen la GFP (figura 16e). L'oxidació total d'oleat dels animals que expressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta grassa es troba incrementada significativament amb 15,7% i un 36,6% respecte als hepatòcits dels animals tractats amb el virus AAV-GFP (figura 16f).



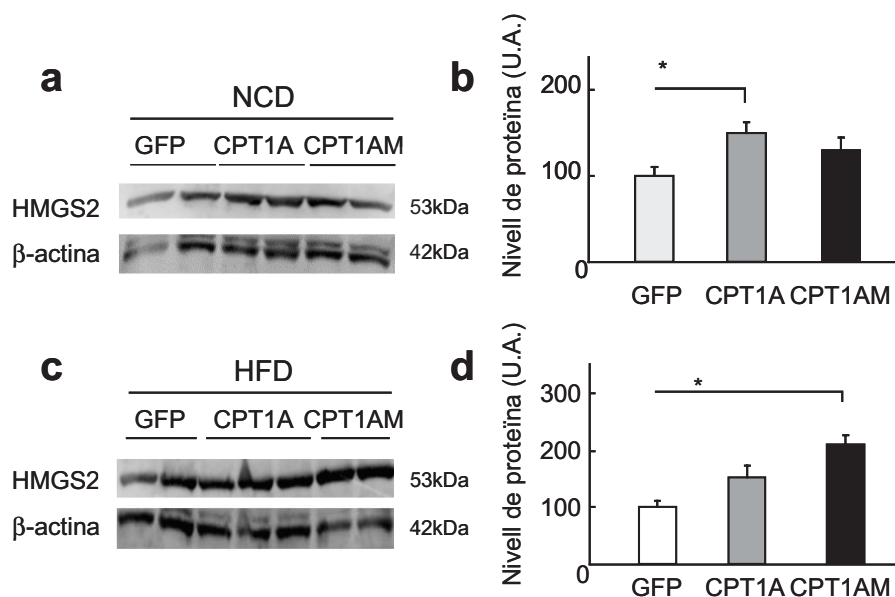
**Figura 16. Anàlisi dels nivells d'oxidació de l'oleat en cultius primaris d'hepatòcits que sobreexpressen CPT1A, CPT1AM i GFP.** **a)** Assaig d'oxidació d'oleat a CO<sub>2</sub> dels animals tractats amb dieta control **b)** Assaig d'oxidació d'oleat a ASP dels animals tractats amb dieta control **c)** Oxidació total d'oleat dels animals tractats amb dieta control **d)** Assaig d'oxidació d'oleat a CO<sub>2</sub> dels animals tractats amb dieta grassa **e)** Assaig d'oxidació d'oleat a ASP dels animals tractats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM amb la dieta grassa **f)** Oxidació total d'oleat dels animals tractats amb dieta grassa. n=3. L'assaig s'ha realitzat per triplicat. \*P < 0,05.

Dels resultats obtinguts s'aprecia que els nivells d'oxidació determinats per la CPT1AM són més elevats que els de CPT1A, ja que l'eficiència de la CPT1AM és major degut a que no respon enfront els nivells de malonil-CoA tal i com s'ha pogut determinar en la figura 14.

#### 4.5. Estudi de la producció de cossos cetònics en fetge i en sèrum

S'ha descrit que una oxidació augmentada d'àcids grassos en el fetge va acompanyada d'un augment en la producció de cossos cetònics per tal d'eliminar els excedents d'acetil-CoA mitocondrial (Askew EW, 1975). Es van analitzar els nivells de proteïna de la HMGS2 (figura 17), que és l'enzim mitocondrial clau de la formació de cossos cetònics i per un altre costat es va quantificar la concentració de cossos cetònics presents en el fetge i en el sèrum dels animals que sobreexpressen CPT1A, CPT1AM i GFP alimentats amb dieta control i amb dieta grassa (figura 18 i 19).

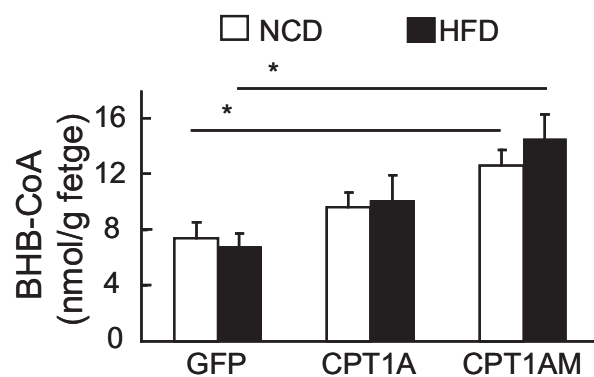
En el cas de la dieta control s'observa un augment significatiu de 1,6 vegades més de proteïna HMGS2 en el grup tractat amb el virus AAV-CPT1A i respecte el seu grup control. En el cas de la dieta grassa s'observa un increment significatiu de 2,1 vegades de proteïna HMGS2 en el grup tractat amb el virus AAV-CPT1AM i respecte el seu grup control.



**Figura 17. Anàlisi dels nivells de proteïna HMGS2 per Western Blot.** **a)** Western Blot representatiu dels nivells de HMGS2 en fraccions enriquides amb mitocondris de fetge a les 14 setmanes d'edat i s'ha utilitzat com a normalitzador la  $\beta$ -actina. **b)** Quantificació del Western Blot utilitzant com a normalitzador la actina- $\beta$  (42kDa). **c)** Western Blot representatiu dels nivells de HMGS2 en fraccions enriquides amb mitocondris de fetge a les 14 setmanes d'edat i s'ha utilitzat com a normalitzador la  $\beta$ -actina. **d)** Quantificació del Western Blot utilitzant com a normalitzador la actina- $\beta$  (42kDa).  $n=5$ . \* $P < 0,05$  respecte els animals infectats amb el virus AAV-GFP. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. Es normalitza prenent el valor d'100 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

A continuació es va analitzar la concentració del  $\beta$ -hidroxibutirat-CoA en fetge mitjançant l'extracció i posterior quantificació per HPLC/MS com una mesura directa dels nivells de cossos cetònics presents en fetge (An J, 2004).

Com ens mostra la figura 18, els nivells de  $\beta$ -hidroxibutirat-CoA del grup CPT1AM dels animals alimentats amb dieta control i amb dieta grassa es troben significativament augmentats en un 65% i un 113% respectivament comparats amb els animals tractats amb el virus AAV-GFP. En els ratolins que sobreexpressen la CPT1A mostren una tendència a l'increment, però no és significativa.

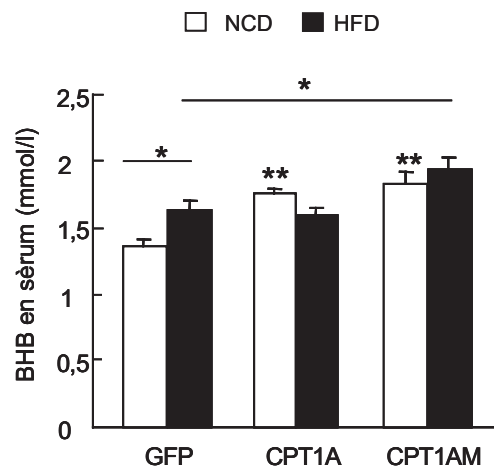


**Figura 18. Anàlisi dels nivells de  $\beta$ -hidroxibutirat-CoA en fetge.** Concentració de  $\beta$ -hidroxibutirat-CoA en fetge quantificat amb HPLC/MS. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet* n=6-10. \*P < 0,05 respecte els animals infectats amb el virus AAV-GFP.

Tot seguit es va analitzar la presència de cossos cetònics en el sèrum dels animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM al cap de 4 setmanes després de l'administració dels virus i en dejú.

Els animals amb dieta control que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM mostren un augment significatiu de 1,24 i 1,3 vegades respecte el grup control GFP (figura 19). Degut a la ingesta de la dieta grassa els nivells de cossos cetònics en sèrum en els ratolins tractats amb el virus AAV-GFP presenten uns nivells augmentats d'1,12 vegades respecte els ratolins GFP amb dieta control. Dins del grup d'animals amb dieta grassa, els que sobreexpressen la CPT1AM mostren un augment significatiu de 1,21 vegades respecte el grup GFP. En canvi, el grup que sobreexpressa la CPT1A no mostra augments significatius en els nivells de cossos cetònics en el sèrum.





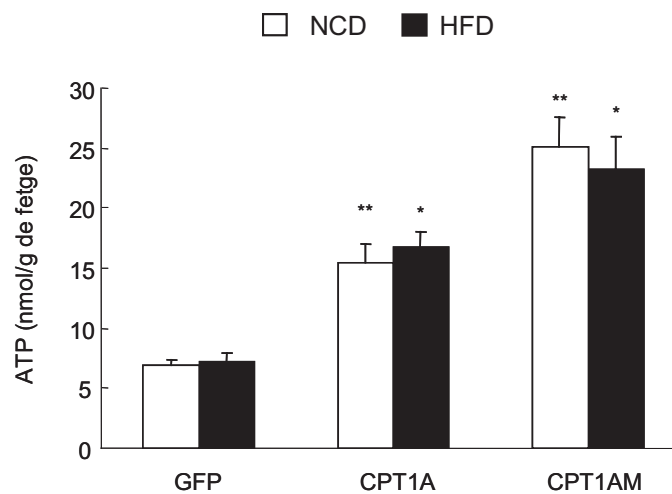
**Figura 19. Anàlisi dels nivells de cossos cetònics en sèrum.** Nivells de cossos cetònics en sèrum (mmol/l). Mesures analitzades a les 14 setmanes d'edat. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet* n=6-10. \* i \*\*P < 0,05.

Aquests resultats es correlacionen directament amb un augment de l'activitat CPT1 i una major capacitat d'oxidació d'oleat en hepatòcits (figura 16) observats en els animals que sobreexpressen la CPT1AM.

#### 4.6. Efecte en la producció d'ATP en el fetge

Com a última fase de la oxidació- $\beta$  els transportadors d'electrons produïts (NADH i FADH<sub>2</sub>) durant l'oxidació dels àcids grassos i durant el cicle de l'àcid cítric per l'oxidació de l'acetil-CoA, donaran els electrons a la cadena respiratòria mitocondrial, on aquests electrons es transportaran cap a l'oxigen amb la fosforilació concomitant de l'ADP a ATP. Així doncs, es va mesurar quins eren els nivells d'ATP formats en els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM (figura 20).

La sobreexpressió de la CPT1A i de la CPT1AM produeix un augment significatiu en la concentració de l'ATP de 2.2 i 3.6 vegades en els animals alimentats amb dieta control i de 2.3 i 3.2 vegades en els animals alimentats amb dieta grassa.



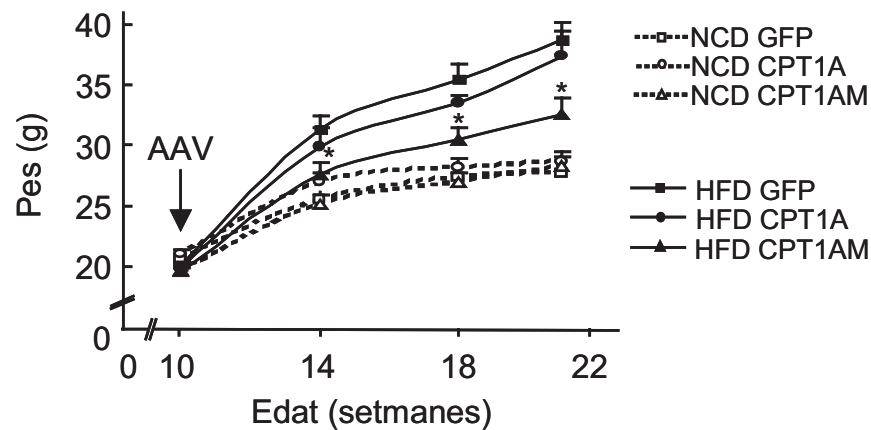
**Figura 20. Anàlisi dels nivells d'ATP en el fetge.** Concentració d'ATP en fetge d'extractes totals de fetges quantificat amb el kit luminescent d'invitrogen a les 14 setmanes d'edat que correspon a 4 setmanes després de l'administració vírica. n=6-10. \*\*P < 0,05 respecte els animals alimentats amb dieta control i tractats amb el virus AAV-GFP. \*P < 0,05 respecte els animals alimentats amb dieta grassa i tractats amb el virus AAV-GFP. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

Els resultats obtinguts concorden perfectament amb els nivells detectats de CO<sub>2</sub> produïts en l'oxidació de l'oleat en hepatòcits (figura 16) i demostra l'augment de l'oxidació degut a la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM de rata en el fetge de ratolins.

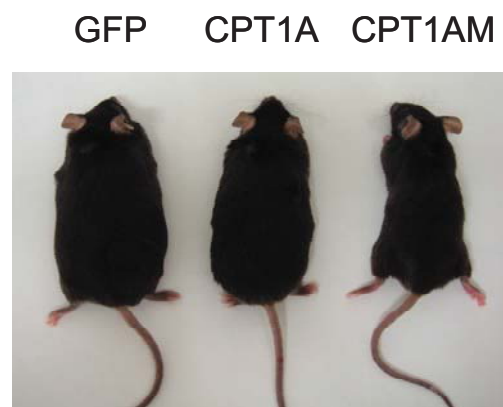
#### 4.7. Efecte de la sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM en el pes

Es va examinar l'evolució del pes dels ratolins infectats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM fins a les 21 setmanes d'edat que correspon a 11 setmanes després de l'administració dels virus. Es va estudiar l'efecte d'un increment en l'oxidació en el fetge tan en els animals alimentats amb dieta control com en els animals alimentats amb la dieta grassa.

Tal i com s'observa a les figures 21 i 22, 11 setmanes després de l'administració dels virus, els ratolins que sobreexpressen la CPT1AM mostren una pèrdua de pes significativa respecte el grup tractat amb el virus AAV-GFP i alimentat amb dieta grassa (GFP: 38.7 ± 1.4 g, CPT1AM: 32.5 ± 1.3g; P < 0.04).



**Figura 21. Anàlisi de l'increment de pes de ratolins que sobreexpressaven la CPT1A, CPT1AM i GFP.** Els ratolins es varen pesar un cop cada 3 setmanes després de la injecció dels virus.  $n=6-10$ .  $*P < 0,05$  respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP amb dieta grassa. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.



**Figura 22. Imatge dels ratolins alimentats amb la dieta grassa.** D'esquerra a dreta un ratolí representant de cada grup d'animals tractats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM alimentats amb dieta grassa a les 21 setmanes d'edat i 11 setmanes després de l'administració vírica.

Els resultats obtinguts mostra que el grup tractat amb els virus AAV-CPT1AM presenta un menor increment de pes que els animals tractats amb el virus AAV-CPT1A i que els animals tractats amb el virus AAV-GFP alimentats amb dieta grassa. Aquests resultats són consistents amb la resta de resultats presentats, ja que els animals tractats amb el virus AAV-CPT1AM mostren una major capacitat d'oxidació (figura 16). Aquesta diferència en el pes no es pot atribuir a diferències en la ingesta, ja que no s'han detectat canvis significatius en la ingesta entre els animals tractats amb els diferents virus amb el mateix tipus de dieta (Taula 1).

	NCD			HFD		
	AAV-GFP	AAV-CPT1A	AAV-CPT1AM	AAV-GFP	AAV-CPT1A	AAV-CPT1AM
Mitja de la ingesta diària (g)	3,43 ±0,14	3,68 ±0,12	3,49 ±0,14	2,72 ±0,15*	2,91 ±0,19	2,52 ±0,13

**Taula 1. Anàlisi de la ingesta diària.** Mitja de la ingesta durant les 8 primeres setmanes de l'experiment. n=6-10. \*P < 0,05 respecte el grup GFP de la dieta grassa. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

Una dada sorprenent és que dintre el grup d'animals alimentats amb la dieta control i tractats amb els diferents virus no es van observar diferències significatives de pes.

#### 4.8 Estudi de l'homeostasi de la glucosa

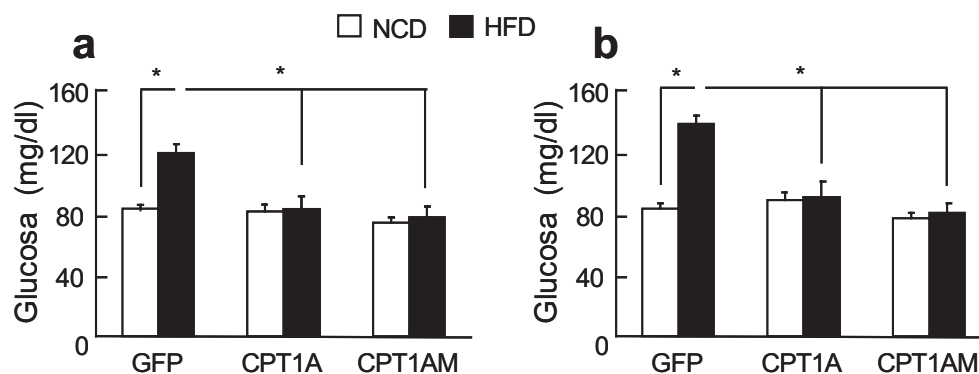
Està descrit que en ratolins sotmesos a dieta grassa durant 2 mesos presenten alteracions en el metabolisme de la glucosa i la insulina. Aquests animals es caracteritzen per ser hiperglucèmics i hiperinsulinèmics (Shoelson SE, 2003). Per tal de veure quin efecte produïa la sobreexpressió de la CPT1A i CPT1AM de rata en aquests animals es va avaluar els nivells sèrics de glucosa en dejú a les 4 i 11 setmanes després d'haver injectat els virus.

Tal i com es mostra en la figura 23a a les 4 setmanes després de l'administració vírica, els animals control infectats amb els virus AAV-GFP i alimentats amb dieta grassa mostren ja un augment significatiu del 46,3% en els nivells de glucosa en sang respecte el grup d'animals tractats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta control. En canvi, els animals infectats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM i alimentats amb dieta grassa, mostren nivells similars als del grup tractat amb els virus AAV-GFP control i alimentat amb dieta control. Indicant que un augment de l'oxidació d'àcids grassos comporta una normalització dels nivells de glucosa tot i estar sotmesos a una ingesta de dieta grassa.

No s'observen canvis significatius en els nivells de glucosa sanguinis en els animals alimentats amb dieta control independentment dels virus injectats.

També es va realitzar el seguiment dels nivells de glucosa sanguínia en dejú a les 11 setmanes després de l'administració dels virus (figura 23b). Els animals control infectats amb els virus AAV-GFP i alimentats amb dieta grassa mostren un augment significatiu del 70,7% en els nivells de glucosa en sang respecte el grup que expressa la GFP i alimentat amb dieta control. En canvi els animals infectats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM i alimentats amb dieta grassa mostren nivells similars als del grup tractat amb el virus AAV-GFP i alimentat amb dieta control.

Cap dels animals alimentats amb dieta control va mostrar variacions en els nivells de glucosa.



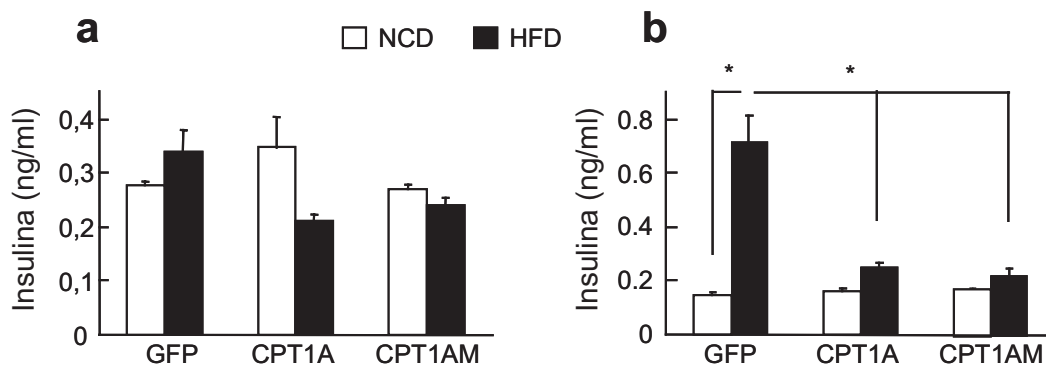
**Figura 23. Anàlisi dels nivells de glucosa en sèrum. a)** Nivells de glucosa en sèrum dels ratolins a les 14 setmanes d'edat. **b)** Nivells de glucosa en sèrum dels ratolins a les 21 setmanes d'edat. n=6-10. \* $P \leq 0,05$  respecte el grup GFP. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

A continuació es van determinar els nivells d'insulina que mostraven els animals en dejú a les 4 i 11 setmanes després de l'administració dels virus.

Els nivells d'insulina analitzats després de 4 setmanes de l'administració vírica no mostren canvis significatius entre els animals tractats amb el virus AAV-GFP alimentats amb dieta grassa i els animals tractats amb el virus AAV-GFP alimentats amb dieta control (figura 24a). Aquests animals només duen 6 setmanes ingerint la dieta grassa, temps insuficient per veure nivells d'insulina incrementats. Tant els ratolins alimentats amb dieta control com en dieta grassa i tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM mostren nivells similars d'insulina que els animals tractats amb el virus AAV-GFP.

En canvi, a les 11 setmanes després de l'administració vírica i 13 setmanes amb dieta grassa, els nivells d'insulina dels ratolins GFP amb dieta grassa es troben

augmentats significativament 3,8 cops respecte el grup tractat amb el virus AAV-GFP i alimentat amb dieta control. Els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM mantenen nivells d'insulina similars als dels animals del grup GFP i alimentats amb dieta control (figura 24b). Tal i com era d'esperar, tenint en compte els resultats en els nivells de glucosa tampoc es van veure canvis significatius en els nivells d'insulina entre els diferents grups alimentats amb dieta control.

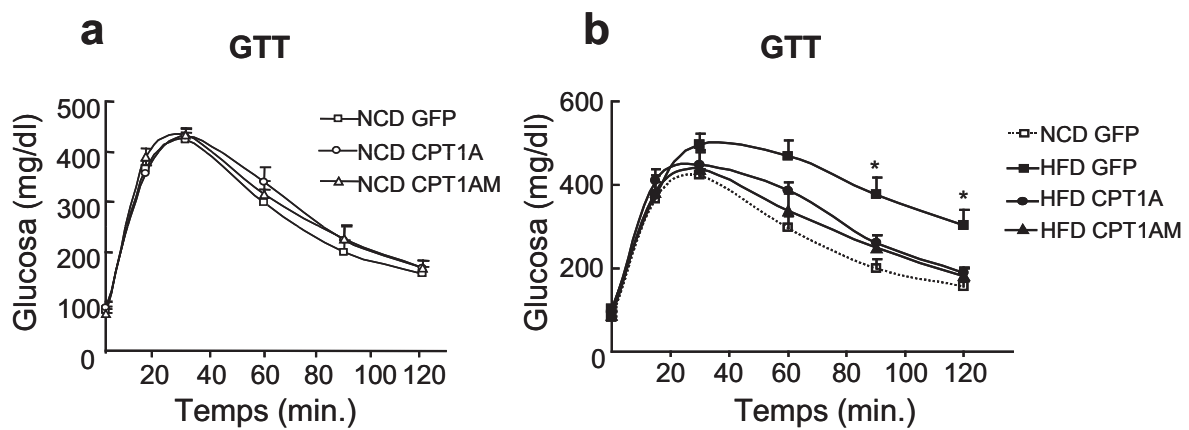


**Figura 24. Anàlisi dels nivells d'insulina en sèrum. a)** Nivells d'insulina en 10 µl sèrum dels ratolins a les 14 setmanes d'edat. **b)** Nivells d'insulina en sèrum dels ratolins a les 21 setmanes d'edat. n=6-10. \*P < 0,05 respecte el grup GFP. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

Seguidament es va realitzar un test de tolerància a la glucosa per comprovar la resposta dels animals tractats en front d'un augment de glucosa en sang mitjançant l'administració d'una solució de glucosa (2g/kg) intraperitoneal en dejú.

En el test de tolerància a la glucosa (figura 25a) s'observa que, entre els animals que ingerien dieta control injectats amb qualsevol dels tres tipus de virus, no existeixen diferències significatives.

Quan s'analitza el GTT dels animals alimentats amb dieta grassa (figura 25b) s'observa que els animals del grup GFP mostren uns nivells de glucosa en sang més elevats significativament als 90 i 120 min. després de la injecció de glucosa intraperitoneal, comparats amb els animals GFP alimentats amb dieta control. En canvi, els ratolins tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM i alimentats amb dieta grassa mostren valors semblants als dels animals GFP alimentats amb dieta control.

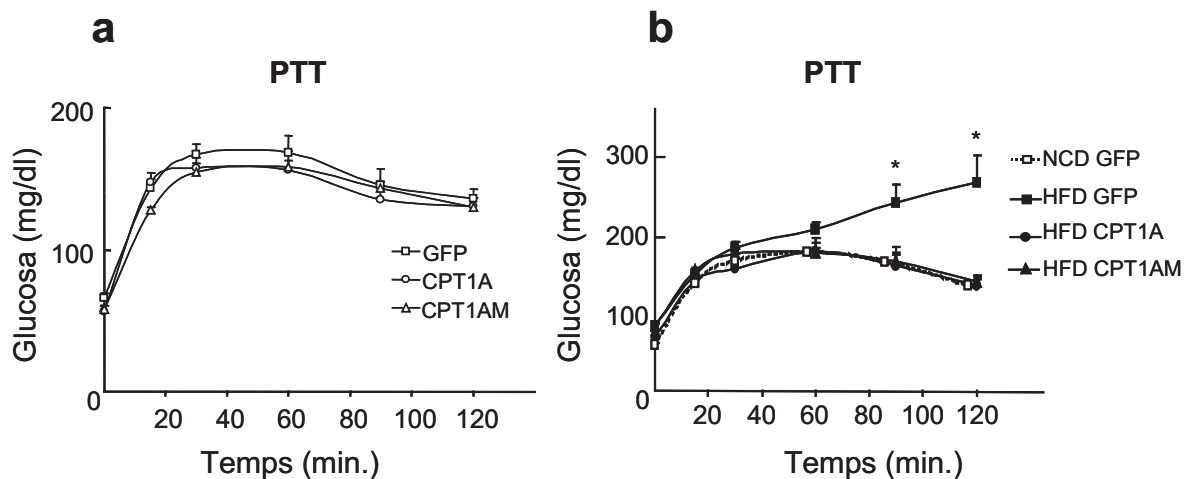


**Figura 25. Test de tolerància a la glucosa (GTT).** A animals dejunats tota la nit se'ls va administrar 2g/kg de glucosa ip. i es van analitzar els nivells de glucosa en sang als 15, 30, 60, 90 i 120 min. n=6-10. \*P ≤ 0,05 respecte el grup GFP NCD. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

Per tal d'analitzar si els augments observats de glucosa eren deguts a una gluconeogènesi augmentada es va realitzar un test de tolerància al piruvat (PTT) mitjançant l'administració intraperitoneal d'una solució de piruvat (2g/kg) en dejú.

Tal i com s'observa en la figura 26a en el PTT entre els animals de la dieta control injectats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM i els animals amb el virus AAV-GFP no existeixen diferències significatives. Els resultats del PTT conjuntament amb el del GTT demostren que una sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM en el fetge de ratolins alimentats amb dieta control no afectarien al metabolisme de la glucosa.

En els animals alimentats amb dieta grassa (figura 26b) el grup GFP mostra uns nivells de glucosa en sang significativament més elevats, als 90 i 120 min. després de l'administració de piruvat intraperitoneal, quan es compara amb els animals GFP alimentats amb dieta control. Concordant amb els resultats del GTT, els animals amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM alimentats amb dieta grassa presenten nivells de glucosa en el PTT similars als dels animals GFP i alimentats amb dieta control.



**Figura 26. Test de tolerància al piruvat (PTT).** A animals dejunats tota la nit se'ls va administrar 2g/kg de piruvat ip. i es van analitzar els nivells de glucosa en sang als 15, 30, 60, 90 i 120 min. n=6-10. \* $P \leq 0,05$  respecte el grup GFP NCD. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

Tots els resultats observats fins ara referents a pes, nivells de glucosa i insulina mostren que els ratolins que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM presenten una millora respecte el seu grup control GFP alimentat amb dieta grassa el qual presenta un fenotip obès i resistent a la insulina.

#### 4.9. Efecte en els nivells de TAG, àcids grassos lliures i leptina en el sèrum

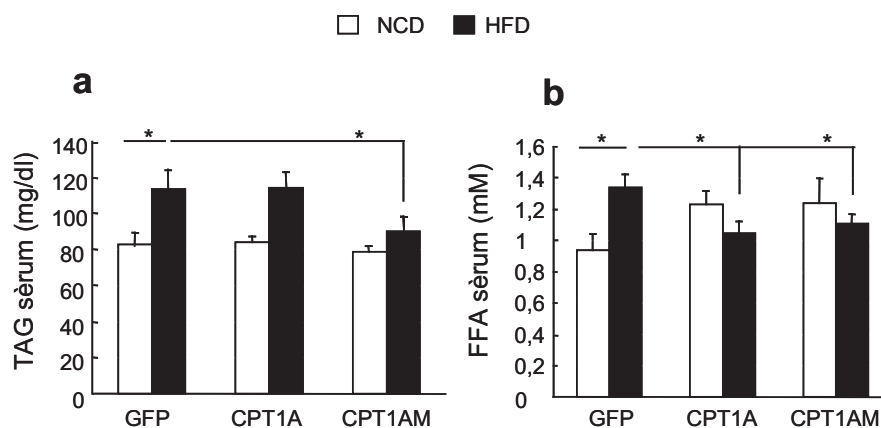
S'ha demostrat que en diferents models d'animals durant la ingesta d'una dieta rica en greixos es veuen augmentats els nivells de FFA i TAG en el sèrum. Per aquest motiu es van determinar els nivells de FFA i TAG en dejú en el sèrum dels animals que portaven 4 setmanes des de la infecció dels virus i 6 setmanes de dieta grassa.

Els resultats obtinguts (figura 27a) respecte als nivells de TAG en sèrum mostren com els animals alimentats amb dieta grassa que expressen la GFP presenten un nivells significativament augmentats del 47,5% respecte als nivells del grup alimentat amb dieta control. Aquests nivells augmentats per la dieta grassa, en el cas dels animals tractats amb el virus AAV-CPT1AM, han disminuït presentant valors molt similars al dels animals GFP i alimentats amb dieta control. Pel que fa als nivells de TAG en sèrum d'animals alimentats amb dieta grassa i tractats amb el virus AAV-CPT1A són molt similars als animals control i en aquest cas, no s'observa una disminució dels nivells de TAG, tal com s'hauria d'esperar. No



s'observen canvis significatius en els nivells de TAG en sèrum entre els diferents grups d'animals alimentats amb dieta control.

Respecte als nivells d'àcids grassos lliures en sèrum (figura 27b), els ratolins tractats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta grassa mostren un augment significatiu del 55,5% respecte els ratolins GFP i alimentats amb dieta control. Els nivells de FFA en sèrum dels animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb la dieta grassa són similars als nivells de FFA dels ratolins GFP alimentats amb dieta control.



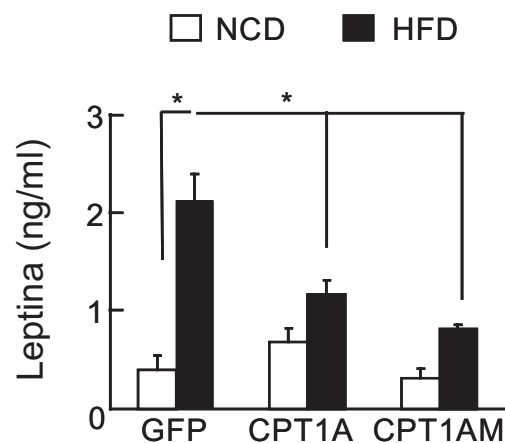
**Figura 27. Anàlisi dels nivells de TAG i FFA en sèrum. a)** Nivells de TAG en sèrum (mg/dl) **b)** Nivells de FFA en sèrum (mM). Mesures analitzades a les 14 setmanes d'edat. n=6-10. \*P < 0,05 respecte el grup GFP. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.

Els resultats mostren una millora significativa dels nivells de TAG i d'àcids grassos lliures en sèrum dels animals tractats amb els virus AAV-CPT1AM i alimentats amb dieta grassa. En canvi, en els animals tractats amb el virus AAV-CPT1A i alimentats amb dieta grassa només mostren una millora en els nivells de FFA en sèrum.

En un estat d'obesitat i de sobrepès l'acumulació de greix per part del teixit adipós incrementa significativament provocant una expansió que acabarà patint una desregulació. La producció de leptina, que és estimulada per la insulina, es veu incrementada amb l'engrandiment dels adipòcits. Per això i tenint en comte els resultats anteriors es va analitzar els nivells de leptina en sèrum dels animals tractats i prèviament dejunats 4 setmanes després de la injecció dels virus.

Com s'observa en la figura 28 els nivells de leptina en sèrum dels ratolins GFP alimentats amb dieta grassa augmenta significativament 7,1 vegades respecte

el grup de ratolins GFP alimentat amb dieta control. Aquests nivells elevats de leptina es van veure reduïts significativament en els grups alimentats amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1A i CPT1AM en 1,8 i 2,6 vegades. Tal i com ja havíem vist en els valors de glucosa i insulina prèviament analitzats no s'aprecien canvis significatius en els nivells de leptina en sèrum entre els diferents grups alimentats amb dieta control.



**Figura 28. Anàlisi dels nivells de leptina en sèrum.** Nivells de leptina en 10µl de sèrum dels animals alimentats amb dieta control i dieta grassa infectats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM a les 14 setmanes d'edat. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. Barres blanques corresponen a la dieta control; Barres negres corresponen a la dieta grassa. n=6-10. \*P ≤ 0,05 respecte el grup GFP.

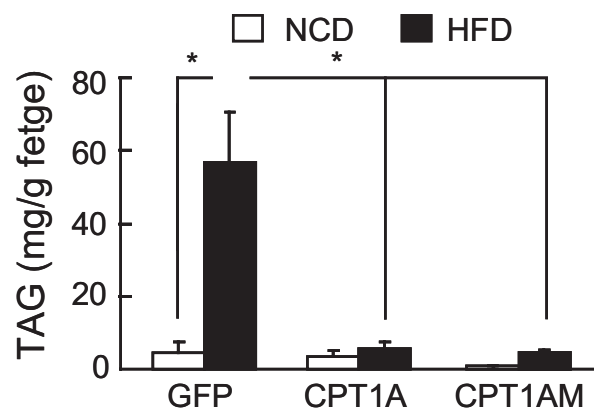
Els resultats obtinguts indiquen que un augment de l'oxidació d'àcids grassos en fetge durant quatre setmanes és suficient per normalitzar els nivells de leptina d'animals sotmesos a dieta grassa.

#### 4.10. Contingut de TAG en fetge

Donat que només amb quatre setmanes del tractament dels virus ja s'observava una disminució dels nivells de FFA i TAG en sèrum, volíem saber si això es veuria reflectit en els nivells de TAG en fetge.

Tal i com es mostra en la figura 29 els nivells de TAG en els fetges dels ratolins amb dieta grassa tractats amb el virus AAV-GFP són 12 vegades més alts que els nivells dels animals GFP alimentats amb dieta control. Per una altra banda, els grups d'animals amb dieta grassa, que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM es troben fortament reduïts respecte els animals GFP alimentats amb dieta grassa i són similars als nivells dels animals que expressen la GFP alimentats amb dieta control.

Curiosament, en els animals tractats i alimentats amb dieta control no existeixen diferències significatives en els seus nivells de TAG en el fetge.



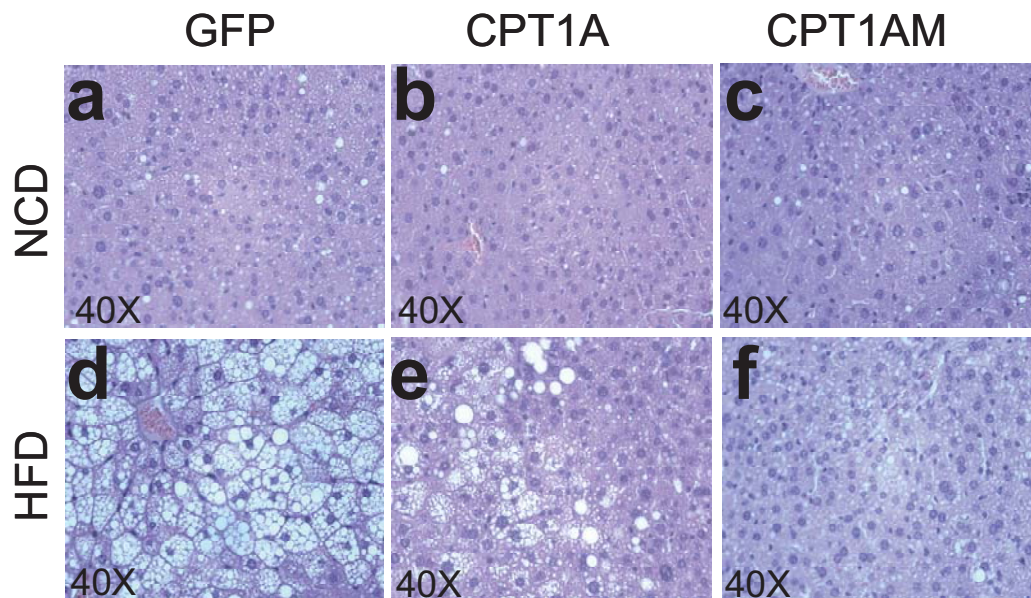
**Figura 29. Anàlisi dels nivells de TAG en fetge.** Nivells de TAG en fetge d'animals alimentats amb dieta control i dieta grassa injectats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM a les 14 setmanes d'edat. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. \*P < 0.05 respecte el grup GFP.

#### 4.11. Estudi histològic del fetge

Per tal de corroborar els resultats obtinguts en els nivells de TAG en fetge es van analitzar histològicament els fetges dels animals al cap de 19 setmanes després d'haver injectat els virus i amb 21 setmanes ingerint la dieta corresponent.

Tal i com s'aprecia en la figura 30d els animals amb dieta grassa tractats amb el virus AAV-GFP mostren clarament una esteatosi severa amb alta acumulació de greixos respecte els animals amb dieta control i tractats amb el mateix virus (figura 30a). Els ratolins amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM mostren una millora significativa respecte al seu grup GFP tal i com es pot veure en la figura (figura 30e i f) el fetge d'aquests animals mostra una disminució considerable de l'acumulació de greixos i del nombre de vacuoles.

A més a més, els ratolins que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta control no presenten canvis significatius en la histologia dels fetges respecte els animals infectats amb el virus AAV-GFP (figura 30a,b i c).



**Figura 30. Anàlisi histològic del fetge. a, b i c)** Imatge representativa de preparacions histològiques del fetge dels ratolins alimentats amb la dieta control i tractats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM. **d, e i f)** Imatge representativa de preparacions histològiques del fetge dels ratolins alimentats amb dieta grassa i tractats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM. Mostres preses a les 29 setmanes d'edat que correspon a 19 setmanes després del tractament amb els virus. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. Tinció amb H&E.

#### 4.12. Estudi del metabolisme hepàtic

L'anàlisi de l'expressió gènica de gens del metabolisme energètic pot ser clau a l'hora d'explicar quins són els mecanismes pels quals un augment de l'oxidació d'àcids grassos en el fetge dels ratolins que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM milloraven el seu fenotip obès. Així, després de 4 setmanes d'haver injectat els virus es van analitzar les alteracions en els nivells d'mRNA de gens hepàtics que podien estar involucrats en la glucoenogènesi, la lipogènesi i la inflamació. En aquest curt període de temps ja s'havien observat canvis en els pesos i en els paràmetres sèrics com nivells de glucosa, TAG, FFA i leptina per causa de la dieta grassa en els animals infectats amb el virus AAV-GFP.

##### 4.12.1 Metabolisme de la glucosa

Està descrit que la ingesta periòdica d'una dieta grassa en ratolins és capaç d'alterar el metabolisme de la glucosa presentant un augment de les vies gluconeogènica i glucolítica (Liao J, 1998). Per tal d'avaluar l'estat d'aquestes vies es va determinar i quantificar els nivells d'mRNA per PCR a temps real de varis

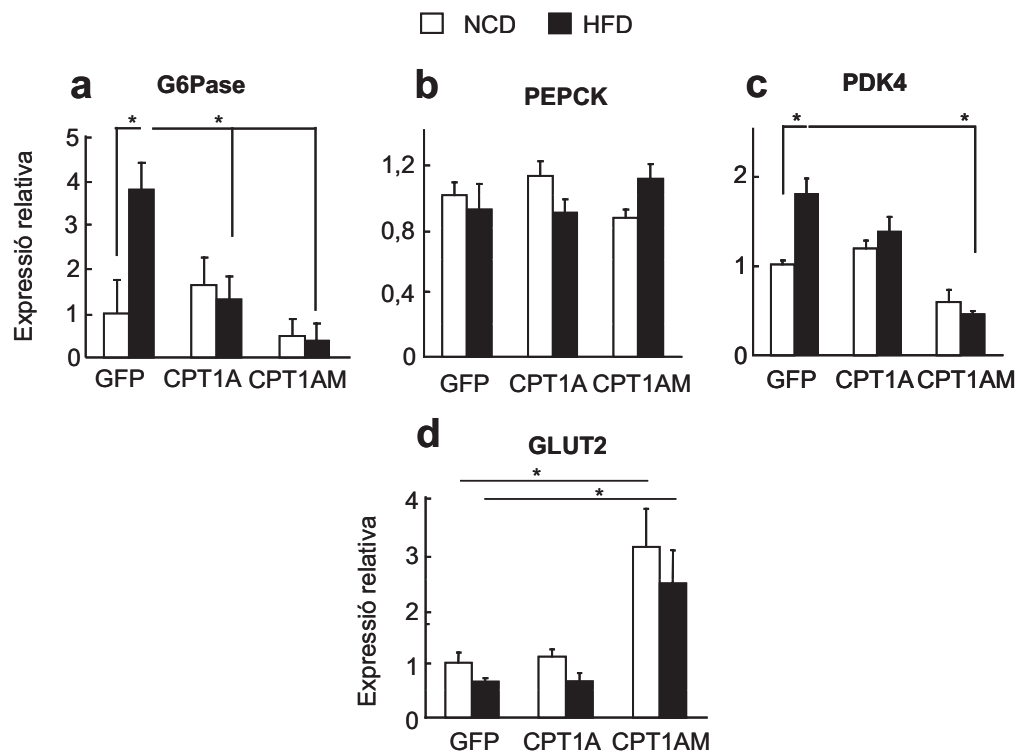
gens com la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) i la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) que són gens claus en les rutes de la gluconeogènesi, així com la quinasa piruvat-deshidrogenasa 4 (PDK4) que és indicatiu de l'estat de la via glucolítica.

En la figura 31 s'observa com el canvi dels nivells d'mRNA de la G6Pasa sota condicions de dieta grassa s'incrementen 3,8 vegades quan es compara els animals tractats amb el virus AAV-GFP (figura 31a). Quan s'analitza els nivells d'mRNA de la G6Pasa dels animals alimentats amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM s'observen valors totalment normalitzats i semblants als nivells dels animals GFP i alimentats amb dieta control. No s'aprecien canvis significatius en els nivells d'mRNA entre els animals alimentats amb dieta control i tractats amb els diferents virus.

Pel que fa a l'altre enzim clau de la ruta gluconeogènica, la PEPCK, en cap cas es va observar canvis significatius en els seus nivells d'mRNA analitzats (figura 31b). Aquest resultat podria ser degut a que en el moment de mesurar els nivells d'mRNA els animals analitzats només duien 6 setmanes de dieta grassa.

Tot seguit es van analitzar els nivells d'mRNA de la PDK-4 com a indicador de l'activitat de la via glucolítica. Aquests es troben 1,85 vegades augmentats degut a la ingesta de dieta grassa en els animals tractats amb el virus AAV-GFP (figura 31c). Els nivells d'mRNA de la PDK-4 dels animals que sobreexpressen la CPT1AM alimentats amb dieta grassa es veuen fortament disminuïts. Aquesta reducció en els nivells d'mRNA de la PDK-4 no és significativa en el grup d'animals amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1A tot i mostrar una tendència a la reducció. No s'observaren canvis significatius en els nivells de mRNA de la PDK-4 entre els animals alimentats amb la dieta control i tractats amb els diferents virus. Tot i que, els nivells d'mRNA de la PDK-4 dels animals que sobreexpressen la CPT1AM alimentats amb dieta control mostren una tendència a disminuir.

Seguidament es van analitzar els nivells d'mRNA del GLUT2 que és el transportador de glucosa majoritari present en el fetge, com a indicador de la captació de glucosa per part del fetge (31d). Sorprenentment, en aquest cas s'observa un augment significatiu en els nivells d'mRNA de GLUT2 en els animals amb dieta control que sobreexpressen la CPT1AM de 3,2 vegades i de 3 vegades en els animals alimentats amb dieta grassa respecte els seus corresponents grups controls tractats amb el virus AAV-GFP.



**Figura 31. Anàlisi per PCR a temps real de l'alteració de diferents gens implicats en el metabolisme de la glucosa.** Es determinaren els nivells d'expressió de **a)** G6Pase. **b)** PDK4 **c)** PEPCK i **d)** GLUT2. L'obtenció de l'RNA i el posterior anàlisi per PCR a temps real es va realitzar tal i com s'indica a material i mètodes NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.  $n=6-10$ . \* $P \leq 0,05$  respecte el grup GFP. Es normalitza prenent el valor d'1 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

Per tant els resultats obtinguts mostren una millora del metabolisme de la glucosa per l'acció dels virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM en condicions de dieta grassa.

#### 4.12.2 Metabolisme lipídic

Una de les principals conseqüències que s'associen a l'obesitat és l'acumulació ectòpica de greixos (Shoelson S, 2007). Una dieta rica en greixos produeix tot una sèrie de canvis en el metabolisme lipídic i per això s'ha volgut estudiar varies vies del metabolisme lipídic com la síntesi d'àcids grassos, síntesi de TAG i exportació de VLDL (figura 32).

S'han estudiat els canvis en els nivells d'mRNA dels gens acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) que catalitzen la formació del malonil-CoA que és el precursor per la formació d'àcids grassos. L'ACC1 és citosòlic i està directament involucrat en

la síntesi d'àcids grassos (McGarry, 1997). L'acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2) també catalitza la formació del malonil-CoA, és mitocondrial i està més involucrada en la inhibició de l'oxidació- $\beta$  mitocondrial (Postic C, 2008). Tal i com s'observa en la figura 32a els nivells d'mRNA de la ACC1 dels animals amb dieta grassa tractats amb el virus AAV-GFP disminueixen en un 40% respecte el grup GFP d'animals amb dieta control. En canvi, els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta grassa mostren totalment restaurats a nivells semblants als del grup tractat amb el virus AAV-GFP alimentat amb dieta control. Entre els nivells de missatgers de l'ACC1 dels diferents grups de dieta control no presenten canvis significatius (figura 32a).

Pel que fa els nivells d'mRNA d'ACC2 entre els animals alimentats amb dieta control no mostren canvis significatius al igual que passava amb els nivells d'ACC1 (figura 31b). En canvi, els nivells d'mRNA d'ACC2 dels animals tractats amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1A alimentats amb dieta grassa es troben un 60% disminuïts respecte els animals control infectats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta control. Sorprenentment els nivells d'mRNA d'ACC2 corresponents als animals que sobreexpressen la CPT1AM alimentats amb dieta grassa es troben totalment normalitzats i no mostren diferències significatives amb els nivells dels animals que expressen la GFP alimentats amb dieta control.

Per un altre costat s'han estudiat els nivells d'mRNA de la desaturasa esteroil-CoA 1 (SCD1) i la diacilglicerol-aciltransferasa 2 (DGAT2) com a indicadors de l'esterificació i la formació de TAG. La SCD1 catalitza la desaturació dels àcids grassos saturats i és l'enzim responsable de la síntesi de nou dels àcids grassos monoinsaturats, mentre que la DGAT2 catalitza l'últim pas per a la síntesi dels TAG.

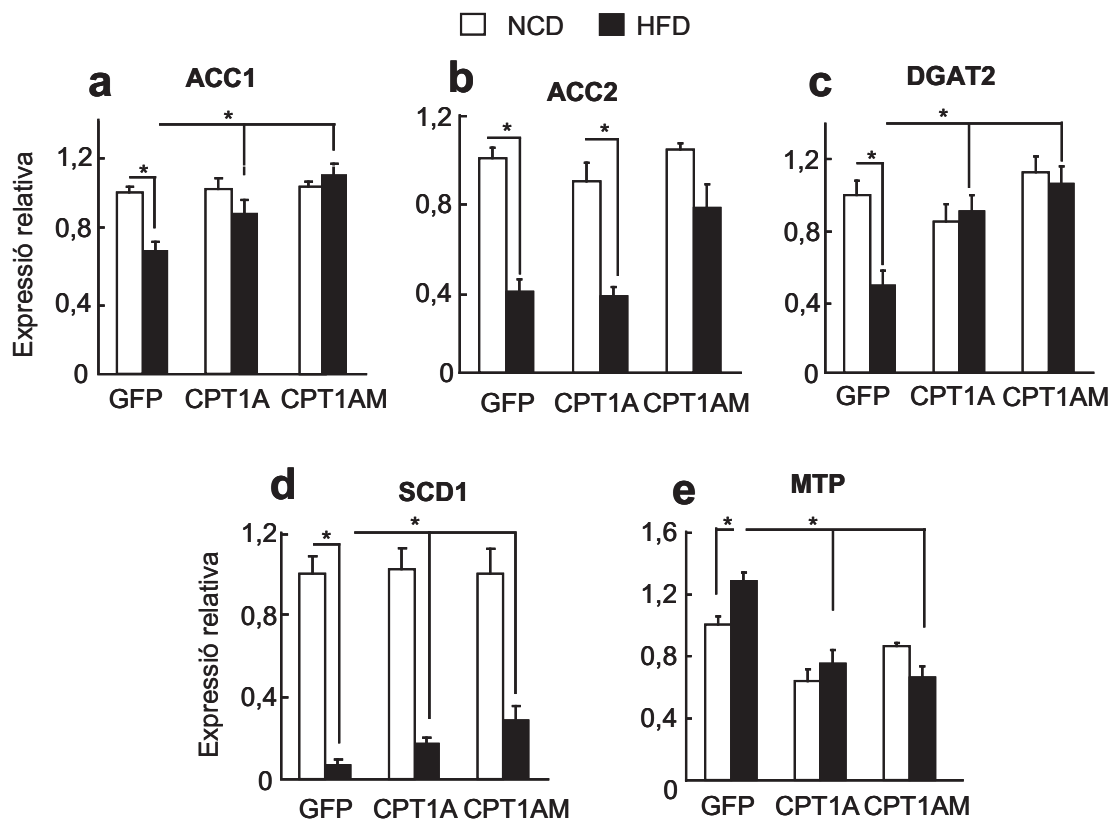
En un estudi de Ntambi JM i col. (Man WC, 2006) proposa que els dos enzims treballarien conjuntament al reticle endoplasmàtic per tal d'augmentar l'eficiència de síntesi dels TAG. Els nivells d'mRNA de la SCD1 en els ratolins tractats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta grassa es troben fortament reduïts en un 92% quan es comparen amb els nivells dels animals infectats amb el mateix virus i alimentats amb dieta control (figura 32d). Aquest resultat està amb acord amb la literatura ja que s'ha descrit que sota una dieta rica en greixos i en una situació de dejú els nivells d'mRNA de la SCD1 es troben fortament disminuïts (Ntambi JM, 2002). Els nivells d'mRNA de SCD1 dels ratolins que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta grassa estan augmentats significativament 2,5 i 4,1 vegades respecte el grup tractats amb el virus AAV-GFP. Tot i trobar-se

significativament augmentats els nivells d'mRNA de la SCD1 no s'arriben a restaurar als nivells dels animals alimentats amb dieta control. Pel que fa els nivells d'mRNA de la SCD1 entre els animals alimentats amb dieta control no mostren canvis significatius.

Com indicador de la via de síntesi de TAG es van analitzar els nivells d'mRNA de la DGAT2 (figura 32c). Tal i com succeeix amb els gens estudiats fins ara respecte el metabolisme lipídic no es mostren diferències en els nivells d'mRNA de la DGAT2 entre els diferents grups d'animals tractats amb els virus i alimentats amb dieta control. Degut a la ingesta de dieta grassa durant 6 setmanes els animals infectats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta grassa mostren uns nivells d'mRNA de la DGAT2 reduïts a la meitat comparat amb els animals infectats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta control. Seguint la mateixa tendència a l'alça de la ACC1 i de la SCD1, els nivells d'mRNA de la DGAT2 dels animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta grassa recuperen els seus nivells d'mRNA de la DGAT2 a valors similars als dels animals alimentats amb dieta control.

L'excés lipídic es pot acumular al fetge en forma de TAG o s'exporten a la sang en forma de VLDL. Per tal d'avaluar l'exportació de VLDL per part del fetge es van analitzar els nivells d'mRNA de la proteïna de transport de TAG microsomal (MTP), proteïna necessària per la formació i secreció de la ApoB. Tal i com es mostra en la figura 32e els nivells d'mRNA de la MTP dels animals que expressen la GFP alimentats amb dieta grassa es troben un 18% augmentats respecte el grup d'animals tractats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta control tal i com era d'esperar en animals tractats amb dieta grassa. Els nivells d'mRNA de la MTP dels animals infectats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM alimentats amb dieta grassa es troben reduïts significativament mostrant nivells similars als dels animals tractats amb dieta control. Un cop més, no s'han quantificat canvis significatius en els nivells d'mRNA de la MTP entre els animals infectats amb els diferents tipus de virus i alimentats amb dieta control.





**Figura 32. Anàlisi per PCR a temps real de l'alteració de diferents gens implicats en el metabolisme lipídic.** Es determinaren els nivells d'expressió de **a) ACC1, b) ACC2, c) DGAT2, d) SCD1** i **e) MTP**. L'obtenció de l'RNA i el posterior anàlisi per PCR a temps real es va realitzar tal i com s'indica a material i mètodes NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*.  $n=6-10$ . \* $P \leq 0,05$  respecte el grup GFP. Es normalitza prenent el valor d'1 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

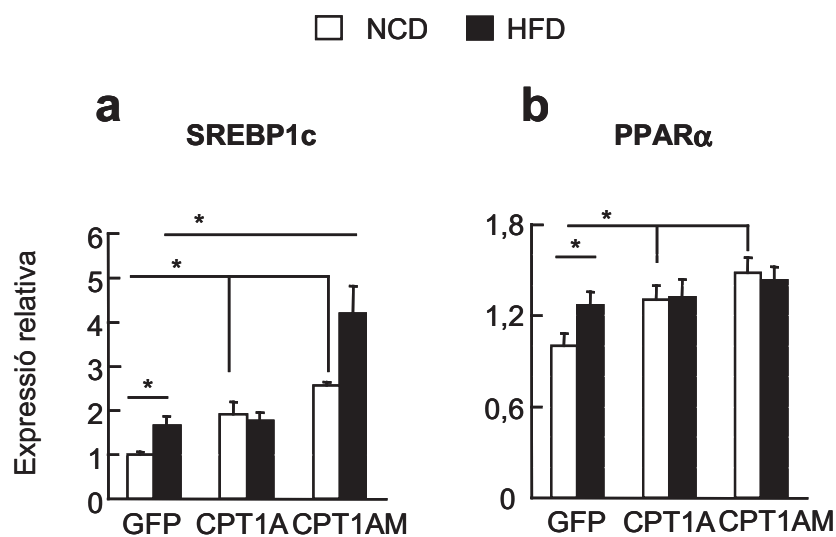
#### 4.12.3 Anàlisi de factors de transcripció involucrats en la síntesi i oxidació d'àcids grassos

S'ha descrit que una sèrie de factors de transcripció com el SREBP1c i PPAR $\alpha$  juguen un paper crucial en el metabolisme lipídic en el fetge i són capaços d'activar l'expressió de gens involucrats en la síntesi lipídica i en l'oxidació d'àcids grassos (Horton JD, 2003 i Yoon M, 2009). Per això, es va creure convenient analitzar els nivells de missatgers de SREBP1c i PPAR $\alpha$  en el fetge dels animals tractats.

Quan es sobreexpressa la CPT1A i la CPT1AM en animals alimentats amb dieta control, els nivells d'mRNA de SREBP1c augmenten significativament 1,9 i 2,1 vegades respecte els animals que expressen la GFP (figura 33a). Aquest efecte es veu incrementat en el cas dels animals que sobreexpressen la CPT1AM tractats amb

dieta grassa els quals augmenten els seus nivells fins a 4,1 vegades. Degut a la ingesta de dieta grassa els animals que expressen la GFP augmenten els seus nivells d'mRNA de SREBP1c 1,8 vegades respecte els animals alimentats amb dieta control. En els animals que sobreexpressen la CPT1A tractats amb dieta grassa no mostren canvis significatius en els seus nivells d'mRNA de SREBP1c respecte el grup que expressa la GFP alimentat amb dieta grassa.

En ratolins que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta control mostren uns nivells d'mRNA de PPAR $\alpha$  significativament augmentats 1,3 i 1,5 vegades respecte el grup infectat amb el virus AAV-GFP alimentat amb dieta control (figura 33b). Respecte els animals tractats amb dieta grassa no es veuen diferències significatives entre els diferents grups d'animals. Tot i això en els animals infectats amb el virus AAV-GFP alimentats amb dieta grassa mostren uns nivells d'mRNA de PPAR de 1,3 vegades augmentats respecte el grup que expressa la GFP alimentats amb dieta control. Tots aquests resultats són significatius, però en tots els casos el percentatge de canvi és molt petit.



**Figura 33. Anàlisi per PCR a temps real de l'alteració de diferents factors de transcripció implicats en el metabolisme lipídic.** Es determinaren els nivells d'expressió de a) SREBP1c i b) PPAR $\alpha$ . L'obtenció de l'RNA i el posterior anàlisi per PCR a temps real es va realitzar tal i com s'indica a material i mètodes NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. n=6-10. \*P  $\leq$  0,05 respecte el grup GFP. Es normalitza prenent el valor d'1 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

#### 4.12.4 Anàlisi de gens relacionats amb la inflamació

L'acumulació de greix en excés en el fetge associada a l'obesitat s'ha relacionat directament amb una inflamació crònica i moderada del fetge i del teixit adipós (Shoelson SE, 2007). Per aquest motiu, s'han mesurat els nivells d'mRNA d'alguns marcadors proinflamatoris per poder esbrinar el paper de la inflamació en la millora del fenotip obès dels ratolins que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM de rata. Aquests resultats es van analitzar 4 setmanes després de l'administració vírica i en dejú (figura 34).

Primer es van analitzar els nivells d'mRNA de les citoquines proinflamatòries TNF $\alpha$ , IL6 i IL-1 $\beta$  com indicadors de l'estat d'inflamació present en el fetge.

La dieta grassa produeix un increment dels nivells d'mRNA del TNF $\alpha$  de 1,5 vegades respecte els animals alimentats amb dieta control i tractats amb el virus AAV-GFP (figura 34a). Els animals amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM retornen els seus nivells a valors semblants dels animals amb dieta control. A més a més, la sobreexpressió de CPT1A i de CPT1AM no afecta als nivells de missatgers del TNF $\alpha$  en els animals amb dieta control.

De la mateixa manera i degut a la ingesta de dieta grassa els animals infectats amb el virus AAV-GFP presenten un augment significatiu de 2,3 vegades respecte els animals amb dieta control. Sobta que la sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM en condicions de dieta control respecte els nivells d'mRNA de la IL-6 tendeixen a augmentar, però no és significatiu (figura 34b). Contràriament en aquest resultat, els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM en condicions de dieta grassa normalitzen els seus nivells de missatgers de IL-6 a valors similars dels animals amb dieta control i tractats amb el virus AAV-GFP.

Un paràmetre més analitzat i indicador de l'estat inflamatori del fetge són els nivells de missatgers de l'IL-1 $\beta$ . Curiosament, els nivells d'mRNA de la IL-1 $\beta$  presents en els animals alimentats amb dieta control són molt semblants als resultats obtinguts en el cas de la IL-6 (figura 34c). On l'administració dels virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM provocaria una tendència a l'augment dels missatgers de la IL-1 $\beta$ , però aquesta no seria significativa. El consum diari de dieta grassa provoca en els ratolins tractats amb els virus AAV-GFP un augment de gairebé 5 vegades respecte els animals amb dieta control. Gràcies a l'administració dels virus

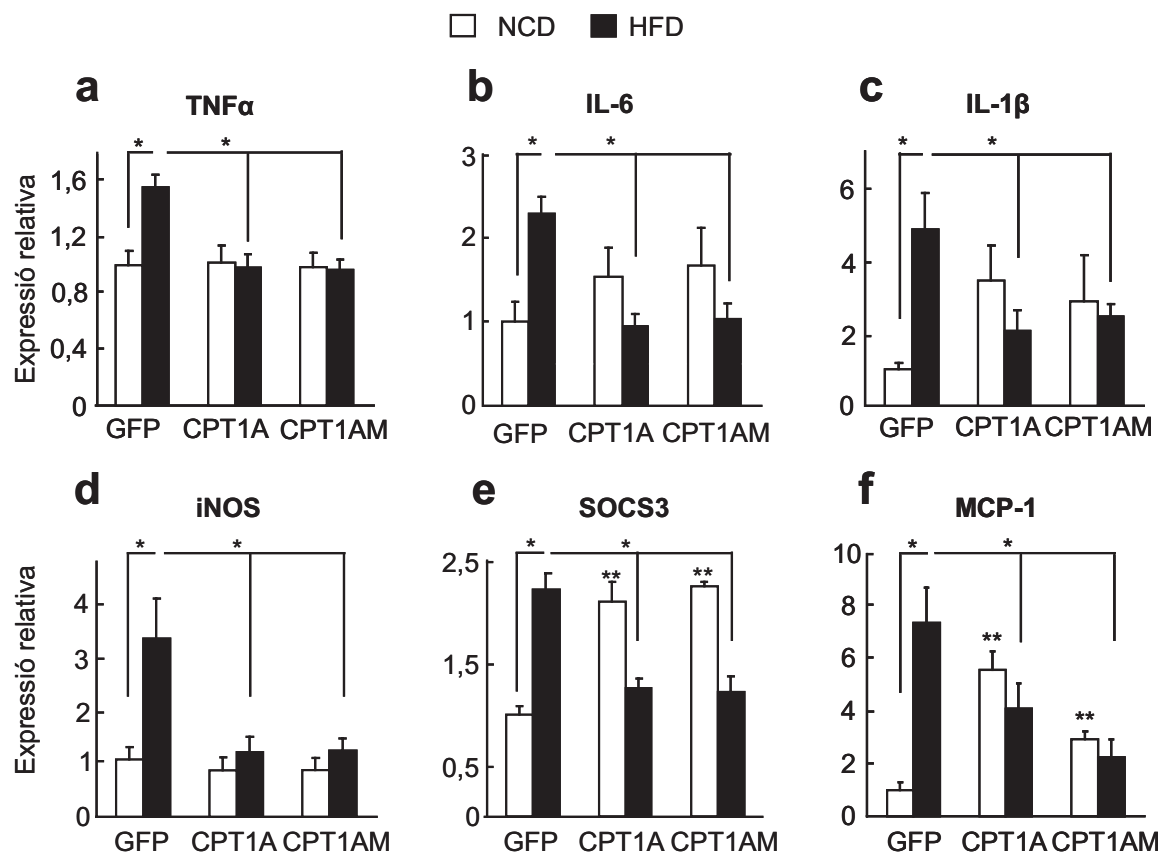
AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM els animals amb dieta grassa frenen aquesta pujada a la meitat respecte els animals que expressen la GFP alimentats amb dieta grassa.

Un important indicador de l'estat d'inflamació en el fetge són els nivells d'mRNA de la isoforma de la NO sintasa (iNOS) produïda per macròfags i neutròfils (figura 34d). Per això també es van obtenir dades sobre els possibles canvis que hagués pogut patir en els seus nivells de missatgers degut a l'acció conjunta de la dieta i dels virus injectats. En aquest cas la sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM no alteraria en cap cas els nivells d'mRNA de iNOS. En canvi la ingesta diària de dieta grassa durant 6 setmanes augmentaria els nivells de missatgers 3,2 vegades respecte els valors dels animals alimentats amb dieta control.

Seguidament es van analitzar els nivells d'mRNA de la proteïna SOCS3 (*supressor of cytokines signalling*) (figura 34e) encarregada de frenar la senyal d'inflamació induïda per algunes citoquines com el TNF $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$ . A més a més s'ha descrit que és un potent inhibidor de la cascada de senyalització de la insulina mitjançant la inhibició de la fosforilació de IRS-1 (Krebs D, 2003). Tal i com s'observa en la figura 33e els nivells d'mRNA del ratolins que expressen la GFP alimentats amb dieta grassa es troben 2,3 vegades augmentats respecte els ratolins alimentats amb dieta control i tractats amb el virus AAV-GFP. Aquests augments es troben totalment revertits en els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM amb dieta grassa. Al revés del que es podria esperar, els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta control mostren uns nivells augmentats d'mRNA de 2 i 2,3 vegades respecte el seu grup control i tractat amb el virus AAV-GFP.

Finalment es van analitzar els nivells d'mRNA de la MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) (figura 34f). Aquesta proteïna és excretada per macròfags en varis tipus de patologies que impliquen un estat crònic d'inflamació. Alts nivells de TNF $\alpha$  i de leptina també incrementen la seva síntesi (Gil A, 2007). Degut a l'estat d'obesitat i sobrepès ja presents en els ratolins alimentats amb dieta grassa i infectats amb els virus AAV-GFP, presenten uns nivells augmentats d'mRNA de MCP-1 de 7,6 vegades respecte el grup d'animals alimentat amb dieta control i que expressen la GFP. La sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM en condicions de dieta control té un efecte activador sobre els nivells de missatgers de la MCP-1 de 5,8 i 3,4 vegades respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP alimentat amb dieta control. S'obté un efecte totalment contrari en aquest quan la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM es realitza en els animals alimentats amb

dieta grassa on els nivells d'mRNA de la MCP1 disminueixen 1,9 i 3,8 vegades respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP alimentats amb dieta grassa.



**Figura 34. Anàlisi per PCR a temps real de l'alteració de diferents gens implicats en l'estudi de la inflamació.** Es determinaren els nivells d'expressió de **a)** TNF, **b)** IL-6 **c)** IL-1 $\beta$ , **d)** iNOS, **e)** SOCS3 i **f)** MTP. L'obtenció de l'RNA i el posterior anàlisi per PCR a temps real es va realitzar tal i com s'indica a material i mètodes NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. n=6-10. \*P  $\leq$  0,05 respecte el grup GFP. Es normalitza prenent el valor d'1 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

De tots els resultats obtinguts es pot concloure que l'augment de la  $\beta$ -oxidació en fetge proporcionat per una sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM de rata redueix l'estrès inflamatori del fetge associat a l'obesitat.

#### 4.13. Anàlisi de l'estrès oxidatiu

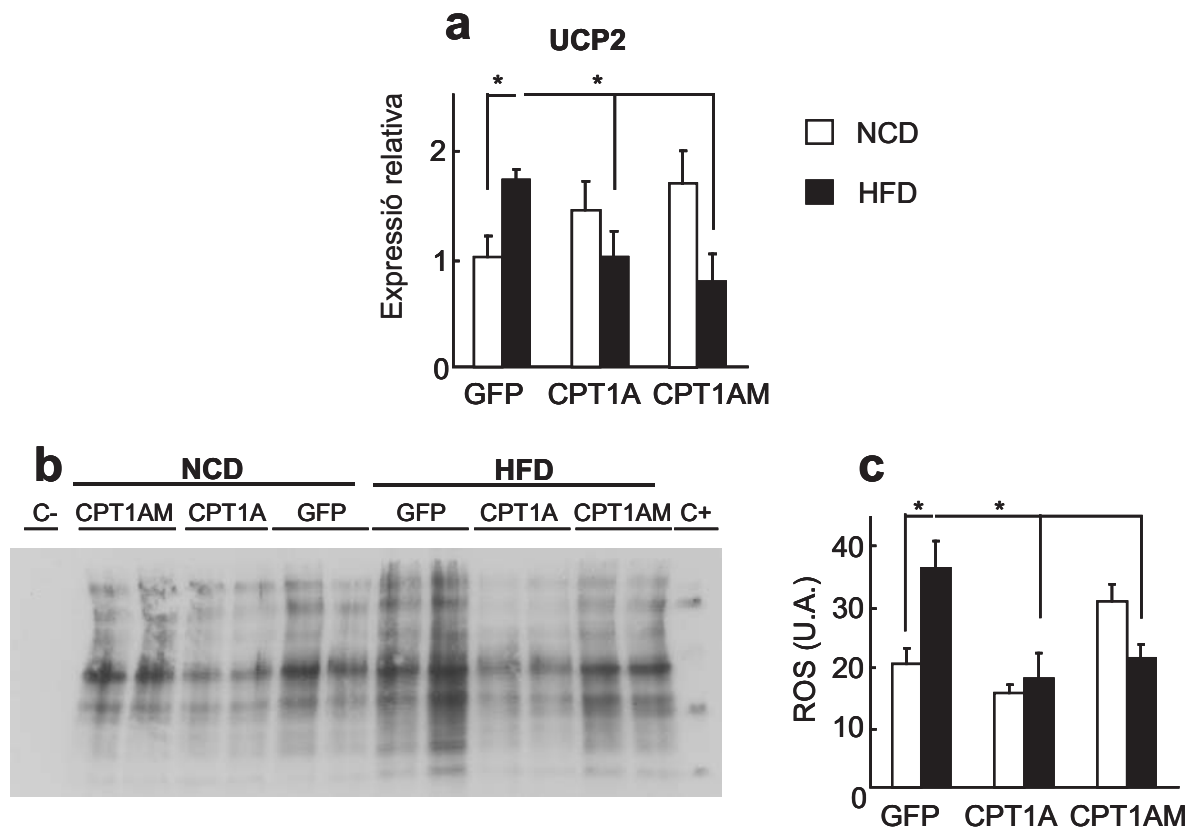
Un excés d'acumulació de greix en el teixit adipós incrementa l'expressió dels nivells d'mRNA del TNF $\alpha$  i altres citocines proinflamatòries. Aquest quan arriba al fetge activa les cèl·lules de Kupffer que afavoreixen la producció de ROS en el fetge (Furukawa S, 2004). A més s'ha descrit que un augment de la oxidació- $\beta$  en el fetge pot comportar un augment en el transport d'electrons en la cadena

respiratòria i augmentar la posterior formació de peròxids responsables de causar un dany mitocondrial responsable d'incrementar els nivells de ROS (Pessayre D, 2002). També l'acumulació tòxica de substàncies com ceramides i DAG (Summers, 2006) i l'hipoxia (Hosogai N, 2007) indueixen la producció de ROS. Un altre factor clau associat a un augment en els nivells de ROS en el fetge és també l'increment en els nivells de UCP2 per tal de contrarestar aquest augment de ROS (Jabůrek M, 1999). Per això es van avaluar els nivells d'expressió d'mRNA de la proteïna UCP2, com un indicador directe dels nivells d'estrés oxidatiu (Echtay KS, 2002) i es van quantificar els nivells de ROS.

En l'anàlisi dels nivells de missatgers de l'UCP2 s'evidencia que la ingesta de dieta grassa duplica els seus valors respecte els animals alimentats amb dieta control i tractats amb el virus AAV-GFP (figura 35a). Aquest augment es veu totalment frenat quan es sobreexpressa la CPT1A i la CPT1AM amb dieta grassa. En canvi, l'administració vírica de AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM amb dieta control provocaria una tendència a l'augment dels nivells d'mRNA de la UCP2, però no és significativa.

Degut a la ingesta de dieta grassa els nivells de ROS en els animals infectats amb el virus AAV-GFP es dupliquen respecte els animals alimentats amb dieta control (figura 35b i c). En canvi, aquest fort augment queda normalitzat quan es sobreexpressa la CPT1A i la CPT1AM en animals alimentats amb dieta grassa.

Pel que fa els animals tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM alimentats amb dieta control no mostren diferències significatives respecte el seu grup control tractats amb el virus AAV-GFP, tot i que s'intueix una lleugera tendència a l'augment en els animals que sobreexpressen la CPT1AM.



**Figura 35. Anàlisi d'indicadors de l'estrès oxidatiu. a)** Expressió relativa d'UCP2 quantificat per PCR a temps real de l'RNA extret del fetge dels ratolins tal i com s'indica en el material i mètodes. \* $P < 0,05$  respecte el grup GFP. Es normalitza prenent el valor d'1 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP. **b)** Anàlisi dels nivells de ROS en 10ug de fetge mitjançant Western Blot (OxyBlot kit). **c)** Quantificació (Unitats Arbitràries) del Western Blot. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. \* $P < 0,05$  respecte els animals tractats amb els virus AAV-GFP.

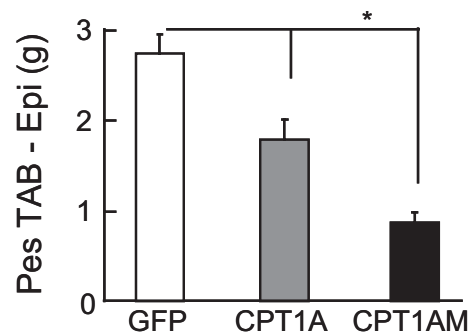
#### 4.14. Estudi del teixit adipós

El teixit adipós en un estat d'obesitat i sobrepès tendeix a l'expansió i a l'engrandiment per part dels adipòcits. Es va estudiar si un augment crònic de l'oxidació d'àcids grassos en el fetge podia exercir un possible efecte sistèmic en el teixit adipós.

##### 4.14.1 Anàlisi del pes del teixit epididimal

El teixit adipós blanc epididimal s'obtingué a les 9 setmanes després de l'administració dels virus i 11 setmanes de dieta grassa. S'analitzà algunes de les seves característiques com el pes i també un anàlisi histològic del teixit adipós dels diferents grups d'animals tractats.

La sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM en animals alimentats amb dieta grassa redueix el pes del teixit adipós blanc epididimal 1,5 vegades i 3,2 vegades respectivament comparat amb el pes del teixit adipós dels animals GFP alimentats amb dieta grassa (figura 36).



**Figura 36. Anàlisi del pes del teixit adipós blanc epididimal.** Es van extraure i pesar els teixits epididimals dels animals alimentats amb dieta grassa infectats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM a les 19 setmanes d'edat. n= 4-8. \*P < 0,05 respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP.

Aquest resultat indica que un augment de l'oxidació- $\beta$  en el fetge té un efecte indirecte en la reducció de l'acumulació de greixos en el teixit adipós.

#### 4.14.2 Estudi histològic del teixit adipós blanc epididimal

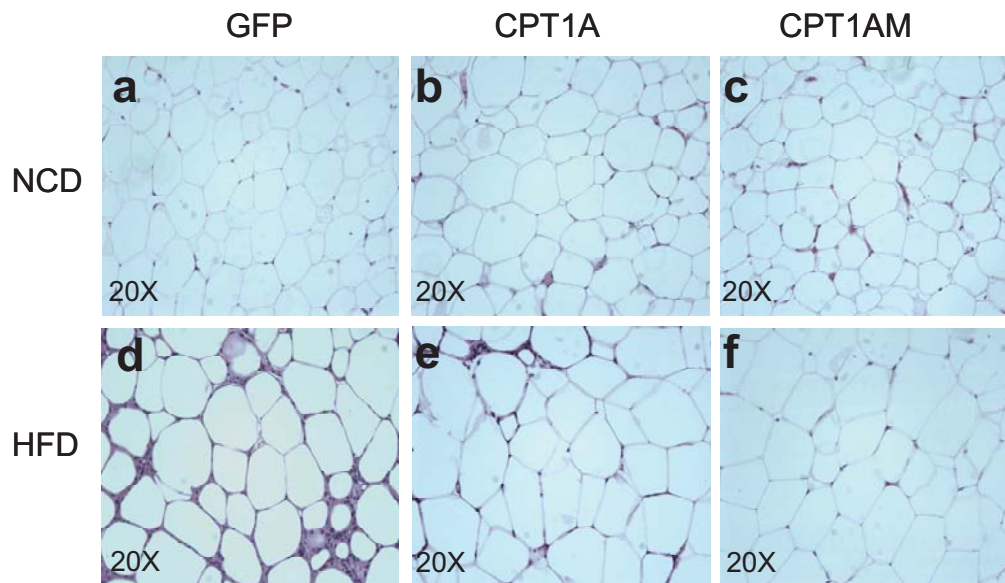
El teixit adipós dels animals obesos es caracteritza per un augment en la mida dels adipòcits seguit d'una infiltració de cèl·lules mononuclears (Feuerer M, 2009; Liu J, 2009; Lumeng CN, 2009; Weisberg SP, 2003). Aquestes cèl·lules immunològiques rodegen els adipòcits que estan a punt de morir formant una estructura en forma de corona (Strissel KJ, 2007). Per tal de determinar quin era l'estat del teixit adipós dels animals tractats es va estudiar la histologia del teixit adipós blanc epididimal.

En la figura 37, es mostra com els adipòcits dels animals tractats amb el virus AAV-GFP i amb dieta grassa (figura 37d) són d'una mida més gran i presenten un nivell més elevat d'infiltració de cèl·lules inflamatòries respecte el grup d'animals tractat amb dieta control (figura 37a). Gràcies a la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM en els animals alimentats amb dieta grassa es veuen minvats tan la mida dels adipòcits, com el nivell d'infiltració presents i de forma menys



arrodonida que els adipòcits corresponents als animals infectats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta grassa.

Un cop analitzades totes les imatges preses en els adipòcits de animals alimentats amb dieta control no es van trobar diferències respecte la mida, forma i nivell d'infiltració de cèl·lules immunològiques (figura 37a,b i c).



**Figura 37. Anàlisi histològic del teixit adipós blanc. a, b i c)** Imatge representativa del grup alimentat amb dieta control i tractats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM respectivament. **d, e i f)** Imatge representativa del grup alimentat amb dieta grassa i tractats amb els virus AAV-GFP, AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM respectivament. Mostres preses a les 29 setmanes d'edat. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. Tinció H&E.

#### 4.14.3 Anàlisi de l'expressió de gens relacionats amb la inflamació

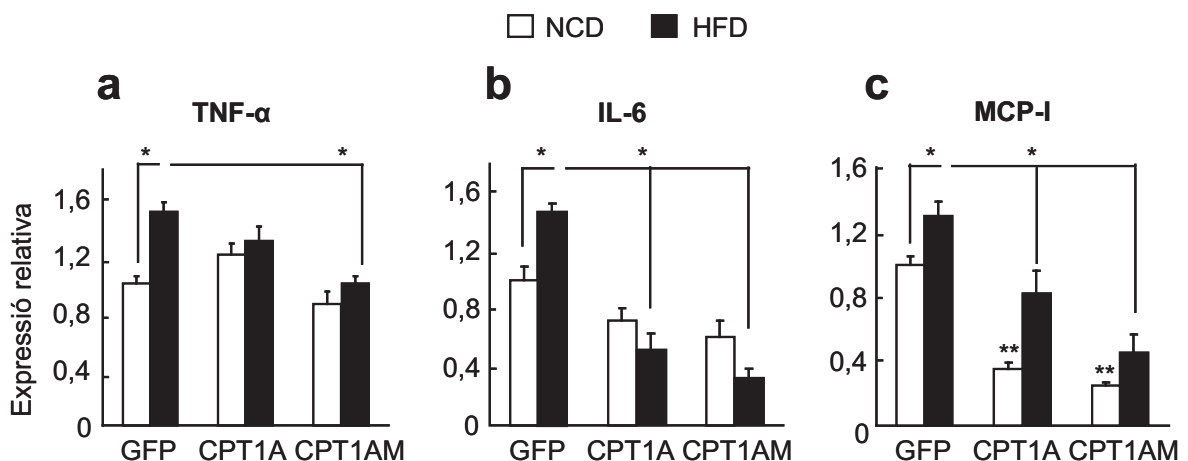
L'obesitat altera les funcions endocrines i metabòliques del teixit adipós augmentant la síntesi de citoquines proinflamàtores (Weisberg SP, 2003). Per tal d'estudiar l'efecte de la sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM sobre la inflamació es va avaluar l'expressió d'indicadors proinflamatoris com el  $TNF\alpha$ , IL-6 i la MCP-I en el teixit adipós blanc epididimal.

Els nivells de missatgers del  $TNF\alpha$  es veuen incrementats 1,5 vegades degut a la ingesta de dieta grassa (figura 38a). En canvi, la sobreexpressió de la CPT1AM frena aquest augment normalitzant els valors a nivells similars als dels animals alimentats amb dieta control. La sobreexpressió de la CPT1A en els ratolins

alimentats amb dieta grassa tot i mostrar una tendència a disminuir no és significativa. L'estudi dels nivells d'mRNA del TNF $\alpha$  en els animals alimentats amb dieta control i que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM demostra que no té cap efecte.

Es van obtenir uns resultats molt semblants en els nivells de missatgers de la IL-6 als obtinguts en els nivells d'mRNA del TNF $\alpha$  (figura 38b). La dieta grassa induiria un augment dels nivells d'mRNA de IL-6 de 1,5 vegades respecte els animals alimentats amb dieta control. En aquest cas tan la sobreexpressió de la CPT1A com la de CPT1AM en els animals alimentats amb dieta grassa reduirien els nivells de IL-6 unes 3 i 3,2 vegades respectivament. L'administració dels virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM no afectaria als animals alimentats amb dieta control, tot i mostrar una lleugera tendència a disminuir, però no és significativa.

Seguint en l'estudi del perfil inflamatori del teixit adipós es van avaluar els nivells de missatgers de la MCP-I (figura 38c). En aquest cas la alimentació amb dieta grassa dels animals produeix un lleuger increment significatiu de 1,3 vegades dels nivells de missatgers de la MCP1 en els animals tractats amb el virus AAV-GFP. Sorprenentment, la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM en els animals alimentats amb dieta control redueix 3 i 3,2 vegades els nivells de missatgers de MCP1. De la mateixa manera, aquesta sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM en els animals tractats amb dieta grassa causa una forta reducció de 1,6 i 2,8 vegades respecte els animals infectats amb el virus AAV-GFP i amb dieta grassa.



**Figura 38. Anàlisi per PCR a temps real de l'alteració de diferents gens implicats en l'estudi de la inflamació.** Es determinaren els nivells d'expressió de **a)** TNF **b)** IL-6 i **c)** MCP-1. L'obtenció de l'RNA i el posterior anàlisi per PCR a temps real es va realitzar tal i com s'indica a material i mètodes NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet*. n=6-10. \*P  $\leq$  0,05 respecte el grup GFP. Es normalitza prenent el valor d'1 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP.

#### 4.15. Anàlisi de la resistència a la insulina en diferents teixits

L'obesitat i el sobrepès es caracteritzen per una acumulació ectòpica en excés de greixos i a més són un factor de risc que promouen el desenvolupament de la resistència a la insulina i la diabetis tipus 2. Aquesta acumulació de greixos en les cèl·lules produeix una alteració o pèrdua de la senyalització de la insulina en els diferents teixits afectats. Per això es va avaluar quin era l'efecte d'aquest augment de l'oxidació- $\beta$  en el fetge sobre la senyalització de la insulina en aquest teixit, en múscul, teixit adipós i melsa (figura 39).

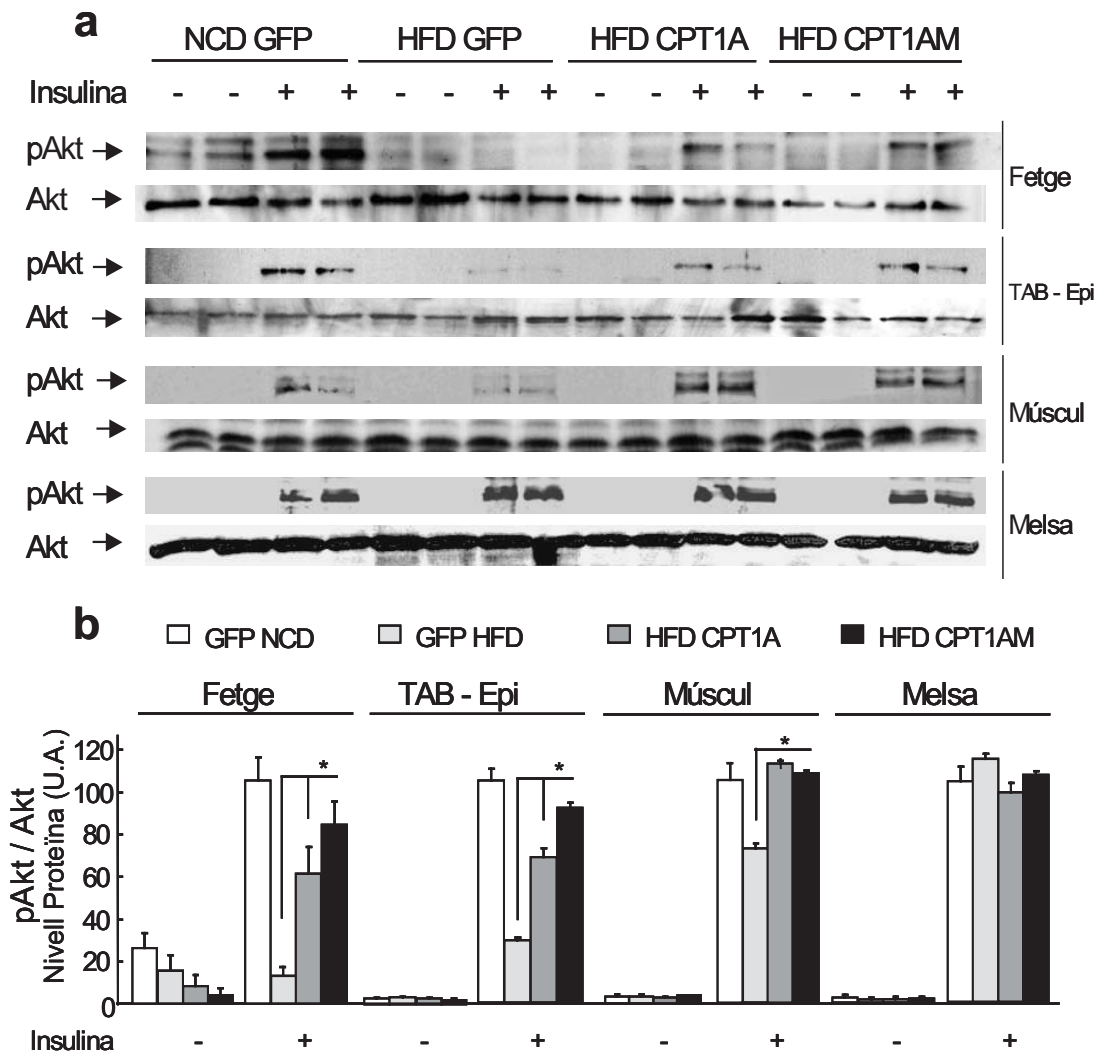
Es va analitzar i quantificar l'Akt total i l'Akt fosforilada mitjançant Western Blot a les 29 setmanes d'edat (19 setmanes després de l'administració dels virus) com a indicador de la sensibilitat a la insulina en els diferents teixits dels animals tractats. D'aquesta manera, a més akt fosforilada li correspon una millor resposta a la insulina per part del teixit estudiat.

Primer, es va analitzar la sensibilitat a la insulina en el fetge, ja que és l'òrgan diana del nostre estudi (figura 39). Degut a la ingesta diària de dieta grassa al llarg de 21 setmanes, l'Akt fosforilada del fetge dels animals tractats amb els virus AAV-GFP es troba inhibida 9 vegades respecte els animals alimentats amb dieta control. La sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM en els animals alimentats amb dieta grassa recupera aquesta inhibició de la fosforilació de l'akt en 6 i 8 vegades respectivament

Seguidament es va analitzar la resposta a la insulina en el teixit adipós blanc epididimal i (figura 39). Tal i com era d'esperar la fosforilació de l'Akt com a resposta a la insulina dels animals alimentats GFP amb dieta grassa es veu reduït en 7,3 vegades respecte els animals amb dieta control. En els animals tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM mostren una augment de la fosforilació de l'Akt de 3,1 i 4,2 respectivament als seus controls GFP. Els nivells de fosforilació de l'Akt presents en els animals tractats amb els virus AAV-CPT1AM són similars als nivells dels animals alimentats amb dieta control.

Com a teixit afectat també en un estat d'obesitat per l'acumulació lipídica es va estudiar la resposta a la insulina en el múscul esquelètic (figura 39). Els animals amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM en el fetge normalitzen totalment els nivells de fosforilació de l'akt que s'havien vist disminuïts 1,2 vegades per l'efecte de la dieta grassa en el múscul esquelètic.

Per últim, es va analitzar la resposta a la insulina en la melsa com a òrgan control (figura 39), ja que no mostra canvis en la senyalització d'insulina en un estat de resistència a la insulina (Feuerer M, 2009). Tal i com era d'esperar no s'observen diferències significatives entre els diferents grups analitzats.

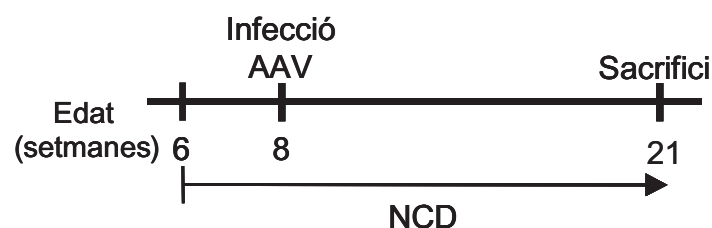


**Figura 39. Anàlisi dels nivells de proteïna Akt (56kDa) i Akt fosforilada (pAkt) (56kDa) de ratolí per Western Blot. a)** Western Blot representatiu dels nivells d'Akt i pAkt en extractes totals (25µg) de fetge, teixit adipós blanc epididimal (TAB-Epi), múscul i melsa a les 29 setmanes d'edat. **b)** Quantificació del Western Blot d'pAkt utilitzant com a normalitzador la quantitat de l'Akt total. NCD: *Normal Chow Diet* i HFD: *High Fat Diet* n= 6-10. \*P ≤ 0,05 respecte els animals tractats amb el virus AAV-GFP i alimentats amb dieta grassa. Es normalitza prenent el valor de 100 en els animals infectats amb els virus AAV-GFP i alimentats amb la dieta control.

D'aquests resultats es pot concloure que la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM de rata en el fetge de ratolins és capaç de revertir la resistència a la insulina induïda per la ingesta diària de greixos a llarg termini, no solament en el fetge sinó també presenta un efecte sistèmic que afecta al teixit adipós i múscul esquelètic.

## 5. EFECTE DE LA SOBREENPRESSIÓ DE CPT1AM EN FETGE DE RATOLINS DB/DB

L'expressió de la CPT1AM mostra en general un comportament més marcat sobre l'increment de l'oxidació- $\beta$  i en la majoria dels paràmetres analitzats en ratolins alimentats amb dieta grassa. Ens vam plantejar si aquesta oxidació desregulada d'àcids grassos seria capaç de revertir un fenotip genèticament obès. Per aquest motiu es va avaluar l'efecte dels virus AAV-CPT1AM injectats en ratolins obesos modificats genèticament (db/+ i db/db). Aquests ratolins presenten una deficiència en els receptors de la leptina degut a una mutació espontània. A partir de la setmana 7 d'edat presenten hiperglucèmia i hiperinsulinèmia i un marcat fenotip d'obesitat i diabetis. El virus AAV-GFP i el AAV-CPT1AM es van injectar en una dosi de  $7,5 \times 10^{12}$  gc/kg en els ratolins db/+ i db/db de 8 setmanes d'edat, es van sacrificar al cap de 3 mesos (figura 40).

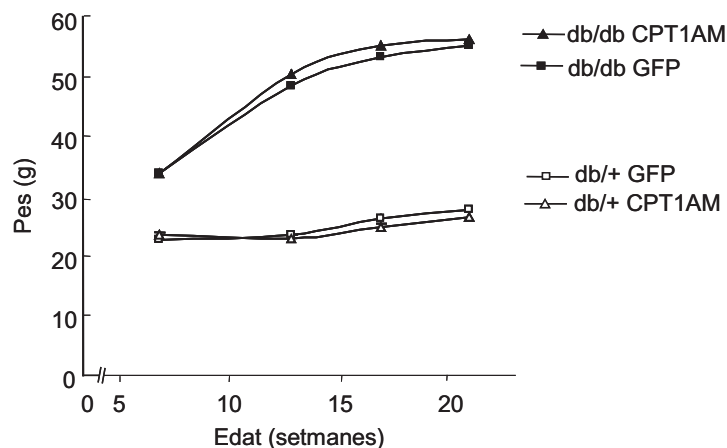


**Figura 40. Diagrama de l'experiment amb els ratolins C57BL/KSJR-db.** S'especifica l'edat de l'inici de l'experiment, l'edat d'administració dels virus i l'edat de sacrifici dels animals. NCD: *Normal Chow Diet*.

### 5.1. Efecte en el pes

Es van injectar els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM i es va analitzar el pes dels animals com a paràmetre indicatiu de l'estat d'obesitat dels animals (figura 41). Tal i com ja havia passat en l'experiment anterior amb els ratolins C57BL6 alimentats amb dieta control (figura 21), entre els ratolins control db/+ tractats amb el virus AAVGFP i el ratolins control db/+ tractats amb els virus AAV-CPT1AM no es van

observar diferències significatives de pes. Sorprenentment, tampoc no es van observar canvis significatius de pes entre el grup d'animals db/db infectats amb el virus AAV-GFP i el grup d'animals db/db tractats amb el virus AAV-CPT1AM al llarg de 13 setmanes de tractament.



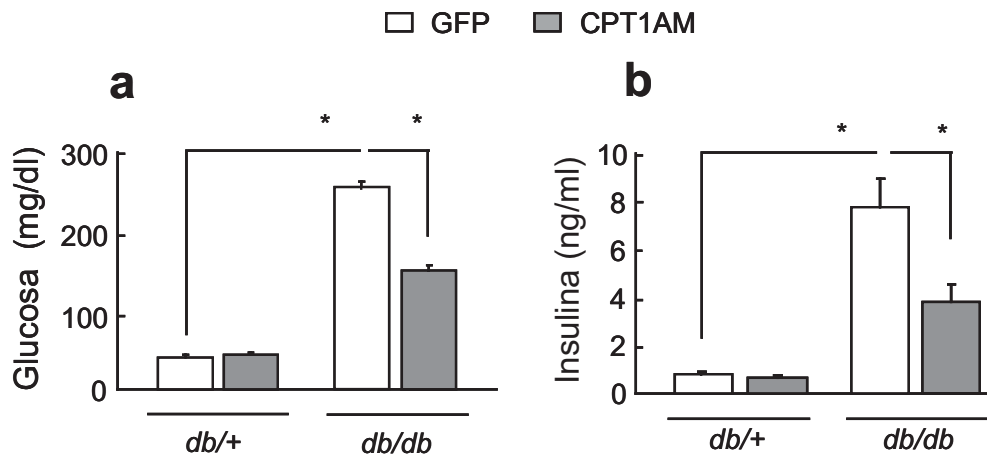
**Figura 41. Anàlisi de l'increment de pes del ratolins db/+ i db/db.** Els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM van ser injectats a les 8 setmanes d'edat. El seguiment dels pesos es va dur a terme a les 7, 12, 17 i 21 setmanes d'edat previ dejú. db/+: ratolins heterozigots i db/db: ratolins homozigots. n=9-10.

## 5.2. Efecte en els paràmetres sèrics de glucosa i insulina

Tot i no veure canvis en l'increment de pes dels animals db/db tractats amb el virus AAV-CPT1AM respecte el seu grup control AAV-GFP, com a indicadors de l'estat de diabetis dels animals es van estudiar els nivells en sèrum de glucosa i insulina en dejú.

En les mesures dels nivells de glucosa i insulina realitzades a les setmanes 12 i 17 d'edat quan els animals ja duien 4 i 9 setmanes amb els virus administrats no es van observar diferències significatives en els pesos dels animals db/db que sobreexpressaven la CPT1AM respecte els animals db/db que expressaven la GFP (figura 42). En canvi, en els resultats dels nivells de glucosa i insulina a les 21 setmanes d'edat i després de 13 setmanes de l'administració vírica els ratolins que sobreexpressaven la CPT1AM mostraven una reducció dels nivells de glucosa en sang del  $41,2\% \pm 3,5$  i dels nivells d'insulina del  $51,3\% \pm 4,6$  respecte el grup tractat amb el virus AAV-GFP db/db.

Els animals es van haver de sacrificar a les 21 setmanes d'edat degut als problemes de salut que presentaven els animals injectats amb el virus AAV-GFP utilitzats com a control i per tant no es va poder allargar l'experiment.



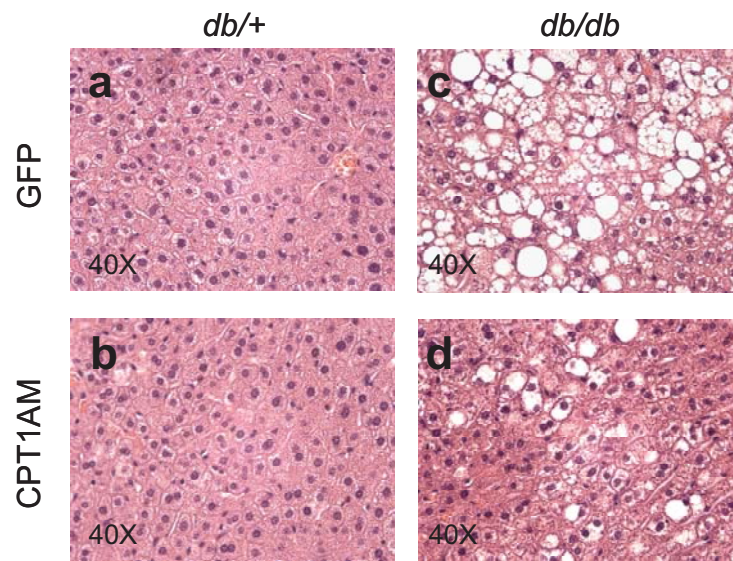
**Figura 42. Anàlisi dels nivells de glucosa i insulina en sèrum. a)** Nivells de glucosa en sèrum (mg/dl). **b)** Nivells d'insulina en sèrum (ng/ml) a les 21 setmanes d'edat i 13 setmanes després de l'administració vírica. n=9-10. \*P ≤ 0,05 respecte els animals db/+ tractats amb el virus AAV-GFP db/+ i respecte els animals db/db tractats amb el virus AAV-GFP.

### 5.3. Estudi histològic del fetge

Un cop sacrificats els animals a les 21 setmanes d'edat i que corresponia a 13 setmanes després de la injecció vírica es va estudiar la histologia dels fetges per analitzar el nivell d'esteatosi hepàtica presents en aquests animals.

En la figura 43 s'observa clarament com els animals GFP db/db mostren una acumulació de lípids i una esteatosi avançada que no mostren els animals control heterozigots db/+ i tractats amb el virus AAV-GFP. En canvi, en els animals db/db tractats amb el virus AAV-CPT1AM s'observa una reducció considerable d'aquesta acumulació de lípids en el fetge (figura 43d).

Era d'esperar tal com es mostra en la figura 43 a i b que la sobreexpressió de CPT11AM no afectés a la histologia dels fetges dels animals controls heterozigots db/+ tractats amb el virus AAV-CPT1AM respecte els animals controls heterozigots db/+ tractats amb el virus AAV-GFP.



**Figura 43. Anàlisi histològic del fetge dels ratolins db/db genèticament obesos. a i b)** Imatge representativa dels animals db/+ tractats amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM. **c i d)** Imatge representativa dels animals db/db tractats amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM. Mostres analitzades a les 21 setmanes d'edat i 13 setmanes després de l'administració vírica. Tinció H&E.

Aquest resultat és una mostra clara de la millora per part dels animals tractats amb el virus AAV-CPT1AM demostrant que tot hi tenir un fenotip fortament marcat d'obesitat i diabetis els virus són capaços de frenar aquest fenotip, reduïnt significativament els nivells de glucosa i insulina en sang i disminuint l'acumulació lipídica en el fetge.

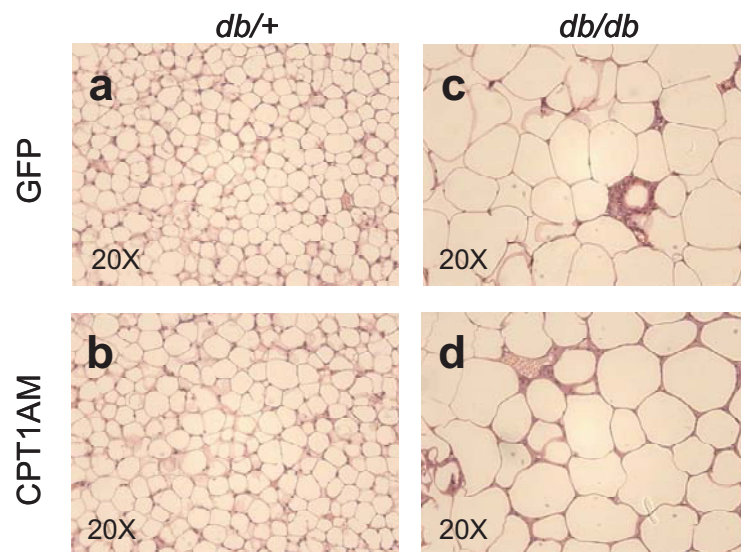
#### 5.4. Estudi histològic del teixit adipós blanc

Degut a la disminució lipídica del fetge es va analitzar també un estudi histològic del teixit adipós blanc epididimal per comprovar si en aquest cas s'observava una acció sistèmica per part dels virus.

Tal com és d'esperar, en la figura 44a i c s'aprecien els adipòcits dels animals heterozigots db/+ tractats amb els virus AAV-GFP que comparats amb els adipòcits dels animals homozigots db/db tractats amb els virus AAV-GFP són més nombrosos i de mida més reduïda. A més en els adipòcits dels ratolins db/db tractats amb els virus AAV-GFP s'observa un nivell més alt de cèl·lules inflamatòries no presents en els adipòcits dels animals db/+ i tractats amb el mateix virus.



Per altra banda, no s'observen diferències significatives entre els adipòcits dels animals control *db/+* tractats amb els virus AAV-GFP i els animals *db/+* tractats amb els virus AAV-CPT1AM. En aquest cas, la sobreexpressió de la CPT1AM en els animals obesos *db/db* no té cap efecte sobre els adipòcits quan els comparem amb els animals tractats amb el virus AAV-GFP (figura 44ci d). Aquest resultat es podria explicar perquè tampoc s'han observat diferències de pes entre els diferents grups d'animals tractats.



**Figura 44. Anàlisi histològic del teixit adipós. a i b)** Imatge representativa dels animals *db/+* i tractats amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM. **c i d)** Imatge representativa dels animals *db/db* i tractats amb els virus AAV-GFP i AAV-CPT1AM. Mostres preses les 21 setmanes d'edat i 13 setmanes després de l'administració vírica. Tinció H&E.

Dels resultats presentats es poden concloure principalment dues coses: 1) que la sobreexpressió de la CPT1AM millora el fenotip de ratolins obesos modificats genèticament i 2) caldria poder realitzar l'estudi a més llarg termini per tal d'avaluar si la sobreexpressió de CPT1AM en el fetge és capaç de revertir totalment un fenotip genètic d'obesitat i diabetis.

Per últim, en els resultats obtinguts en aquest treball, es demostra els efectes beneficiosos d'un augment de l'oxidació d'àcids grassos en el fetge en un fenotip obès i deixa la porta oberta cap a investigacions futures per trobar noves teràpies contra l'obesitat i les malalties associades.

**DISCUSSIÓ**

---

---



## DISCUSSION

Existeixen clares evidències que una bona estratègia per tractar l'obesitat i la diabetis tipus 2 és incrementar farmacològicament o mitjançant teràpia gènica l'oxidació dels àcids grassos. Així Shulman i col·laboradors demostraren que un increment de la FAO millorava la resistència a la insulina mitjançant la reducció dels nivells lipídics intramiocel·lulars en el fetge (Savage DB, 2007 i Choi CS, 2007). En canvi, l'augment de la FAO en el múscul s'ha associat a una resistència a la insulina en el múscul esquelètic (Finck BN, 2005 i Kloves TR, 2008) mitjançant la saturació del mitocondri i que produiria una FAO incompleta (Muoio DM, 2007). A més, un estudi recent presentat per Hoehn *et al.* (Hoehn KL, 2010) demostra que un augment en la FAO en el múscul no té efectes sobre l'adipositat i l'augment de pes en ratolins alimentats amb dieta rica en greixos. Aquests resultats plantegen un parell de qüestions, 1) una estratègia basada en un increment de la FAO *per se* és suficient per reduir el pes corporal i l'adipositat *in vivo*? i 2) quins són els teixits i els gens diana per tractar l'obesitat?

Els resultats presentats en aquest treball avalen la hipòtesi que l'augment del flux d'àcids grassos en els mitocondris de fetge mitjançant una sobreexpressió crònica de l'enzim clau de l'oxidació- $\beta$ , la CPT1A, protegeix contra l'obesitat i la resistència a la insulina induïda per l'obesitat. Els efectes beneficiosos de la transferència gènica de la CPT1A i de la CPT1AM presentada en aquesta tesi es basen en tres factors: 1) l'ús de virus adenoassociats per l'expressió de gens a llarg termini, 2) escollir el fetge com a òrgan diana pel tractament i 3) sobreexpressar la isoforma mutada de la CPT1A (CPT1AM) (Morillas M, 2003), la qual és insensible al seu inhibidor fisiològic, el malonil-CoA.

El fetge és l'òrgan clau i responsable de la regulació de la homeostasi energètica de tot l'organisme. Controla i regula el metabolisme i la homeoestasi de greixos i de la glucosa. A més, és un òrgan sensible a la insulina i alteracions en la cascada de senyalització de la insulina comporten el desenvolupament de resistència a la insulina i en definitiva greus conseqüències pel balanç energètic i pel metabolisme en general (Meshkani R, 2009). Així doncs, pel seu paper crucial en el control del metabolisme es converteix en un òrgan apropiat i clau com a possible diana pel tractament i/o teràpia gènica per combatre l'obesitat i problemes associats com la resistència a la insulina.

Un altre dels factors claus de l'èxit d'aquest estudi és l'ús dels virus adenoassociats (AAV). Els AAV són una molt bona eina com a teràpia gènica per l'expressió de gens durant llargs períodes de temps. Els seus avantatges es basen fonamentalment en dos aspectes, per un costat, la capacitat que mostren alhora d'expressar els gens inserits en el genoma dels virus a llarg termini i per una altra banda, la resposta pràcticament nul·la per part del sistema immunitari de l'organisme el qual infecten (Berns KI, 1995 i Zincarelli C, 2008). En els últims 20 anys s'ha produït una explosió de la utilització dels AAVs com a teràpia gènica. Tal i com s'ha vist en la introducció ja s'han utilitzat en assajos clínics per estudiar possibles tractaments contra malalties del sistema nerviós central (Hester ME, 2009), distròfies musculars (Trollet C, 2009), desordres retinals (Stieger K, 2010) o tractaments per la hipercolesterolèmia (Lagor WR, 2009).

Un altre punt bàsic del nostre treball és dirigir la sobreexpressió de la CPT1A i de la CPT1AM únicament en el fetge. Existeixen múltiples serotips de virus adenoassociats els quals mostren diferents patrons alhora d'infectar (McCarty DM, 2004). En varis estudis ja s'ha utilitzat el AAV1 per dur a terme una teràpia gènica en el fetge de diferents espècies animals (Koeberl DD, 2008 i Seppen J, 2006). Tal i com es mostra en el treball de Zincarelli i col. (Zincarelli C, 2008) el serotip AAV1, que és el que hem utilitzat en el nostre treball, és un serotip d'expressió mitja comparat amb altres serotips, de distribució global i amb capacitat d'infectar múscul, ronyó, cor, fetge, cervell, testicles, pulmons i tendons. Per tal d'evitar doncs, que la infecció vírica ens produís una sobreexpressió global de la CPT1A i de la CPT1AM, es va incorporar en el genoma dels virus adenoassociats emprats un promotor específic de fetge (Kramer MG, 2003). D'aquesta manera, tot i que els virus amb tota probabilitat podien infectar altres teixits no desitjats, els nostres resultats, on hem determinat els nivells de missatgers de la CPT1A en diferents teixits, mostren clarament una expressió exclusivament hepàtica.

Per una altra banda la utilització de la forma mutant de la CPT1A, CPT1AM (Morillas M, 2003), la qual és insensible al seu inhibidor fisiològic el malonil-CoA, és un altre punt determinant i fonamental per a la realització d'aquesta tesi. Aquesta forma mutada de CPT1 permet una oxidació dels àcids grassos permanent independentment dels nivells de malonil-CoA presents en la cèl·lula hepàtica. Això estar d'acord amb els resultats obtinguts en treballs realitzats en el nostre grup i en treballs publicats al llarg d'aquesta tesi (Herrero L, 2005; Sebastián D, 2007; Akkaoui M, 2009 i Henique C, 2010), els quals ja havien utilitzat la CPT1AM i havien

comprovat en diferents tipus cel·lulars, que la seva expressió conduïa a una major capacitat d'oxidació d'àcids grassos independentment dels nivells de malonil-CoA presents.

## **1. LA RATA COM A MODEL PER LA SOBREEXPRESSIÓ DE CPT1**

Dos són els experiments que es van realitzar amb rates i els dos amb resultats completament diferents pel que fa a la sobreexpressió de CPT1A. En un dels experiments es van tractar rates alimentades amb dieta control i, en un altre experiment, les rates varen ser alimentades amb dieta grassa. Tot i que en l'experiment de les rates alimentades amb dieta grassa van ser tractades amb una dosi vírica de  $1.25 \times 10^{12}$ gc/kg i per tant 1,6 vegades superior a l'experiment prèviament realitzat, no es van observar augments significatius de proteïna i d'activitat CPT1A. Existeixen dues grans diferències entre els experiments realitzats que podrien explicar els resultats obtinguts: 1) el grau d'obesitat i 2) l'edat dels animals alhora d'administrar els virus.

Les rates alimentades amb una dieta rica en greixos durant 20 setmanes abans d'injectar els virus, contenen uns nivells de TAG ectòpics més elevats que les rates tractades amb la dieta control (Freedman LS, 1990). Els dipòsits lipídics acumulats en el fetge poden interaccionar directament amb la integració dels virus, dificultant la seva endocitosis cap a l'interior de la cèl·lula (Schultz BR, 2008) i per tant impeding una correcta infecció. Però en contra d'aquest supòsit, cal dir, que en aquest experiment teníem uns animals alimentats amb dieta control i tampoc en aquestes rates es van observar augments de proteïna i d'activitat CPT1A. Per tant, en aquest cas descartem la dieta grassa i l'acumulació lipídica del fetge com a causes de la no sobreexpressió de la CPT1A i de la CPT1AM.

Respecte l'edat, existeix una gran diferència entre els dos experiments alhora d'administrar els virus. Mentre que en un experiment es van injectar a la setmana 7 d'edat, en l'altre es van administrar a la setmana 20 d'edat. L'edat pot ser de gran rellevància ja que, en estudis recents, s'ha comprovat que l'administració de virus del serotip AAV8 en rates recent nascudes augmenta la transducció vírica (Foust KD, 2008). Això recolza la idea que a més edat pitjor infectarien els virus adenoassociats i perdrien eficiència. En aquest sentit s'ha observat que petites diferències en els receptors de membrana de les cèl·lules o en el sexe dels animals provoquen diferències significatives respecte a la integració

dels diferents serotips i l'eficiència de transducció dels virus (Davidoff AM, 2003). Cal tenir en compte, que la infecció i posterior integració de cada un dels serotips és força complexa i encara no està ben resolta (Schultz BR, 2008). Podem concloure doncs, que en el nostre experiment, l'edat dels animals en el moment d'administrar els virus sembla ser un factor limitant i caldria fer més estudis per afirmar que realment l'edat pot ser un factor decisiu alhora de l'administració del virus.

Donat l'alt volum de 1000µl emprat per administrar una dosi vírica de  $1.25 \times 10^{12}$ gc/kg a les rates i per una altra banda la descripció que els serotips AAV1, AAV6 i AAV8 són molt més eficients quan infecten el fetge de ratolins que quan infecten el fetge de rates (Xiao WD, 1999 i Grimm D, 2003) ens vam plantejar el canvi de model d'estudi de rata a ratolí. D'aquesta manera, al canviar de rata a ratolí s'incrementa fins a 6 vegades la dosi injectada anteriorment a les rates, aconseguint administrar una dosi de  $7,5 \times 10^{12}$ gc/kg en els ratolins. Per tant, amb el canvi de model de rata a ratolí, per un costat s'augmenta la càrrega vírica administrada i per un altre costat s'obté més eficiència infectiva al canviar d'espècie de rosegador.

## **2. L'AUGMENT DE L'OXIDACIÓ- $\beta$ EN EL FETGE DE RATOLINS ALIMENTATS AMB DIETA GRASSA REVERTEIX EL FENOTIP OBÈS I INSULINORESISTENT**

En el nostre grup ja s'havia demostrat en estudis previs que la sobreexpressió de CPT1A, utilitzant com a vector víric adenovirus, podia augmentar l'activitat CPT1 fins a 9 cops en cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques (Herrero L, 2005) i fins a 6 cops en cèl·lules musculars (Sebastián D, 2007). També en el transcurs d'aquesta tesi van sortir publicats un parell de treballs els quals infectaven rates i hepatòcits de rata amb aquest mateix vector víric per sobreexpressar la CPT1A (Stefanovic-Racic M, 2008 i Akkaoui M, 2009). En aquests treballs l'augment d'activitat era menor a l'observada pel nostre grup en diferents tipus cel·lulars. En el primer treball, Stefanovic-Racic M i col. varen observar en hepatòcits en cultiu un augment d'activitat CPT1 de 3 vegades respecte al control, 24 hores després d'haver-los infectat amb adenovirus. En rates, aquests mateixos autors, obtenien un augment d'activitat CPT1 de 2 vegades respecte al control 5 dies després de l'administració dels adenovirus. En el segon treball, Akkaoui i col. obtenien en hepatòcits de rata uns augments d'activitat CPT1 de 4,5 vegades quan sobreexpressen la CPT1A i de

1,6 vegades quan sobreexpressen la CPT1AM després d'haver infectat els hepatòcits mitjançant adenovirus. En el nostre cas, tot i utilitzar un vector víric amb menys capacitat infectiva com són els virus adenoassociats el nivell d'expressió i d'activitat CPT1 obtinguda fou similar a l'obtinguda pels dos estudis fets en fetge.

Aquests valors d'activitat CPT1 de l'entorn de 2 vegades podria venir determinat pel nombre de cèl·lules infectades, pel nombre de mitocondris i per l'espai lliure disponible en la membrana exterior dels mitocondris, on la CPT1 necessita un correcte anclatge pel seu funcionament. Val a dir també que aquest augment de l'activitat CPT1 podria estar condicionat per la forta regulació que es produeix en el fetge de l'oxidació- $\beta$ .

La pèrdua de sensibilitat al malonil-CoA de la forma mutada CPT1M ha estat estudiada pel nostre grup en llevats que sobreexpressen la CPT1 (Morillas M, 2003), en cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques (Herrero L, 2005) i en cèl·lules musculars de rata (Sebastian D, 2006). També, la forma mutada de CPT1 s'ha estudiat, en altres grups, en cèl·lules musculars de rata (Henique C, 2010) i en hepatòcits de rata (Akkaoui M, 2009). En els treballs de Herrero L, 2005; Sebastián D, 2006 i Henique C, 2010 les cèl·lules que expressen la CPT1AM retenen fins a un 95% l'activitat CPT1, mentre que les que expressen la forma salvatge l'activitat CPT1 s'inhibeix fins a un 80%. En el nostre treball, els mitocondris assajats a concentracions fisiològiques de malonil-CoA (5 $\mu$ M) provinents del fetge dels animals infectats amb el virus AAV-CPT1AM van retenir més d'un 80% l'activitat CPT1A, mentre que quan es sobreexpressa la CPT1A salvatge l'activitat remanent va ser del 50%. En el treball d'Akkaoui i col. l'activitat remanent CPT1A dels mitocondris provinents dels hepatòcits de rata infectats 40 hores amb l'Ad-CPT1AM és del 90%, mentre que l'activitat remanent dels hepatòcits de rata infectats amb l'Ad-CPT1A és del 60%. Aquestes oscil·lacions en l'activitat es podrien explicar per les diferències metodològiques alhora de realitzar l'assaig radiomètric, també pel nombre total de cèl·lules que sobreexpressen la CPT1 donat que, tal com s'ha esmentat abans, els adenovirus són més efectius en la transducció comparats amb els AAVs o per la pròpia naturalesa dels mitocondris provinents d'espècies diferents.



## 2.1 L'augment de l'oxidació d'àcids grassos en el fetge disminueix l'esteatosi hepàtica

La sobreexpressió de la isoforma CPT1A en els animals alimentats amb dieta control, provoca una tendència a l'alça no significativa en els nivells de CO<sub>2</sub> detectats, en canvi sí que s'aprecia un augment significatiu en els nivells d'ASPs i en l'oxidació total. És possible que per la dificultat de la tècnica no s'acabi de veure un augment significatiu en els nivells de CO<sub>2</sub> i que en les condicions en que es va realitzar l'assaig d'elevats nivells de glucosa (20mM) i insulina (10nM) augmentin els nivells presents de malonil-CoA, inhibint d'aquesta manera l'activitat CPT1A. L'existència d'un augment significatiu dels ASPs, espècies solubles no oxidades totalment, formades per acetil-CoA, acil-carnitines i intermediaris del cicle de Krebs ens valida aquest augment del flux d'àcils-CoA cap a l'interior del mitocondri.

La sobreexpressió de la isoforma CPT1AM en els nostres resultats ratifica l'activitat permanentment activa de la CPT1AM independentment dels nivells de malonil-CoA en les condicions d'assaig descrites i una major capacitat d'oxidació respecte la isoforma salvatge CPT1A. Aquests resultats estan d'acord amb els resultats obtinguts per Akkoui M i col. en cultius d'hepatòcits primaris on la sobreexpressió de la isoforma CPT1AM mostra una major capacitat d'oxidació respecte als control i respecte als que sobreexpressen la CPT1A salvatge en les mateixes condicions d'assaig. La infecció amb adenovirus directa dels cultius primaris d'hepatòcits en el treball d'Akkoui M provoca un major grau d'infecció, d'expressió de proteïna i d'activitat i per tant major capacitat d'oxidació que en el nostre cas. Això es podria explicar perquè el tant per cent d'hepatòcits infectats degut a l'acció dels virus adenoassociats en el moment de fer l'assaig (4 setmanes després de l'administració vírica) és aproximadament d'un 30% mentre que amb adenovirus s'infecten un 80% dels hepatòcits.

*In vivo*, quan analitzem els resultats respecte les rates infectades amb els Ad-CPT1A (Stefanovic-Racic M, 2008) aquests autors obtenen uns augments de proteïna CPT1A semblants als nostres i una oxidació de palmitat de 2 vegades respecte als animals tractats amb el virus Ad-β-gal com a controls. En el nostre cas, quan s'administra el virus AAV-CPT1A, mostra uns nivells d'oxidació més baixos, tot i que es va realitzar l'assaig d'oxidació amb oleat, que és un substrat més oxidatiu quan el comparem amb el palmitat utilitzat per aquests autors. Aquest resultat és degut en part per la forta regulació del malonil-CoA sobre la CPT1 i

també segurament, tal i com ja s'ha dit, pel menor grau d'infecció dels adenoassociats comparat amb els adenovirus. Per altra banda, en el treball de Stefanovic-Racic *et al.* no s'obtenen hepatòcits per determinar l'oxidació sinó que s'analitza l'oxidació mitjançant una porció de fetge i aquesta diferència en la metodologia podria incrementar les diferències al comparar els seus resultats amb els nostres. En canvi, en el nostre estudi, en els hepatòcits provinents d'animals tractats amb el virus AAV-CPT1AM sí s'han obtingut uns valors d'oxidació semblants als presentats per Stefanovic-Racic i col. indicant la major capacitat d'oxidació de la isoforma CPT1AM.

Tal i com hem observat en els nostres resultats, una reducció mitjançant un augment de l'oxidació d'àcids grassos en els nivells lipídics en el fetge pot ser una bona estratègia per a la reversió dels desordres metabòlics provocats per una acumulació hepàtica en excés de TAG i d'altres espècies lipídiques tòxiques com els principals causants de l'esteatosi hepàtica i la inflamació (Summers SA, 2006). Els nostres resultats van en la mateixa direcció que els presentats per Stefanovic-Racic *et al.* en el qual s'injectaven Ad-CPT1A a rates alimentades amb dieta grassa durant 1 setmana i al cap de 6 dies analitzaven el contingut de TAG del fetge. En aquest treball observen una disminució dels nivells de TAG de 4 vegades respecte als animals tractats amb el virus Ad- $\beta$ -gal com a grup control. Segurament, en aquest estudi l'efecte d'un tractament a més llarg termini, com el nostre, permetria una major reducció dels nivells de TAG en el fetge. En les rates tractades en el treball de Savage DB *et al.*, en el qual augmenten indirectament l'oxidació d'àcids grassos inhibint l'ACC1 i l'ACC2 en rates alimentades amb dieta grassa, també presenten una disminució de TAG en el fetge d'unes 2 vegades i això suposa una reducció significativa de 1,3 vegades en els nivells hepàtics de DAG. En el treball d'An J *et al.*, el qual administren adenovirus a rates alimentades amb dieta grassa per tal de sobreexpressar la MCD, produint un augment de la FAO mitjançant la disminució en els nivells de malonil-CoA, mostren una reducció de TAG en el fetge semblants al del treball de Savage DB *et al.* També en el treball presentat per Ishigaki Y, el qual augmenta l'energia dissipada en el fetge de ratolins mitjançant l'administració de Ad-UCP1 els quals sobreexpressen la UCP1 tan sols s'aprecia una reducció d'1,4 vegades en el contingut dels TAG en fetge. En el nostre estudi, en el qual s'ha obtingut una reducció de 12 vegades en els nivells de TAG en fetge millora substancialment els resultats presentats pels demés autors, segurament degut a que la determinació es va fer al cap de 4 setmanes de tractament i d'acció continuada de la CPT1. A més a més, aquesta reducció lipídica queda palesa en el

nostre estudi histològic on s'aprecia una total normalització de l'esteatosi hepàtica dels animals que sobreexpressen la CPT1AM i una parcial recuperació en els que sobreexpressen la CPT1A. En els treballs presentats per Stefanovic-Racic *et al.*, An J *et al.* i Savage DB *et al.* no mostren cap estudi histològic en fetge, mentre que en el treball d'Ihsigaki Y *et al.* no s'aprecien diferències en la histologia hepàtica dels animals tractats.

Curiosament, els animals del nostre experiment, tractats amb dieta control i que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM no mostren diferències significatives en els nivells de TAG en el fetge respecte els nivells dels animals GFP control. Aquesta dada és força interessant i d'especial rellevància, ja que en aquests animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM tot i presentar una major oxidació d'àcids grassos, un lleuger augment dels cossos cetònics en el sèrum i més formació d'ATP en el fetge, no mostren canvis significatius en el pes. Aquest fet recolza la idea que un augment de la FAO en un estat no patològic i amb ingesta de dieta control, no causaria cap desordre metabòlic important en l'organisme, al menys durant tres mesos en el que es va dur a terme l'estudi.

## **2.2 Millora del metabolisme de la glucosa i lipídic en ratolins obesos degut a l'augment de l'oxidació- $\beta$**

### **2.2.1 Metabolisme de la glucosa**

Existeixen tres factors claus en la normalització del metabolisme de la glucosa dels animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta grassa respecte els animals GFP també alimentats amb dieta grassa, 1) mostren una menor producció de glucosa hepàtica, 2) presenten una major oxidació de la glucosa cap a piruvat en fetge i 3) els animals que expressen la CPT1AM mostren una major captació de glucosa.

Al analitzar els nostres resultats, observem que els animals controls alimentats amb dieta grassa, tot i el curt temps d'ingesta de dieta grassa de només 6 setmanes, ja mostren una activació de la formació de la glucosa hepàtica. Aquests animals presenten nivells d'mRNA de G6Pasa més elevats, i això concorda perfectament amb la bibliografia, ja que en estats patològics com la diabetis tipus 2 o en condicions d'ingesta continuada de dietes riques en greixos, la via de la gluconeogènesi es veu activada en el fetge, augmentat els nivells de glucosa en

sang (Hundal RS, 2001). En canvi, tot i ser esperable, no s'observen nivells elevats d'mRNA de la PEPCCK. Això es pot explicar, perquè els animals en el moment d'analitzar els nivells de missatgers encara no mostren un clar fenotip obès i insulinoresistent, fet que explicaria perquè els nivells de PEPCCK encara no es troben fortament desregulats. Curiosament, en un treball de Varman TS *et al.* (Varman TS, 2008) demostra que la hiperglicèmia en dejú en diferents models de rosegadors amb DT2 vindria promoguda majoritàriament per un augment en l'expressió de la G6Pasa i no per l'expressió de PEPCCK.

Per analitzar la via glucolítica ens vam fixar en el complex de la piruvat-deshidrogenasa (PDC) ja que lliga la degradació de la glucosa amb el cicle de Krebs (TCA) mitjançant la descarboxilació del piruvat. Un inhibidor del complex de la PDC és la PDK, que quan estar augmentada redueix l'oxidació del piruvat pel PDC. En el fetge la supressió de l'oxidació del piruvat facilita la utilització del piruvat disponible com a precursor per a la gluconeogènesi, mentre que la funció de l'oxidació d'àcids grassos és abastir d'ATP la gluconeogènesi. S'ha descrit, que la supressió del complex PDC és un desordre metabòlic present en la diabetis com a conseqüència d'una mala adaptació de l'organisme (Sugden MC, 2006). Aquest fet, concorda amb els nostres resultats, que degut a la ingesta de dieta grassa en els animals tractats amb els virus AAV-GFP presenten nivells elevats de missatgers PDK4, que conduiria a una reducció de l'oxidació de piruvat provinent de glucosa, prioritçant la utilització del piruvat per la síntesi de glucosa i afavorint l'oxidació d'àcids grassos i aminoàcids per oxidar. Però cal tenir en compte, que l'oxidació d'àcids grassos en fetge es troba inhibida per malonil-CoA (Muoio DM, 2008) i per tant es produeix un desordre metabòlic. En canvi, els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM mostren un flux d'oxidació de glucosa a piruvat normalitzat, el qual no es troba inhibat per cap desregulació metabòlica.

Un aspecte interessant respecte al metabolisme de la glucosa és l'elevat nivell de missatgers de GLUT2 que presenten els animals alimentats amb dieta control i amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1AM. Això significaria que aquests animals mostren una major captació de glucosa que la resta. De fet un dels mecanismes *in vivo* de l'efecte antidiabètic de les TZD s'explica perquè en última instància promouria l'expressió de GLUT2 (Kim H, 2004). Una de les raons dels alts nivells de GLUT2 es podria explicar pels nivells més elevats d'oxidació d'àcids grassos en els animals que sobreexpressen la CPT1AM i que és insensible al malonil-CoA, precursor de la síntesi de *novo* d'àcids grassos. Aquests animals

necessiten augmentar la captació de glucosa, ja que tenen una oxidació- $\beta$  permanentment activada, per d'aquesta manera poder completar el cicle de Krebs. Aquesta hipòtesi concorda amb els resultats presentats en el treball de (Akkaoui M, 2009) on es descriu que degut a la sobreexpressió de la forma mutada de CPT1A en els hepatòcits es generaria un cicle fútil independentment de l'origen dels àcids grassos de cadena llarga, augmentant la captació de glucosa per completar aquest cicle i prevenint així una acumulació lipídica en excés en el fetge.

### 2.2.2 Metabolisme lipídic

Els nostres resultats demostren que un augment de l'oxidació- $\beta$  per l'administració dels virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM en els animals alimentats amb dieta grassa normalitza els nivells d'mRNA dels gens estudiats del metabolisme lipídic a nivells semblants als dels animals GFP alimentats amb dieta control. Per tant, la sobreexpressió de CPT1A i de CPT1AM normalitza les diferents vies del metabolisme lipídic dels animals alimentats amb dieta grassa.

Els animals que expressen la GFP i que estan alimentats amb dieta grassa tenen inhibits els nivells d'mRNA d'AAC1, ACC2, DGAT2 i SCD1. Això significa que tenen les vies de síntesi d'àcids grassos i de síntesi de TAG inhibides, degut en part al gran aport de greix provinent de la dieta. Això es pot explicar, perquè en diferents situacions metabòliques el contingut de greix hepàtic que prové de la síntesi lipogènica de *novo* és de només el 5% del greix total (Ntambi JM, 2002). I per una altra banda, en el moment de sacrificar els animals i analitzar el nivells d'mRNA, aquests es trobaven en dejú, situació en la que s'activa la via d'oxidació d'àcids grassos i s'inhibeix fortament la síntesi lipídica. Cal tenir en compte, que aquests animals encara no mostren hiperinsulinèmia i per tant tampoc han desenvolupat resistència a la insulina, on s'ha descrit que tindriem augmentada la lipogènesi i una disminució de la FAO (Muoio DM, 2008).

Els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM alimentats amb dieta grassa mostren una via de síntesi lipídica augmentada respecte els animals GFP alimentats amb dieta grassa. Això estaria d'acord, en que els animals tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM mostren uns nivells més elevats de missatgers del factor de transcripció SREBP1c, ja que aquest és un factor lipogènic que ens indicaria l'activació d'aquesta via. Aquest augment en el SREBP1c es correlaciona amb els nivells elevats de GLUT2 que presenten els nostres resultats, ja que

SERBP1c també podria ser responsable de l'activació de la via glucolítica. En aquest punt, seria interessant analitzar el factor de transcripció ChREBP (*carbohydrate responsive element binding protein*) tot i que no s'ha fet en aquest treball, ja que intervindria com a mitjancer entre l'acció de la glucosa i la síntesi lipídica (Dentin R, 2006 i Higuchi N, 2010).

Un cop analitzades les diferents vies de síntesi lipídica en el fetge és important analitzar el grau d'exportació d'VLDL, ja que en diferents estats patològics com la DT2 aquest es mostra incrementat (Bostrom K, 1998). Així doncs, era d'esperar que en els animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM presentessin normalitzats els nivells d'MTP, per un costat perquè tenim un contingut de TAG en el fetge normal i per un altre costat perquè mostren nivells de FFA en sèrum també normalitzats i s'ha descrit que nivells elevats de FFA en sèrum augmenten l'exportació hepàtica d'VLDL (Adiels M, 2008).

### **2.3 Disminució de la inflamació en el fetge i en el teixit adipós i millora de la histologia del teixit adipós**

L'acumulació ectòpica de greix associada a l'obesitat s'ha relacionat amb un estat d'inflamació crònic i moderat per part del fetge i del teixit adipós (Shoelson SE, 2007). A més, s'ha demostrat en altres treballs com alts nivells de IL-6 o TNF $\alpha$  activen la formació de SOCS3, factor que bloqueja la cascada de senyalització a la insulina per diferents vies, promovent la resistència a la insulina en el propi fetge i la resistència a la insulina sistèmica en última instància (Hotamisigil GS, 2006 i Wellen KE, 2005).

Els nostres resultats mostren un augment de les principals citoquines proinflamatòries TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS, SOCS3 i MCP-I en el fetge i en el teixit adipós degut a l'acumulació lipídica com a conseqüència de la ingesta de dieta grassa, tot i el curt temps (6 setmanes) que portaven alimentats amb aquesta dieta. La sobreexpressió de CPT1A i de CPT1AM frena l'activació de les principals vies inflammatòries en els ratolins alimentats amb dieta grassa degut a la reducció de l'acumulació lipídica en el fetge i d'altres teixits. Aquesta normalització en la inflamació concorda amb la histologia analitzada del fetge i del teixit adipós blanc.

En el teixit adipós blanc dels animals que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM no s'observa la presència de cèl·lules proinflamatòries infiltrades. Aquest

fet ens suggereix que l'augment de l'oxidació- $\beta$  en el fetge té un efecte sistèmic indirecte en el teixit adipós. Això ho podem avalar, perquè en els resultats presentats en aquest treball el pes del teixit adipós blanc epididimal dels animals tractats amb el virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM es veu significativament reduït en 1,6 i 3 vegades respectivament. Això estaria d'acord amb els resultats a curt termini descrits en el treball d'Ighisaki Y que presenta una petita reducció d'1,3 vegades en el pes del teixit adipós blanc epididimal i millores en l'esteatosi hepàtica i del teixit adipós marró observades en l'estudi histològic.

Un fet destacable és que la sobreexpressió de la CPT1A i la CPT1AM en els animals alimentats amb dieta control mostren una tendència a l'augment però no significativa en els nivells d'mRNA de TNF $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  en fetge. Mereixen però, una especial atenció els nivells d'mRNA de SOCS3 i MCP-I observats en els animals alimentats amb dieta control i que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM ja que sí mostren un augment significatiu, suggerint que en aquests animals, on hi ha un aport reduït de substrat degut a la dieta control, l'augment de l'oxidació- $\beta$  promouria una lleugera activació de la inflamació.

## **2.4 Reducció de l'estrès oxidatiu degut a l'augment de l'oxidació- $\beta$**

Un aspecte interessant a tenir en compte és l'anàlisi de les espècies reactives d'oxigen anomenades ROS i conegudes com estrès oxidatiu. Varis autors proposen que un augment en la FAO i l'acumulació de metabolits provinents d'aquest augment incrementa els nivells de ROS activant la seva producció (Peyssare D, 2004) i que aquest augment produeix un estat d'inflamació (Furukawa S, 2004; Lin Y, 2005 i Shoelson SE, 2006). També s'ha descrit, que nivells elevats de ROS poden danyar a la cèl·lula fins causar la mort cel·lular mitjançant l'activació de l'apoptosi cel·lular. A més a més, s'ha relacionat l'estrès oxidatiu com un dels factors claus involucrat en la patogènesi de la diabetis (Baynes JW, 1999). Aquests resultats concorden amb els experiments de Nakamura S *et al.* on s'ha descrit que alts nivells de palmitat en hepatòcits de rata on hi ha una major oxidació provoquen la formació de ROS a través de l'activació de la via del JNK (Nakamura S, 2009). Els nostres resultats mostren que efectivament una dieta grassa és capaç d'augmentar els nivells de ROS en el fetge. Curiosament però en el nostre estudi, els ratolins alimentats amb dieta grassa i que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM mostren nivells de ROS semblants al ratolins GFP alimentats amb dieta control tot i tenir una major oxidació. Aquest resultat qüestiona si una incrementada FAO *per se*

és responsable de la producció de ROS. En aquesta mateixa direcció, en un treball publicat recentment es demostra que una inhibició de la CPT1 mitjançant un potent inhibidor de la CPT1 com és l'etomoxir, augmenta la producció de ROS degut a la disminució en els nivells de NADPH i de glutatió reduït (Pike LS, 2010). A més, altres factors podrien influir d'una manera més directa amb la formació de ROS com per exemple, l'acumulació de substàncies tòxiques com els DAG i les ceramides (Summers SA, 2006). També l'expansió i la hipoxia del teixit adipós degut a l'engrandiment del propi adipòcit (Hosogai N, 2007) afavoriria l'augment en la producció de citoquines proinflamatòries. L'alliberament d'aquestes citoquines per part del teixit adipós faria augmentar els seus nivells en sang provocant una actuació sobre el propi teixit adipós i sobre el fetge i altres teixits, potenciant i afavorint la producció de ROS i la inflamació en el fetge (Shoelson SE, 2007).

## **2.5 Reversió del fenotip obès**

### **2.5.1 El pes**

En els resultats obtinguts per Stefanovic-Racic *et al.* no s'observen canvis significatius en el pes de les rates alimentades amb dieta grassa i que sobreexpressen la CPT1A. Aquest resultat és molt semblant al nostre, ja que en els animals alimentats amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1A tot i mostrar una menor tendència a l'augment de pes, aquesta no és significativa, això es podria explicar per la forta regulació de l'oxidació en el fetge degut als nivells presents de malonil-CoA. Tampoc en el treball de Savage DB *et al.* s'observen canvis de pes significatius en les rates alimentades amb dieta grassa tractades amb inhibidors de l'ACC1 i l'ACC2 que promouen una major FAO en el fetge. En canvi, en l'estudi del grup de Newgard *et al.* (An J, 2004), les rates alimentades amb dieta grassa i tractades amb l'Ad per sobreexpressar la MCD i per tant també mostren una major oxidació d'àcids grassos en fetge mostren una reducció significativa de pes de l'11% en només 5 dies de tractament, però no es realitzen determinacions a més llarg termini. També en el treball presentat per Ishigaki Y *et al.*, que augmenta l'energia dissipada en el fetge de ratolins amb la sobreexpressió amb adenovirus d'UCP1, obté una reducció significativa en el pes del 12% durant els 12 primers dies de tractament, però no es manté al llarg dels 15 dies que dura l'experiment. Això suggereix que els canvis de pes observats en aquests dos treballs podrien estar molt condicionats per l'ús dels adenovirus com a eina d'infecció i per la seva forta resposta immunològica que causen a l'organisme al qual infecten. Així doncs,



un dels principals èxits de la nostra teràpia és que els animals tractats amb el virus AAV-CPT1AM mostren una reducció significativa en el pes del 20% respecte els animals control GFP amb dieta grassa 11 setmanes després de l'administració vírica. Per tant, la sobreexpressió de la CPT1AM mitjançant virus adenoassociats és una bona eina per la reducció del pes a llarg termini.

Cal destacar, la importància que els animals tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM i alimentats amb dieta control no mostrin canvis de pes significatius. Això estar d'acord amb els resultats fins ara analitzats on no es produeixen canvis en el metabolisme d'aquests animals tot i tenir una major oxidació.

La reducció en el pes dels animals que sobreexpressen la CPT1AM després d'ingerir durant 13 setmanes una dieta rica en greixos té un efecte directe sobre el metabolisme d'aquests animals, ja que mostren nivells de glucosa i insulina i un GTT i PTT totalment normalitzats. D'aquesta manera, els nostres resultats milloren els presentats per Stefanovic-Racic M *et al.* i Savage DB *et al.*, ja que aquests no obtenen canvis significatius ni en els nivells de glucosa ni en els nivells d'insulina presentats. També milloren els resultats aportats per An J *et al.* perquè, tot i presentar una reducció en els nivells d'insulina, no veuen canvis en la glucosa en dejú. Cal dir però, que en aquest treball, sí veuen millores en la glucosa després de realitzar una prova de hiperinsulinèmia i euglicèmia. Finalment, en el treball de Ishigaki Y *et al.* els ratolins no mostren canvis en els nivells d'insulina i sí una millora en el GTT dels ratolins alimentats amb dieta grassa, però només 7 dies després de l'administració vírica.

Sorprenentment, en els nostres resultats, els ratolins que sobreexpressen la CPT1A i alimentats amb dieta grassa, tot i no mostrà una reducció de pes significativa, presenten nivells de glucosa i insulina normalitzats, i un GTT i un PTT també totalment normalitzats. Suggestint una millora del metabolisme de la glucosa gràcies a una major oxidació d'àcids grassos en el fetge.

### **2.5.2 Normalització de la senyalització de la insulina**

L'acumulació lipídica en el fetge s'ha associat comunament amb la inducció de la resistència a la insulina. Són múltiples els treballs on s'ha descrit com l'acumulació de DAG i ceramides indueixen a la resistència a la insulina mitjançant

la translocació de PKC $\epsilon$  al voltant de IRS-2 (Samuel VT, 2007; Summers SA, 2006 i Postic C, 2008). A més, s'ha descrit que la pèrdua de sensibilitat a la insulina induïda per àcids grassos és produïda a través de la inhibició de l'activitat de l'Akt (Nakamura S, 2009 i Solinas G, 2006) i aquesta és una proteïna clau en l'acció de la insulina sobre el transport de la glucosa i la síntesi de glicògen (Wolf G, 2008). Alguns estudis publicats recentment han demostrat que la resistència a la insulina associada a l'acumulació lipídica en el fetge no estaria provocada per l'acumulació d'àcids grassos o pels TAG *per se* (Monetti M, 2007 i Choi CS, 2007).

En el nostre estudi degut a la sobreexpressió de la CPT1A i de la CPT1AM observem una recuperació de l'Akt fosforilada en el fetge, múscul i teixit adipós indicant una recuperació sistèmica de la cascada de senyalització de la insulina. Una de les explicacions de perquè millora la sensibilitat a la insulina en els nostres animals rau en la disminució en els nivells de TAG del fetge i també, tot i que no hem mesurat, en una disminució dels nivells d'intermediaris lipídics com DAG i ceramides, tal i com es pot observar en el nostre estudi histològic del fetge i on s'aprecia una reducció severa en el contingut lipídic del fetge en els animals tractats amb els virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM.

En els treballs de Stefanovic-Racic M *et al.* en rates o el d'Akkaoui M *et al.* fet en hepatòcits mitjançant l'augment de l'expressió de CPT1A i/o CPT1AM no presenten evidències clares de la millora de la sensibilitat a la insulina. En el cas del treball de Stefanovic-Racic M *et al.* el tractament amb els virus Ad-CPT1A és de només 5 dies i segurament no és temps suficient per veure millores en el senyal a la insulina. En l'estudi de Savage DB *et al.* l'activitat de l'Akt en el fetge en els animals tractats amb l'inhibidor d'ACC1 i d'ACC2 es veu augmentada en el doble comparat amb els animals control, suggerint una millora de la resistència a la insulina, causada per la ingesta de dieta grassa, degut a l'augment de la FAO en el fetge. En aquest treball però, no s'avalua la sensibilitat a la insulina en el múscul ni el teixit adipós blanc. Un possible inconvenient de la inhibició de l'ACC en ratolins obesos és que la inhibició en l'hipotàlem pot fer augmentar la ingesta i en el pàncreas reduir la secreció de la insulina (Harwood HJ, 2005). També en el treball presentat per An J *et al.* es mostra una millora de la fosforilació de l'Akt en el fetge i múscul degut a l'augment de l'oxidació d'àcids grassos, però no aporta dades sobre la sensibilitat a la insulina en el teixit adipós blanc. En aquest treball, també es suggereix la idea de l'ús d'enzims involucrats en el metabolisme lipídic i del fetge com a possibles tractaments antidiabètics.

Un resultat curiós del treball de Ishigaki Y *et al.* és que tot i realitzar una teràpia gènica dirigida en el fetge, només mostra una millora en la sensibilitat a la insulina per part del múscul, però no aporta dades sobre la sensibilitat a la insulina en el fetge i en el teixit adipós blanc. Aquest resultat però, ens suggereix que una teràpia dirigida al fetge presenta un efecte indirecte en el múscul, semblant als resultats presentats en el nostre treball.

### **3. RATOLINS OBESOS GENÈTICAMENT MODIFICATS DB/DB MILLOREN EL SEU FENOTIP QUAN ES SOBREEXPRESSA LA CPT1AM EN EL FETGE**

Els ratolins db/db són un bon model per l'estudi de la diabetis tipus 2 i l'obesitat ja que presenten hiperglicèmia a partir de les 4 o 8 setmanes de vida i hiperinsulinèmia. A més, poden presentar polifàgia, polidípsia, proteïnúria, glucosúria i poliúria.

La reducció dels TAG acumulats en el fetge és una bona estratègia per combatre l'obesitat i la diabetis ja que l'esteatosi hepàtica s'ha associat molt estretament amb la resistència a la insulina (Marchesini G, 2005) i els diferents tipus de dislipidèmies amb l'obesitat i la diabetis tipus 2 (Kahn SE, 2001). En el nostre estudi hem demostrat que un augment crònic de l'oxidació- $\beta$  mitjançant la sobreexpressió de la CPT1AM en el fetge de ratolins db/db millora el metabolisme de la glucosa, la insulina i l'esteatosi hepàtica tot i no detectar canvis de pes significatius i no observar canvis en l'estudi histològic del teixit adipós blanc epididimal. Cal dir, que l'experiment es va haver de suspendre degut a la mort i als propis problemes de salut dels animals db/db control tractats amb els virus AAV-GFP, cosa que ens planteja l'opció de començar abans el tractament d'aquests animals per poder allargar l'experiment i observar possibles canvis en el pes, tal i com ja hem demostrat abans en aquest treball dels efectes beneficiosos d'un augment de la FAO sobre el pes en ratolins C57BL6 alimentats amb dieta grassa.

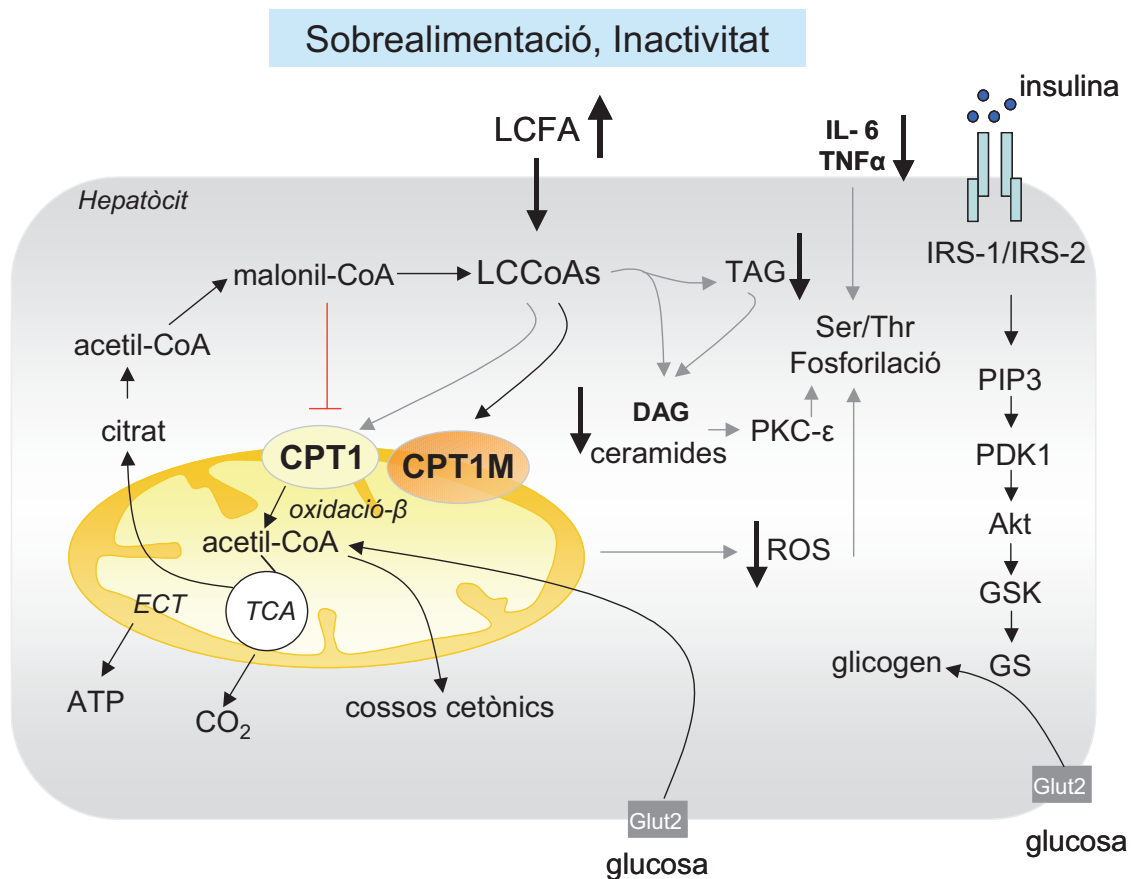
La millora en els nivells de glucosa i d'insulina en els animals db/db i tractats amb els virus AAV-CPT1AM suggereix que aquests animals podrien tenir augmentada la sensibilitat perifèrica a la insulina. Aquesta millora en el seu metabolisme, i segons el que hem pogut verificar amb els ratolins C57BL6, passaria per una reducció de la gluconeogènesi hepàtica, una millora en el metabolisme hepàtic mitjançant la reducció de l'acumulació lipídica i una disminució en l'estat

inflamatori. El fet de no veure canvis en la histologia del teixit adipós dels animals db/db i tractats amb els virus AAV-CPT1AM explicaria perquè no s'han detectat canvis significatius en el pes d'aquests animals.

Altres aproximacions dirigides a millorar el fenotip obès i diabètic de ratolins db/db mitjançant un augment indirecte de la FAO estarien d'acord amb els nostres resultats. En un treball de Zhang XD, 2010 el qual inhibeixen farmacològicament durant 5 setmanes la DGAT1 d'animals db/db aconseguen reduir el pes, la hiperlipidèmia i l'esteatosi hepàtica. La inhibició de la DGAT1 provoca una activació de l'expressió gènica en el fetge de gens com la CPT1A i el PPAR $\alpha$  provocant un increment de la FAO en els animals db/db. Sobta que tot i reduir l'esteatosi hepàtica d'aquests animals no millorin ni els seus nivells de glucosa ni els nivells d'insulina en dejú. Així doncs, una forta i eficient activació del PPAR $\alpha$  pot tenir efectes beneficiosos en el control del metabolisme de la glucosa mitjançant l'augment de l'oxidació- $\beta$  i la disminució en els nivells de TAG i de FFA, tal i com hem observat en els nostres resultats realitzats amb els ratolins C57BL/6 on una sobreexpressió de CPT1 en fetge afavoria un augment en els nivells d'mRNA de PPAR $\alpha$ .

Finalment, les nostres observacions demostrarien que l'activació crònica i directa de l'oxidació- $\beta$  és una estratègia efectiva per tractar l'obesitat, la hiperlipidèmia i l'esteatosi hepàtica a llarg termini a través dels mecanismes que s'indiquen en la figura 1.

Aquests resultats conjuntament amb la manca de patogenicitat dels AAVs són molt engrescadors de cara a nous sistemes de transferència gènica. Tot i això, serien necessaris realitzar nous estudis per tal d'estudiar els riscos dels tractaments a llarg termini involucrats amb el vector de transferència i amb el gen insertat. Algunes incerteses com la integració del gen, els efectes de llargues latències i la probabilitat d'efectes subtils d'una expressió a llarg termini han de ser estudiades amb més deteniment. A més, s'ha de mantenir un cert grau de cautela amb una possible extrapolació en humans, particularment quan es tractaria de pacients afectats amb NAFLD (malaltia del fetge gras no alcohòlica), els quals poden no mostrar una símptomatologia clara.



**Figura 1. Possible mecanisme de l'efecte de la sobreexpressió de CPT1A i CPT1M en el metabolisme del fetge.** Degut a l'augment crònic de l'oxidació-β en el fetge disminueixen els TAG i els intermediaris lipídics millorant la sensibilitat a la insulina i augmentant la captació de glucosa per part del fetge. LC-CoAs: acils CoA de cadena llarga; CPT1: carnitina-palmitoiltransferasa 1; ROS: espècies reactives d'oxigen; TCA: cicle de l'àcid tricarboxílic; ETC: cadena de transport d'electrons; DAG: diacilglicerols; PKC: proteïna quinasa C.

## 4. INVESTIGACIONS FUTURES

En aquest treball presentem una estratègia eficient per a reduir el pes corporal, l'acumulació lipídica en el fetge i en el teixit adipós, millora de l'esteatosi hepàtica i de la resistència a la insulina sistèmica associada a l'obesitat. Això s'ha aconseguit gràcies a l'ús de vectors vírics, virus adenoassociats, capaços d'incrementar crònicament i a llarg termini l'oxidació d'àcids grassos mitjançant la sobreexpressió de la CPT1A i CPT1AM, forma insensible al malonil-CoA. A més els resultats ens mostren la CPT1A com una bona diana contra els desordres metabòlics associats a l'obesitat.

Tot i la feina feta i els resultats engrescadors presentats en aquesta tesi, per tal d'aportar més dades i aprofundir amb el tema, s'haurien de realitzar nous experiments i noves aproximacions de cara a trobar un tractament eficaç contra l'obesitat. Per exemple, A) de cara a millorar l'eficiència de transducció i pensant amb una futura teràpia s'haurien de realitzar nous estudis enfocats en les següents temàtiques 1) amb nous serotips de virus adenoassociats els quals s'han anat estudiant al llarg de la realització d'aquesta tesi, 2) l'edat d'administració dels virus adenoassociats i 3) allargar el temps de tractament. B) Una de les següents fites a assolir és la completa reversió del fenotip obès d'un model d'animal DIO. D'aquesta manera es podrien estudiar els mecanismes de perquè i com la sobreexpressió de la CPT1A i de la CPT1AM són capaços de revertir un fenotip obès clarament instaurat. Seguint amb aquesta línia també es podria estudiar els efectes d'un augment de la FAO en altres models d'estudi obesos com ratolins *ob/ob* i *agouti* en els quals ens aportarien més dades alhora d'entendre l'homeostasi de l'organisme en un fenotip genèticament obès.

En resum, l'estratègia seguida en aquesta tesi ens ha permès: millorar el metabolisme de la glucosa i el metabolisme lipídic, reduir el contingut de TAG en el fetge i els nivells sèrics de FFA millorant la sensibilitat a la insulina no només en el fetge sinó també en el múscul i en el teixit adipós, així com reduir l'estat inflamatori del fetge i del teixit adipós en animals alimentats amb dieta grassa i que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM. L'ús dels virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM protegeixen de la resistència a la insulina en tot l'organisme induïda per dieta grassa i no altera cap paràmetre en els animals alimentats amb dieta control tot i presentar augments en l'oxidació d'àcids grassos. A més, la sobreexpressió de la CPT1AM redueix els nivells de glucosa i insulina en sèrum i l'esteatosi hepàtica en

un estat d'obesitat sever com el que presenten els ratolins obesos db/db genèticament modificats.

## **CONCLUSIONS**

---

---





## CONCLUSIONS

1. L'obtenció de dos vectors vírics capaços de sobreexpressar la CPT1A i la CPT1AM de rata específicament en el fetge de ratolins (AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM) injectats per la vena de la cua, ens ha permès obtenir un augment del 50% en l'activitat CPT1 i una augment en l'oxidació d'àcids grassos del 30%.
2. La forma mutada de CPT1A (AAV-CPT1AM) conserva un 80% de l'activitat CPT independentment dels nivells de malonil-CoA, el seu inhibidor fisiològic.
3. L'augment d'oxidació d'àcids grassos en fetge causat per la sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM comporta un augment en la producció d'ATP i de  $\beta$ -hidroxibutirat-CoA en el fetge i un augment de cossos cetònics en sèrum.
4. Els ratolins alimentats amb dieta grassa que sobreexpressen la CPT1A i la CPT1AM milloren l'esteatosi hepàtica reduint els nivells de TAG en fetge i disminuint els TAG i els FFA en sèrum mostrant valors similars als ratolins alimentats amb dieta control.
5. L'augment de pes produït per la dieta grassa es veu significativament reduït degut a la sobreexpressió de CPT1AM. L'administració dels virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM no provoca canvis en els pesos dels ratolins alimentats amb dieta control.
6. La sobreexpressió de la CPT1A i de la CPT1AM en ratolins alimentats amb dieta grassa normalitza els nivells de glucosa i insulina en sang a llarg termini. A més, mostren un test de tolerància a la glucosa (GTT) i un test de tolerància al piruvat (PTT) totalment normalitzats.
7. La inflamació i la producció de ROS en el fetge induïdes per dieta grassa es veuen disminuïdes per la sobreexpressió de CPT1A i CPT1AM.
8. En el teixit adipós blanc la sobreexpressió de la CPT1A i de la CPT1AM en el fetge de ratolins alimentats amb dieta grassa redueix el pes i la inflamació del propi teixit adipós i els nivells de leptina en sèrum.
9. En el fetge, teixit adipós i múscul es restableix la sensibilitat a la insulina malmesa per la ingesta de dieta grassa degut a l'administració dels virus AAV-CPT1A i AAV-CPT1AM.

10. La sobreexpressió de CPT1AM de rata en el fetge de ratolins genèticament modificats *db/db* millora l'esteatosi hepàtica i els nivells de glucosa i insulina.

## **BIBLIOGRAFIA**

---



## A

Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 15;97(4):1444-9. PMID: 10677481

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jul;28(7):1225-36. Review. PMID: 18565848

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275(12):9047-54. PMID: 10722755

Akkaoui M, Cohen I, Esnous C, Lenoir V, Sournac M, Girard J, Prip-Buus C. Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J*. 2009 May 27;420(3):429-38. PMID: 19302064

Alberti KG, Gray DP. The care of diabetes. *Diabet Med*. 1998 Nov;15 Suppl 3:S3-4. Review. PMID: 9829761

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 1996 Dec 2;15(23):6541-51. PMID: 8978681

Allocca M, Mussolino C, Garcia-Hoyos M, Sanges D, Iodice C, Petrillo M, Vandenberghe LH, Wilson JM, Marigo V, Surace EM, Auricchio A. Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol*. 2007 Oct;81(20):11372-80. Epub 2007 Aug 15. PMID: 17699581

Allred JB, Reilly KE. Short-term regulation of acetyl CoA carboxylase in tissues of higher animals. *Prog Lipid Res*. 1996 Dec;35(4):371-85. Review. PMID: 9246356

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997 Sep 1;25(17):3389-402. Review. PMID: 9254694

An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI, Koves TR, Stevens R, Millington D, Newgard CB. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med*. 2004 Mar;10(3):268-74. Epub 2004 Feb 8. PMID: 14770177

Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):191-8. Epub 2005 Jan 30. PMID: 15685170

Askew EW, Dohm GL, Huston RL. Fatty acid and ketone body metabolism in the rat: response to diet and exercise. *J Nutr*. 1975 Nov;105(11):1422-32. PMID: 475

## B

Bahary N, Leibel RL, Joseph L, Friedman JM. Molecular mapping of the mouse db mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Nov;87(21):8642-6. PMID: 1978328

Banegas JR, Díez Gañán L, González Enríquez J, Villar Alvarez F, Rodríguez-Artalejo F. Recent decrease in smoking-attributable mortality in Spain *Med Clin (Barc)*. 2005 May 28;124(20):769-71. Spanish. PMID: 15927102

Bantel-Schaal U, Hub B, Kartenbeck J. Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J Virol*. 2002 Mar;76(5):2340-9. PMID: 11836412

Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol*. 2000 Mar;74(6):2777-85. PMID: 10684294

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D25-30. Epub 2007 Dec 11. PMID: 18073190

Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays*. 1995 Mar;17(3):237-45. Review. PMID: 7748178

Blankinship MJ, Gregorevic P, Allen JM, Harper SQ, Harper H, Halbert CL, Miller AD, Chamberlain JS. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther*. 2004 Oct;10(4):671-8. Erratum in: *Mol Ther*. 2009 Aug;17(8):1482. Miller, Dusty A [corrected to Miller, A Dusty]. PMID: 15451451

Bostick B, Ghosh A, Yue Y, Long C, Duan D. Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther*. 2007 Nov;14(22):1605-9. Epub 2007 Sep 27. PMID: 17898796

Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. PMID: 942051

Brady LJ, Brady PS, Gandour RD. Effect of methylglyoxal bis(guanylhydrazone) on hepatic, heart and skeletal muscle mitochondrial carnitine palmitoyltransferase and beta-oxidation of fatty acids. *Biochem Pharmacol*. 1987 Feb 15;36(4):447-52. PMID: 3827937

Brady MJ, Printen JA, Mastick CC, Saltiel AR. Role of protein targeting to glycogen (PTG) in the regulation of protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem*. 1997 Aug 8;272(32):20198-204. PMID: 9242697

Bremer J. The effect of fasting on the activity of liver carnitine palmitoyltransferase and its inhibition by malonyl-CoA. *Biochim Biophys Acta*. 1981 Sep 24;665(3):628-31. PMID: 7295757

Britton CH, Schultz RA, Zhang B, Esser V, Foster DW, McGarry JD. Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and

chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 14;92(6):1984-8. PMID: 7892212

Brunengraber DZ, McCabe BJ, Kasumov T, Alexander JC, Chandramouli V, Previs SF. Influence of diet on the modeling of adipose tissue triglycerides during growth. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Oct;285(4):E917-25. Epub 2003 Jun 10. PMID: 12799315

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000 Sep 22;289(5487):2122-5. PMID: 11000114

Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C, Tan S, Berkowitz K, Hodis HN, Azen SP. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes*. 2002 Sep;51(9):2796-803. PMID: 12196473

Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*. 1992 Dec 24;71(7):1195-204. PMID: 1473152

Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995 Aug 17;376(6541):599-602. PMID: 7637810

Burnett JR, Hooper AJ. Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser(447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Mol Ther*. 2009 Dec;11(6):681-91. PMID: 20072945

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000 Oct;25(2):169-93. Review. PMID: 11013345

Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004 Sep;15(3):155-66. Review. PMID: 15331581

## C

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):183-90. Epub 2005 Jan 30. PMID: 15685173

Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis*. 2009 Feb 1;199(3):381-90. PMID: 19133809

Cha SH, Rodgers JT, Puigserver P, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA triggers mitochondrial biogenesis and oxidative gene expression in skeletal muscle: Role of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 17;103(42):15410-5. Epub 2006 Oct 9. PMID: 17030788



Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, Li C, Samulski RJ, Walsh CE. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther*. 2000 Dec;2(6):619-23. PMID: 11124063

Chatelain F, Kohl C, Esser V, McGarry JD, Girard J, Pegorier JP. Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1996 Feb 1;235(3):789-98. PMID: 8654430

Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, Summers SA. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem*. 2003 Mar 21;278(12):10297-303. Epub 2003 Jan 13. PMID: 12525490

Chavez JA, Holland WL, Bär J, Sandhoff K, Summers SA. Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. *J Biol Chem*. 2005 May 20;280(20):20148-53. Epub 2005 Mar 17. PMID: 15774472

Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP, Ruderman NB. Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Aug;279(2):E259-65. PMID: 10913024

Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, Liu ZX, Kim S, Kulkarni A, Distefano A, Hwang YJ, Reznick RM, Codella R, Zhang D, Cline GW, Wakil SJ, Shulman GI. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 16;104(42):16480-5. Epub 2007 Oct 8. PMID: 17923673

Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, Yu XX, Liu ZX, Morino K, Kim S, Distefano A, Samuel VT, Neschen S, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Kahn M, Cline GW, Pandey SK, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Shulman GI. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2007 Aug 3;282(31):22678-88. Epub 2007 May 27. PMID: 17526931

Cook GA, Gamble MS. Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent  $K_i$  values for malonyl-CoA. *J Biol Chem*. 1987 Feb 15;262(5):2050-5. PMID: 2950085

Collins CL, Bode BP, Souba WW, Abcouwer SF. Multiwell  $^{14}\text{C}$ -capture assay for evaluation of substrate oxidation rates of cells in culture. *Biotechniques*. 1998 May;24(5):803-8. PMID: 9591130

Compher C, Badellino KO. Obesity and inflammation: lessons from bariatric surgery. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2008 Nov-Dec;32(6):645-7. Review. PMID: 18974245

Cortez-Pinto H, Zhi Lin H, Qi Yang S, Odwin Da Costa S, Diehl AM. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 1999 May;116(5):1184-93. PMID: 10220511

## D

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Rajesh G. A novel view of metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2004 Spring;2(1):2-8. PMID: 18370671

Dai Y, Wolfgang MJ, Cha SH, Lane MD. Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 3;359(3):469-74. Epub 2007 May 30. PMID: 17559810

Davidoff AM, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Nathwani AC. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):480-8. Epub 2003 Mar 13. PMID: 12637328

Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3428-32. PMID: 10688913

Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct;21(4):583-93. Review. PMID: 18854481

Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Fougelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*. 2006 Aug;55(8):2159-70. PMID: 16873678

Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NM, Magness S, Jobin C, Lund PK. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One*. 2010 Aug 16;5(8):e12191. PMID: 20808947

Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(11):1573-87. PMID: 10841516

Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2007 May;28(3):253-83. Epub 2007 Apr 4. Review. PMID: 17409288

## E

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. 2002 Jan 3;415(6867):96-9. PMID: 11780125

Eddy AA. Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Kidney Int*. 1996 Oct;50(4):1139-49. PMID: 8887271

Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. *Direct*

evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem.* 1993 Mar 15;268(8):5817-22. PMID: 8449948

Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD. Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem.* 1996 Mar 22;271(12):6972-7. PMID: 8636126

## F

Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 2009 Aug;15(8):930-9. Epub 2009 Jul 26. PMID: 19633656

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995 Dec 1;83(5):803-12. PMID: 8521497

Foust KD, Poirier A, Pacak CA, Mandel RJ, Flotte TR. Neonatal intraperitoneal or intravenous injections of recombinant adeno-associated virus type 8 transduce dorsal root ganglia and lower motor neurons. *Hum Gene Ther.* 2008 Jan;19(1):61-70. PMID: 18052722

Freidenberg GR, Reichart D, Olefsky JM, Henry RR. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J Clin Invest.* 1988 Oct;82(4):1398-406. PMID: 3170749

Fürnsinn C, Waldhäusl W. Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. *Diabetologia.* 2002 Sep;45(9):1211-23. Epub 2002 Jul 5. Review. PMID: 12242453

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004 Dec;114(12):1752-61. PMID: 15599400

## G

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Mar 25;316(2):129-39. Epub 2009 Aug 31. Review. PMID: 19723556

Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes.* 2005 Jul;54(7):1899-906. Review. PMID: 15983188

Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol.* 2004 Jun;78(12):6381-8. PMID: 15163731

Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther.* 2005 Jun;5(3):285-97. Review. PMID: 15975006

Gao L, Chiou W, Tang H, Cheng X, Camp HS, Burns DJ. Simultaneous quantification of malonyl-CoA and several other short-chain acyl-CoAs in animal tissues by ion-pairing reversed-phase HPLC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Jun 15;853(1-2):303-13. Epub 2007 Mar 31. PMID: 17442642

Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11854-9. Epub 2002 Aug 21. PMID: 12192090

Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit.* 2005 Apr;11(4):RA110-21. Epub 2005 Mar 24. Review. PMID: 15795707

González-Yanes C, Serrano A, Bermúdez-Silva FJ, Hernández-Dominguez M, Páez-Ochoa MA, Rodríguez de Fonseca F, Sánchez-Margalet V. Oleylethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Nov;289(5):E923-9. Epub 2005 May 10. PMID: 15886223

Govindasamy L, Padron E, McKenna R, Muzyczka N, Kaludov N, Chiorini JA, Agbandje-McKenna M. Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4. *Virology.* 2006 Dec;80(23):11556-70. Epub 2006 Sep 13. PMID: 16971437

Gregorevic P, Blankinship MJ, Chamberlain JS. Viral vectors for gene transfer to striated muscle. *Curr Opin Mol Ther.* 2004 Oct;6(5):491-8. Review. PMID: 15537050

Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 1999 Jun;48(6):1270-4. PMID: 10342815

Grimm D, Kay MA. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2003 Aug;3(4):281-304. Review. PMID: 12871018

Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A, Guyomard C. Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact.* 1999 Jun 1;121(1):7-16. Review. PMID: 10418967.

Guzmán M, Azzolin IR, Moulin CC, Perry ML. Pre- and postnatal protein undernutrition increases hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity and decreases enzyme sensitivity to inhibitors in the suckling rat. *Horm Metab Res.* 1992 Oct;24(10):471-3. PMID: 1464412

## H

Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol.* 2001 Jul;75(14):6615-24. PMID: 11413329

Hamel F, Grondin M, Denizeau F, Averill-Bates DA, Sarhan F. Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes. *Biotechnol Bioeng.* 2006 Nov 5;95(4):661-70. PMID: 16927246

Harwood HJ Jr. Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert Opin Ther Targets.* 2005 Apr;9(2):267-81. Review. PMID: 15934915

Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet.* 2005 Oct 1;366(9492):1197-209. Review. PMID: 16198769

Herrero L, Rubí B, Sebastián D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG. Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes.* 2005 Feb;54(2):462-71. PMID: 15677504

Hester ME, Foust KD, Kaspar RW, Kaspar BK. AAV as a gene transfer vector for the treatment of neurological disorders: novel treatment thoughts for ALS. *Curr Gene Ther.* 2009 Oct;9(5):428-33. Review. PMID: 19860657

Hoehn KL, Turner N, Swarbrick MM, Wilks D, Preston E, Phua Y, Joshi H, Furler SM, Larance M, Hegarty BD, Leslie SJ, Pickford R, Hoy AJ, Kraegen EW, James DE, Cooney GJ. Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. *Cell Metab.* 2010 Jan;11(1):70-6. PMID: 20074529

Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV Jr, Shelton DL, Hébert CC. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.* 2000 Aug 1;19(15):4046-55. PMID: 10921885

Holland WL, Knotts TA, Chavez JA, Wang LP, Hoehn KL, Summers SA. Lipid mediators of insulin resistance. *Nutr Rev.* 2007 Jun;65(6 Pt 2):S39-46. Review. PMID: 17605313

Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):12027-32. Epub 2003 Sep 25. PMID: 14512514

Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 2007 Apr;56(4):901-11. PMID: 17395738

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan 1;259(5091):87-91. PMID: 7678183

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121):860-7. Review. PMID: 17167474

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 1996 May 3;271(18):10697-703. PMID: 8631877

Hulver MW, Berggren JR, Cortright RN, Dudek RW, Thompson RP, Pories WJ, MacDonald KG, Cline GW, Shulman GI, Dohm GL, Houmard JA. Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Apr;284(4):E741-7. Epub 2002 Dec 27. PMID: 12626325

Hundal RS, Salh BS, Schrader JW, Gómez-Muñoz A, Duronio V, Steinbrecher UP. Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis through activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. *J Lipid Res.* 2001 Sep;42(9):1483-91. PMID: 11518769

## I

Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA, Nakai H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther.* 2006 Jul;14(1):45-53. Epub 2006 May 19. PMID: 16713360

Ishigaki Y, Katagiri H, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Shimosegawa T, Sakoda H, Asano T, Oka Y. Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes.* 2005 Feb;54(2):322-32. PMID: 15677488

Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and inflammation. *Diabetes.* 2009 Jul;58(7):1550-7. Epub 2009 Apr 7. PMID: 19351711

## J

Jabůrek M, Varecha M, Gimeno RE, Dembski M, Jezek P, Zhang M, Burn P, Tartaglia LA, Garlid KD. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem.* 1999 Sep 10;274(37):26003-7. PMID: 10473545

## K

Kahn SE, Montgomery B, Howell W, Ligueros-Saylan M, Hsu CH, Devineni D, McLeod JF, Horowitz A, Foley JE. Importance of early phase insulin secretion to intravenous glucose tolerance in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec;86(12):5824-9. PMID: 11739446

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5):2111-9. PMID: 7738178

Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, Neschen S, Kahn BB, Kahn CR, Shulman GI. Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest.* 2000 Jun;105(12):1791-7. PMID: 10862794

Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2001 Apr 6;276(14):11252-6. Epub 2001 Feb 15. PMID: 11278254

King H. Epidemiology of glucose intolerance and gestational diabetes in women of childbearing age. *Diabetes Care*. 1998 Aug;21 Suppl 2:B9-13. PMID: 9704221

Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P, Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H, Glücksmann-Kuis MA, Carlson GA, Duyk GM, Moore KJ. Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family. *Cell*. 1996 Apr 19;85(2):281-90. PMID: 8612280

Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;94(9):4318-23. PMID: 9113987

Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology*. 2005 Aug;146(8):3417-27. Epub 2005 Apr 21. PMID: 15845623

Koeberl DD, Pinto C, Sun B, Li S, Kozink DM, Benjamin DK Jr, Demaster AK, Kruse MA, Vaughn V, Hillman S, Bird A, Jackson M, Brown T, Kishnani PS, Chen YT. AAV vector-mediated reversal of hypoglycemia in canine and murine glycogen storage disease type Ia. *Mol Ther*. 2008 Apr;16(4):665-72. Epub 2008 Mar 11. PMID: 18362924

Kohli R, Pan X, Malladi P, Wainwright MS, Whittington PF. Mitochondrial reactive oxygen species signal hepatocyte steatosis by regulating the phosphatidylinositol 3-kinase cell survival pathway. *J Biol Chem*. 2007 Jul 20;282(29):21327-36. Epub 2007 May 31. PMID: 17540768

Kramer MG, Barajas M, Razquin N, Berraondo P, Rodrigo M, Wu C, Qian C, Fortes P, Prieto J. In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Mol Ther*. 2003 Mar;7(3):375-85. PMID: 12668133

Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*. 2001;19(5):378-87. Review. PMID: 11553846

## L

Lagor WR, Brown RJ, Toh SA, Millar JS, Fuki IV, de la Llera-Moya M, Yuen T, Rothblat G, Billheimer JT, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein F reduces HDL cholesterol levels in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jan;29(1):40-6. Epub 2008 Nov 13. PMID: 19008531

Leberherz C, Maguire A, Tang W, Bennett J, Wilson JM. Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J Gene Med*. 2008 Apr;10(4):375-82. PMID: 18278824

Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol*. 2007 Jul;47(1):142-56. Epub 2007 Apr 16. Review. PMID: 17512085

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliwer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-

activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):12953-6. PMID: 7768881

Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med.* 1995 Mar 9;332(10):621-8. Erratum in: *N Engl J Med* 1995 Aug 10;333(6):399. PMID: 7632212

Levine JA, Eberhardt NL, Jensen MD. Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans. *Science.* 1999 Jan 8;283(5399):212-4. PMID: 9880251

Li J, DeFea K, Roth RA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem.* 1999 Apr 2;274(14):9351-6. PMID: 10092613

Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med.* 1993 Dec 30;329(27):1988-92. PMID: 8247074

Liu EH, Rother KI, Harlan DM. Islet transplantation and the challenges of treating type 1 diabetes. *Discov Med.* 2005 Feb;5(25):43-9. PMID: 20704922

Liu J, Huang J, Lin T, Zhang C, Yin X. Cell-to-cell contact induces human adipose tissue-derived stromal cells to differentiate into urothelium-like cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 18;390(3):931-6. Epub 2009 Oct 21. PMID: 19852942

Lochrie MA, Tatsuno GP, Arbetman AE, Jones K, Pater C, Smith PH, McDonnell JW, Zhou SZ, Kachi S, Kachi M, Campochiaro PA, Pierce GF, Colosi P. Adeno-associated virus (AAV) capsid genes isolated from rat and mouse liver genomic DNA define two new AAV species distantly related to AAV-5. *Virology.* 2006 Sep 15;353(1):68-82. Epub 2006 Jun 30. PMID: 16806384

Loiler SA, Conlon TJ, Song S, Tang Q, Warrington KH, Agarwal A, Kapturczak M, Li C, Ricordi C, Atkinson MA, Muzyczka N, Flotte TR. Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther.* 2003 Sep;10(18):1551-8. PMID: 12907946

Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nat Med.* 2009 Aug;15(8):846-7. PMID: 19661987

## M

Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med.* 2009 Jul;87(7):679-95. Epub 2009 Apr 8. Review. PMID: 19352614

Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi J. Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. *J Lipid Res.* 2006 Sep;47(9):1928-39. Epub 2006 Jun 2. PMID: 16751624

Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology.* 2009 Sep;50(3):957-69. Review. PMID: 19585655



Marchesini G, Natale S, Manini R, Agostini F. Review article: the treatment of fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Nov;22 Suppl 2:37-9. PMID: 16225470

McCarty DM, Young SM Jr, Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet.* 2004;38:819-45. Review. PMID: 15568995

McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J.* 1983 Jul 15;214(1):21-8. PMID: 6615466

McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 1997 Feb 15;244(1):1-14. Review. PMID: 9063439

McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002 Jan;51(1):7-18. PMID: 11756317

Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 2009 Sep;42(13-14):1331-46. Epub 2009 Jun 6. Review. PMID: 19501581

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell.* 2000 Jul;6(1):87-97. PMID: 10949030

Mills SE, Foster DW, McGarry JD. Interaction of malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem J.* 1983 Jul 15;214(1):83-91. PMID: 6615474

Minkler PE, Kerner J, Kasumov T, Parland W, Hoppel CL. Quantification of malonyl-coenzyme A in tissue specimens by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2006 May 1;352(1):24-32. Epub 2006 Mar 2. PMID: 16545769

Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, Okada T, Urabe M, Kume A, Sakata Y, Ozawa K. Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther.* 2006 Sep;17(9):921-8. PMID: 16972760

Moldéus P, Högberg J, Orrenius S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol.* 1978;52:60-71. PMID: 672656

Monetti M, Levin MC, Watt MJ, Sajan MP, Marmor S, Hubbard BK, Stevens RD, Bain JR, Newgard CB, Farese RV Sr, Hevener AL, Farese RV Jr. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab.* 2007 Jul;6(1):69-78. PMID: 17618857

Morillas M, Clotet J, Rubí B, Serra D, Asins G, Ariño J, Hegardt FG. Identification of the two histidine residues responsible for the inhibition by malonyl-CoA in peroxisomal carnitine octanoyltransferase from rat liver. *FEBS Lett.* 2000 Jan 21;466(1):183-6. PMID: 10648838

Morillas M, Gómez-Puertas P, Roca R, Serra D, Asins G, Valencia A, Hegardt FG. Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):45001-8. Epub 2001 Sep 11. PMID: 11553629

Morillas M, Gómez-Puertas P, Rubí B, Clotet J, Ariño J, Valencia A, Hegardt FG, Serra D, Asins G. Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I: mutational analysis of a malonyl-CoA affinity domain. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11473-80. Epub 2002 Jan 14. PMID: 11790793

Morillas M, Gómez-Puertas P, Bentebibel A, Sellés E, Casals N, Valencia A, Hegardt FG, Asins G, Serra D. Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):9058-63. Epub 2002 Dec 23. PMID: 12499375

Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev.* 2007 Aug;28(5):463-91. Epub 2007 May 24. Review. PMID: 17525361

Muoio DM, Koves TR. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007 Oct;32(5):874-83. Review. PMID: 18059612

Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(2):232-9. PMID: 15254590

Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;158:97-129. Review. PMID: 1316261

## N

Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 10;97(21):11371-6. PMID: 11027337

Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet.* 1995 Jun;10(2):135-42. PMID: 7663508

Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):6969-76. PMID: 11435577

Nakai H, Wu X, Fuess S, Storm TA, Munroe D, Montini E, Burgess SM, Grompe M, Kay MA. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol.* 2005 Mar;79(6):3606-14. PMID: 15731255

Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem.* 2009 May 29;284(22):14809-18. Epub 2009 Mar 30. PMID: 19332540

Nam HJ, Lane MD, Padron E, Gurda B, McKenna R, Kohlbrenner E, Aslanidi G, Byrne B, Muzyczka N, Zolotukhin S, Agbandje-McKenna M. Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *Virology.* 2007 Nov;81(22):12260-71. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17728238

Neschen S, Morino K, Hammond LE, Zhang D, Liu ZX, Romanelli AJ, Cline GW, Pongratz RL, Zhang XM, Choi CS, Coleman RA, Shulman GI. Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. *Cell Metab.* 2005 Jul;2(1):55-65. PMID: 16054099

## O

Oelze I, Rittner K, Sczakiel G. Adeno-associated virus type 2 rep gene-mediated inhibition of basal gene expression of human immunodeficiency virus type 1 involves its negative regulatory functions. *Virology.* 1994 Feb;68(2):1229-33. PMID: 8289357

Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010 Mar 17;72:219-46. Review. PMID: 20148674

## P

Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet.* 2007 Jan 6;369(9555):71-7. Review. PMID: 17208644

Park EA, Mynatt RL, Cook GA, Kashfi K. Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochem J.* 1995 Sep 15;310 ( Pt 3):853-8. PMID: 7575418

Pattyn F, Speleman F, De Paepe A, Vandesompele J. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):122-3. PMID: 12519963

Pattyn F, Robbrecht P, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database, major update 2006. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D684-8. PMID: 16381959

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997 Nov 21;272(47):29911-8. PMID: 9368067

Pérusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Snyder E, Sands J, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2000 update. *Obes Res.* 2001 Feb;9(2):135-69. Review. PMID: 11316348

- Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol.* 2005 Jun;42(6):928-40. Epub 2005 Mar 26. Review. PMID: 15885365
- Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jun;22 Suppl 1:S20-7. Review. Erratum in: *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Mar;23(3):501-2. PMID: 17567459
- Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(2):165-9. Review. PMID: 10903329
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004 Mar;26(6):509-15. PMID: 15127793
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45. PMID: 11328886
- Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res.* 2002 Dec;10 Suppl 2:97S-104S. Review. PMID: 12490658
- Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA, Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Nov 12. [Epub ahead of print] PMID: 21075071
- Pørksen N, Hollingdal M, Juhl C, Butler P, Veldhuis JD, Schmitz O. Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes. *Diabetes.* 2002 Feb;51 Suppl 1:S245-54. Review. PMID: 11815487
- Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008 Mar;118(3):829-38. Review. PMID: 18317565
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001 Jul 18;286(3):327-34. PMID: 11466099
- Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15;275(50):38990-4. PMID: 10995761
- Price NT, Jackson VN, van der Leij FR, Cameron JM, Travers MT, Bartelds B, Huijkman NC, Zammit VA. Cloning and expression of the liver and muscle isoforms of ovine carnitine palmitoyltransferase 1: residues within the N-terminus of the muscle isoform influence the kinetic properties of the enzyme. *Biochem J.* 2003 Jun 15;372(Pt 3):871-9. PMID: 12662154
- Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia.* 2004 Feb;47(2):170-84. Epub 2004 Jan 13. Review. PMID: 14722654

## Q

Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007 Jul 14;13(26):3540-53. Review. PMID: 17659704

## R

Reaven GM. Syndrome X. *Blood Press Suppl*. 1992;4:13-6. Review. PMID: 1345329

Redman LM, Heilbronn LK, Martin CK, de Jonge L, Williamson DA, Delany JP, Ravussin E; Pennington CALERIE Team. Metabolic and behavioral compensations in response to caloric restriction: implications for the maintenance of weight loss. *PLoS One*. 2009;4(2):e4377. Epub 2009 Feb 9. PMID: 19198647

Roche TE, Hiromasa Y. Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Apr;64(7-8):830-49. Review. PMID: 17310282

Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Massé F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitout V, Prentki M. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):1007-19. PMID: 15047616

Rössner S. Can obesity be an infectious disease? *Lakartidningen*. 2005 Jun 13-26;102(24-25):1896-8. Review. Swedish. PMID: 16044770

Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45777-84. Epub 2003 Sep 2. PMID: 12952969

Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol*. 1999 Jan;276(1 Pt 1):E1-E18. Review. PMID: 9886945

## S

Saggerson ED, Carpenter CA. Effects of fasting and malonyl CoA on the kinetics of carnitine palmitoyltransferase and carnitine octanoyltransferase in intact rat liver mitochondria. *FEBS Lett*. 1981 Sep 28;132(2):166-8. PMID: 7297689

Saggerson D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:253-72. Review. PMID: 18598135

Saggerson ED, Carpenter CA. Response to starvation of hepatic carnitine palmitoyltransferase activity and its regulation by malonyl-CoA. Sex differences and effects of pregnancy. *Biochem J*. 1982 Dec 15;208(3):673-8. PMID: 7165725

Saggerson ED, Carpenter CA, Tselentis BS. Effects of thyroidectomy and starvation on the activity and properties of hepatic carnitine palmitoyltransferase. *Biochem J*. 1982 Dec 15;208(3):667-72. PMID: 7165724

Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, Apazidis A, Witters LA, Shafrir E, Ruderman NB. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am J Physiol*. 1997 Apr;272(4 Pt 1):E641-8. PMID: 9142886

Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1526-31. Epub 2009 Apr 28. PMID: 19401428

Samulski RJ, Srivastava A, Berns KI, Muzyczka N. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell*. 1983 May;33(1):135-43. PMID: 6088052

Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by *rac1* and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*. 2000 Oct;74(19):9184-96. PMID: 10982365

Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu ZX, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Cline GW, Yu XX, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Shulman GI. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):817-24. Epub 2006 Feb 16. PMID: 16485039

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):26746-9. PMID: 7592907

Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):24202-10. PMID: 10446195

Schoonjans K, Auwerx J. Thiazolidinediones: an update. *Lancet*. 2000 Mar 18;355(9208):1008-10. PMID: 10768450

Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther*. 2008 Jul;16(7):1189-99. Epub 2008 May 20. Review. PMID: 18500252

Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem*. 1999 Oct 15;274(42):30028-32. PMID: 10514488

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):171-6. Review. PMID: 10903330

Sebastián D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG. CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Mar;292(3):E677-86. Epub 2006 Oct 24. PMID: 17062841

Seppen J, Bakker C, de Jong B, Kunne C, van den Oever K, Vandenberghe K, de Waart R, Twisk J, Bosma P. Adeno-associated virus vector serotypes mediate

sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats. *Mol Ther.* 2006 Jun;13(6):1085-92. Epub 2006 Apr 3. PMID: 16581301

Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Dec;27 Suppl 3:S49-52. Review. PMID: 14704745

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1793-801. Review. Erratum in: *J Clin Invest.* 2006 Aug;116(8):2308. PMID: 16823477

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007 May;132(6):2169-80. Review. PMID: 17498510

Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Ureña J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem.* 2008 Mar 14;283(11):6878-85. Epub 2008 Jan 11. Erratum in: *J Biol Chem.* 2008 May 2;283(18):12680. PMID: 18192268

Smith SJ, Cases S, Jensen DR, Chen HC, Sande E, Tow B, Sanan DA, Raber J, Eckel RH, Farese RV Jr. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet.* 2000 May;25(1):87-90. PMID: 10802663

Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee MS, Karin M. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 31;103(44):16454-9. Epub 2006 Oct 18. PMID: 17050683

Sparks JD, Sparks CE. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Nov 17;1215(1-2):9-32. Review. PMID: 7948013

Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim.* 2008 Oct;42(4):413-32. Epub 2008 Sep 9. Review. PMID: 18782824

Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 May;294(5):E969-77. Epub 2008 Mar 18. PMID: 18349115

Stefater MA, Seeley RJ. Central nervous system nutrient signaling: the regulation of energy balance and the future of dietary therapies. *Annu Rev Nutr.* 2010 Aug 21;30:219-35. Review. PMID: 20225935

Steinbeck K. Obesity and nutrition in adolescents. *Adolesc Med State Art Rev.* 2009 Dec;20(3):900-14, ix. Review. PMID: 20653208

Stieger K, Chauveau C, Rolling F. Preclinical studies on specific gene therapy for recessive retinal degenerative diseases. *Curr Gene Ther.* 2010 Oct 1;10(5):389-403. PMID: 20718697

Stock MJ, Rothwell NJ. Evidence for diet-induced thermogenesis in hyperphagic cafeteria-fed rats. *Proc Nutr Soc.* 1982 Jun;41(2):133-5. PMID: 6955799

Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM, Farese RV Jr. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem*. 2004 Mar 19;279(12):11767-76. Epub 2003 Dec 10. PMID: 14668353

Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007 Dec;56(12):2910-8. Epub 2007 Sep 11. PMID: 17848624

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005 Apr 9-15;365(9467):1333-46. Review. PMID: 15823385

Sugden MC, Holness MJ. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem*. 2006 Jul;112(3):139-49. Review. PMID: 17132539

Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*. 2006 Jan;45(1):42-72. Epub 2005 Dec 19. Review. PMID: 16445986

Sun XJ, Miralpeix M, Myers MG Jr, Glasheen EM, Backer JM, Kahn CR, White MF. Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J Biol Chem*. 1992 Nov 5;267(31):22662-72. PMID: 1385403

Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 1988 Sep;37(9):1163-7. PMID: 3044882

## T

Takeda S, Takahashi M, Mizukami H, Kobayashi E, Takeuchi K, Hakamata Y, Kaneko T, Yamamoto H, Ito C, Ozawa K, Ishibashi K, Matsuzaki T, Takata K, Asano Y, Kusano E. Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: comparison among adeno-associated virus serotype 1-5 vectors in vitro and in vivo. *Nephron Exp Nephrol*. 2004;96(4):e119-26. PMID: 15122061

Thomas CE, Storm TA, Huang Z, Kay MA. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol*. 2004 Mar;78(6):3110-22. PMID: 14990730

Thrasher AJ, Gaspar HB. Gene therapy for lympho-hematopoietic disorders. *Curr Hematol Rep*. 2005 Jul;4(4):305-9. PMID: 16009046

Thumelin S, Esser V, Charvy D, Kolodziej M, Zammit VA, McGarry D, Girard J, Pegorier JP. Expression of liver carnitine palmitoyltransferase I and II genes during development in the rat. *Biochem J*. 1994 Jun 1;300 ( Pt 2):583-7. PMID: 8002965

Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*. 2008 Mar-Apr;14(3-4):222-31. Review. PMID: 18235842

Trollet C, Athanasopoulos T, Popplewell L, Malerba A, Dickson G. Gene therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Jul;9(7):849-66. Review. PMID: 19527108



Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jun;9(6):465-82. Review. PMID: 20514071

Tsutsui T, Koide H, Fukahori H, Isoda K, Higashiyama S, Maeda I, Tashiro F, Yamato E, Miyazaki J, Yodoi J, Kawase M, Yagi K. Adenoviral transfection of hepatocytes with the thioredoxin gene confers protection against apoptosis and necrosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Aug 8;307(4):765-70. PMID: 12878175

## U

Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther.* 2002 Nov 1;13(16):1935-43. PMID: 12427305

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature.* 1997 Oct 9;389(6651):610-4. PMID: 9335502

## V

Vandenberghe LH, Wilson JM, Gao G. Ailoring the AAV vector capsid for gene therapy. *Gene Ther.* 2009 Mar;16(3):311-9. Epub 2008 Dec 4. Review. MID: 19052631

Vandendriessche T, Thorrez L, Acosta-Sanchez A, Petrus I, Wang L, Ma L, DE Waele L, Iwasaki Y, Gillijns V, Wilson JM, Collen D, Chuah MK. Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *J Thromb Haemost.* 2007 Jan;5(1):16-24. Epub 2006 Sep 26. PMID: 17002653

Veerkamp JH, Zevenbergen JL. Effect of dietary fat on total and peroxisomal fatty acid oxidation in rat tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Aug 14;878(1):102-9. PMID: 3730409

Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol.* 2000 Mar;20(5):1868-76. PMID: 10669761

Velasco G, Gómez del Pulgar T, Carling D, Guzmán M. Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett.* 1998 Nov 20;439(3):317-20. PMID: 9845345

Velasco G, Geelen MJ, Gómez del Pulgar T, Guzmán M. Malonyl-CoA-independent acute control of hepatic carnitine palmitoyltransferase I activity. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and cytoskeletal components. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21497-504. PMID: 9705278

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1999 Apr;103(7):931-43. PMID: 10194465

## W

Wang C, Wang CM, Clark KR, Sferra TJ. Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther.* 2003 Aug;10(17):1528-34. PMID: 12900769

Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med.* 1990 Dec 15;113(12):909-15. PMID: 2240915

Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D, Chérel Y, Chenuaud P, Samulski J, Moullier P, Rolling F. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther.* 2003 Jun;7(6):774-81. PMID: 12788651

Weickert MO, Pfeiffer AF. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2006 Aug;49(8):1732-41. Epub 2006 May 23. Review. PMID: 16718463

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Jr. J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1796-808. PMID: 14679176

Wheeler D. Using GenBank. *Methods Mol Biol.* 2007;406:23-59. PMID: 18287687

White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem.* 1998 May;182(1-2):3-11. Review. PMID: 9609109

Wing RR, Phelan S. Long-term weight loss maintenance. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jul;82(1 Suppl):222S-225S. Review. PMID: 16002825

Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, Suwa A, Asaumi M, Matsumoto S, Cha SH, Shimokawa T, Lane MD. The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 9;103(19):7282-7. Epub 2006 May 1. PMID: 16651524

## X

Xiao WD, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol.* 1999 May;73(5):3994-4003. PMID: 10196295

Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, Chapman MS. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10405-10. Epub 2002 Jul 22. PMID: 12136130

## Y

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura

S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1288-95. Epub 2002 Oct 7. PMID: 12368907

Yan Z, Zak R, Luxton GW, Ritchie TC, Bantel-Schaal U, Engelhardt JF. Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol.* 2002 Mar;76(5):2043-53. PMID: 11836382

Young JB. Diabetes, obesity, and heart failure: the new pandemic. *Methodist Debakey Cardiovasc J.* 2010 Apr-Jun;6(2):20-6. Review. PMID: 20661189

## Z

Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 2009 May;9(5):407-16. Review. PMID: 19416711

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32. Erratum in: *Nature* 1995 Mar 30;374(6521):479. PMID: 7984236

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):782-7. Review. PMID: 11742409

Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 2008 Jun;16(6):1073-80. Epub 2008 Apr 15. PMID: 18414476

Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1965 Oct 8;131(1):447-58. PMID: 5216982

**ANNEX**

---

---



## ANNEX I

Alineament de les isoformes de CPT1A de rata i ratolí. Ambdues seqüències presenten una similitud del 96%.

```
CPT1A_Mus_musculus      MAEAHQAVAFQFTVTPDGIDLRLSHEALKQICLSGLHSWKKKFFIRFKNGI 50
CPT1A_Rattus_norvegicus MAEAHQAVAFQFTVTPDGIDLRLSHEALKQICLSGLHSWKKKFFIRFKNGI 50
*****

CPT1A_Mus_musculus      ITGVFPASPSSWLIVVGVISSMHTKVDPSLGMIAKINRTLDTTGRMSSQ 100
CPT1A_Rattus_norvegicus ITGVFPANPSSWLIVVGVISSMHTKVDPSLGMIAKISRSLDTTGRMSSQ 100
*****.*****:*****.*****

CPT1A_Mus_musculus      TKNIVSGVLFGTGLWVAIIMTMRYSLKVLVLSYHGWMFAEHGKMSCSTRIW 150
CPT1A_Rattus_norvegicus TKNIVSGVLFGTGLWVAIIMTMRYSLKVLVLSYHGWMFAEHGKMSRSTKIW 150
*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      MAMVKVFSGRKPMLYSFQTSLPRLPVPAVKDTSRYLESVSRPLMKEGDFQ 200
CPT1A_Rattus_norvegicus MAMVKVLSGRKPMLYSFQTSLPRLPVPAVKDTSRYLESVSRPLMKEEDFQ 200
*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      RMTALAQDFAVNLGPKLQWYLKLSWATNYVSDWWEYIYLRGRGPIMV 250
CPT1A_Rattus_norvegicus RMTALAQDFAVNLGPKLQWYLKLSWATNYVSDWWEYIYLRGRGPLMV 250
*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      NSNYAMEMLYITPTHIQAARAGNTIHAILLYRRTVDREELKPIRLLGST 300
CPT1A_Rattus_norvegicus NSNYAMEMLYITPTHIQAARAGNTIHAILLYRRTLDREELKPIRLLGST 300
*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      IPLCSAQWERLFNTSRIPGEETDTIQHVKDSRHIVVYHRGRYFKVWLYHD 350
CPT1A_Rattus_norvegicus IPLCSAQWERLFNTSRIPGEETDTIQHIKDSRHIVVYHRGRYFKVWLYHD 350
*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      GRLLRPRELEQQMQIILDDTSEFPQGEAKLAALTAADRVPWAKCRQTYFA 400
CPT1A_Rattus_norvegicus GRLLRPRELEQQMQIILDDPSEFPQGEAKLAALTAADRVPWAKCRQTYFA 400
*****.*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      RGKNKQSLDAVEKAAFFVTLDESEQGYREEDPEASIDSYAKSLLHGRCFD 450
CPT1A_Rattus_norvegicus RGKNKQSLDAVEKAAFFVTLDESEQGYREEDPEASIDSYAKSLLHGRCFD 450
*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      RWFDKSITFVVFKNKIGINAESWADAPVGHVWEYVMATDVFQLGYSE 500
CPT1A_Rattus_norvegicus RWFDKSITFVVFKNKIGINAESWADAPVGHVWEYVMATDVFQLGYSE 500
*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      DGHCKGDKNPNIKPKTRLQWDIPGECQEVIEIETSLSSASFLANDVDLHSP 550
CPT1A_Rattus_norvegicus DGHCKGDTNPNIKPKTRLQWDIPGECQEVIDASLSSASLLANDVDLHSP 550
*****.*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      FDTFGKGLIKKCRTPDAFIQLALQLAHYKDMGKFCLTYEASMTRLFREG 600
CPT1A_Rattus_norvegicus FDSFGKGLIKKCRTPDAFIQLALQLAHYKDMGKFCLTYEASMTRLFREG 600
**:*:*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      RTETVRSCTTESCNFVLAAMDPTTAEQRFLFKIACEKHQHLRYRLAMTG 650
CPT1A_Rattus_norvegicus RTETVRSCTMESCNFVQAMMDPKSTAEQRLKLFKIAKQHLRYRLAMTG 650
***** **:*:*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      AGIDRHLFCLYVVSXYLAVDSPFLKEVLSEPWRLSTSQTTPQQVQLDFDFE 700
CPT1A_Rattus_norvegicus AGIDRHLFCLYVVSXYLAVDSPFLKEVLSEPWRLSTSQTTPQQVQLDFDFE 700
*****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      KYPDYVSCGGGFGPVADDGYGVSYIIVGENFIHFHISSKFSSPETDSHRF 750
CPT1A_Rattus_norvegicus KNPDYVSCGGGFGPVADDGYGVSYIIVGENFIHFHISSKFSSPETDSHRF 750
* *****:*****:***** **

CPT1A_Mus_musculus      GKHLRQAMMDIITLFLGTANSK 773
CPT1A_Rattus_norvegicus GKHLRQAMMDIITLFLGTINSK 773
***** **
```



**PUBLICACIONES**

---

---





**PUBLICACIONS**

1) Sebastián D, Guitart M, García-Martínez C, Mauvezin C, **Orellana-Gavaldà JM**, Serra D, Gómez-Foix AM, Hegardt FG, Asins G. Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *J Lipid Res.* 2009 Sep;50(9):1789-99. Epub 2009 May 9. PMID: 19429947

2) **Orellana-Gavaldà JM**, Herrero L, Malandrino MI, Pañeda A, Rodríguez-Peña MS, Petry H, Asins G, Van Deventer S, Hegardt FG, Serra D. Molecular Therapy for Obesity and Diabetes Based on a Long-Term Increase in Hepatic Fatty-Acid Oxidation. *Hepatology.* *Acceptat el 13 de desembre del 2010. Accepted manuscript online: 22 DEC 2010 03:59PM EST | DOI: 10.1002/hep.24140*

# Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells

David Sebastián,<sup>\*,†</sup> Maria Guitart,<sup>§,\*\*</sup> Celia García-Martínez,<sup>§,\*\*</sup> Caroline Mauvezin,<sup>\*</sup> Josep M. Orellana-Gavaldà,<sup>\*,†</sup> Dolors Serra,<sup>\*,†</sup> Anna M. Gómez-Foix,<sup>§,\*\*</sup> Fausto G. Hegardt,<sup>1,\*,†</sup> and Guillermina Asins<sup>\*,†</sup>

Departments of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy\* and School of Biology,<sup>§</sup> University of Barcelona, Barcelona, Spain; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición,<sup>†</sup> Barcelona, Spain; and CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas,<sup>\*\*</sup> Barcelona, Spain

**Abstract** Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) catalyzes the first step in long-chain fatty acid import into mitochondria, and it is believed to be rate limiting for  $\beta$ -oxidation of fatty acids. However, in muscle, other proteins may collaborate with CPT1. Fatty acid translocase/CD36 (FAT/CD36) may interact with CPT1 and contribute to fatty acid import into mitochondria in muscle. Here, we demonstrate that another membrane-bound fatty acid binding protein, fatty acid transport protein 1 (FATP1), collaborates with CPT1 for fatty acid import into mitochondria. Overexpression of FATP1 using adenovirus in L6E9 myotubes increased both fatty acid oxidation and palmitate esterification into triacylglycerides. Moreover, immunocytochemistry assays in transfected L6E9 myotubes showed that FATP1 was present in mitochondria and coimmunoprecipitated with CPT1 in L6E9 myotubes and rat skeletal muscle in vivo. The cooverexpression of FATP1 and CPT1 also enhanced mitochondrial fatty acid oxidation, similar to the cooverexpression of FAT/CD36 and CPT1. However, etomoxir, an irreversible inhibitor of CPT1, blocked all these effects. These data reveal that FATP1, like FAT/CD36, is associated with mitochondria and has a role in mitochondrial oxidation of fatty acids.—Sebastián, D., M. Guitart, C. García-Martínez, C. Mauvezin, J. M. Orellana-Gavaldà, D. Serra, A. M. Gómez-Foix, F. G. Hegardt, and G. Asins. **Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells.** *J. Lipid Res.* 2009. 50: 1789–1799.

**Supplementary key words** carnitine palmitoyltransferase 1 • malonyl-CoA • mitochondria • FAT/CD36

This study was supported by Grant SAF2007-61926 from the Ministerio de Educación y Ciencia; by Grant C3/08 from the Fondo de Investigación Sanitaria of the Instituto de Salud Carlos III; by the Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya (2005SGR-00733), Spain (to F.G.H.), and by Grants SAF2006-07228 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and REDIMET RD06/0015/0018 (to A.M.G-F.). CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición and CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas are an initiative of Instituto de Salud Carlos III.

\* Author's Choice—Final version full access.

Manuscript received 17 October 2008 and in revised form 18 February 2009 and in re-revised form 6 April 2009 and in re-revised form 7 May 2009.

Published, JLR Papers in Press, May 9, 2009  
DOI 10.1194/jlr.M800535-JLR200

Fatty acids are a major energy source for skeletal muscle. They are transported into the cell via a protein-mediated mechanism, involving fatty acid translocase/CD36 (FAT/CD36), plasma-membrane-associated fatty acid binding protein, and fatty acid transport protein (FATP1-6) (1). Once inside the cell, fatty acids can be esterified, metabolized to lipid second messengers, such as leukotrienes and eicosanoids, or  $\beta$ -oxidized in the mitochondrion. The first step of the oxidative pathway is the transport of fatty acids into the mitochondrial matrix. This step is controlled by the carnitine palmitoyltransferase (CPT) system, consisting of CPT1, acylcarnitine translocase, and CPT2 (2).

CPT1 catalyzes the conversion of long-chain fatty acyl-CoAs to acylcarnitines in the presence of L-carnitine and is the rate-limiting step in the transport of long-chain fatty acids (LCFAs) from the cytoplasm to the mitochondrial matrix, where they undergo  $\beta$ -oxidation. CPT1 is tightly regulated by its physiological inhibitor malonyl-CoA. This regulation allows CPT1 to signal the availability of lipid and carbohydrate fuels to the cell (2). Mammalian tissues express three isoforms: CPT1A (liver), CPT1B (muscle and heart), and CPT1C (brain) (3–5).

Owing to the metabolic peculiarities of muscle, the regulation of CPT1B by malonyl-CoA is more complex than that of CPT1A in liver. The regulation of muscle CPT1 by malonyl-CoA cannot fully explain changes in mitochondrial fatty acid import. Thus, malonyl-CoA is not responsible for the increase in fatty acid oxidation during the transition from low to moderate aerobic exercise or for the decrease in fatty

Abbreviations: ASP, acid-soluble product; COI, subunit I of cytochrome c oxidase; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmic reticulum; FATP1, fatty acid transport protein 1; FAT/CD36, fatty acid translocase/CD36; GFP, green fluorescent protein; KRBH, Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer; LCFA, long-chain fatty acid; MKRH, modified Krebs Ringer HEPES; NEPalm, nonesterified palmitate; PL, phospholipid; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TG, triacylglyceride.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.  
e-mail: fgarciaheg@ub.edu

acid oxidation during more strenuous exercise (6–8). Moreover, concentrations of malonyl-CoA measured in muscle (1–4  $\mu\text{M}$ ) (9, 10) should inhibit CPT1 activity at any time, since the  $\text{IC}_{50}$  of CPT1B for malonyl-CoA is much lower than this concentration ( $\sim 0.03 \mu\text{M}$ ). Several hypotheses have been advanced to explain this discordance between malonyl-CoA levels, CPT1 regulation, and LCFA oxidation in muscle. Thus, alteration in compartmentalization/cellular distribution of malonyl-CoA may be involved in the control of CPT1 activity. It has been proposed that the malonyl-CoA involved in CPT1 regulation is that synthesized by acetyl-CoA carboxylase 2, which resides in the vicinity of CPT1 in the outer mitochondrial membrane and modulates CPT1 activity (11). Moreover, other proteins could also be involved in the transport of fatty acids into mitochondria. Thus, Bonen and coworkers demonstrated that exercise induces the translocation of FAT/CD36 to mitochondria, thus increasing muscle fatty acid oxidation (12).

FATPs are a family of membrane-bound proteins that catalyze the ATP-dependent esterification of LCFA and very-LCFA to their acyl-CoA derivatives (13–15). Mammals express six different forms of FATP (FATP1–6) with tissue-specific expression patterns (14). FATP1 is a 63 kDa protein that is expressed in cells and tissues with high levels of fatty acid uptake for metabolism or storage, such as skeletal muscle and adipose tissue (15). The regulatory role of FATP1 in metabolism has been partially elucidated by gene manipulation. Overexpression of FATP1 in cultured fibroblasts increases fatty acid uptake (16). Cardiac-specific overexpression of FATP1 in transgenic mice increases myocardial fatty acid uptake and free FA accumulation, but not triacylglyceride (TG) levels, and enhances palmitate oxidation leading to a lipotoxic cardiomyopathy (17). In contrast, when overexpressed in cultured human skeletal myotubes, FATP1 stimulates FA uptake and storage as TG, but not oxidation (18). Deletion of FATP1 protects mice from fatty-acid-induced insulin resistance and intramuscular accumulation of fatty acyl-CoAs (19). Furthermore, FATP1 is involved in hormonal regulation of fatty acid uptake, translocating to the plasma membrane in response to insulin in adipocytes and primary skeletal muscle cells (20, 21).

We have recently shown that overexpression of CPT1A in L6E9 myotubes enhanced CPT1 activity up to 15-fold, whereas fatty acid oxidation did not increase more than 2-fold, even when a mutant form of CPT1 insensitive to malonyl-CoA was overexpressed (22). These data indicate that other factors independent of CPT1/malonyl-CoA interaction could be involved in the control of fatty acid oxidation in these cells. In the search for a novel regulator of fatty acid oxidation in skeletal muscle, we examined the effect of FATP1 overexpression on fatty acid oxidation in L6E9 muscle cells. We show that FATP1 localized in mitochondria and coimmunoprecipitated with CPT1. Moreover, FATP1 overexpression enhanced mitochondrial oxidation of fatty acids. We also observed all these effects in cells overexpressing FAT/CD36, which may have a role in this process in muscle (12). These data reveal a new protein involved in  $\beta$ -oxidation and could help us to understand its complex regulation in skeletal muscle.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Materials and reagents

Protran® nitrocellulose membranes for protein analysis were from Scheicher and Schuell (Keene, NH). The enhanced chemi-fluorescence detection kit from Amersham Biosciences was used for Western blot analysis. The Bradford solution for protein assay was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). FBS, DMEM, and antibiotics were from Gibco-Invitrogen. Defatted BSA (BSA), palmitate, and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]Palmitic acid and [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitoyl-CoA were from GE Healthcare. Antibodies used included rabbit polyclonal anti-FATP1 (sc-14497) and rabbit polyclonal anti-FAT/CD36 (sc-9154) from Santa Cruz Biotechnologies, anti-green fluorescent protein (GFP) (ref. 8360-1) from Clontech, anti-COI of complex IV from Molecular Probes, and anti-porin from Calbiochem. Silica gel 60 TLC plates were from Merck (Rahway, NJ). Etomoxir was provided by H. P. O. Wolf (GMBH, Allensbach, Germany).

### Animals

Samples of gastrocnemius and soleus muscle were taken from male Sprague-Dawley rats (180–200 g) bred in our laboratory. Animals were maintained under a 12 h dark/light cycle at 23°C with free access to food and water. All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee at the University of Barcelona.

### Cell culture

The L6E9 rat skeletal muscle cell line was cultured in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  in DMEM medium containing 10% FBS, 100 units/ml penicillin G, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin and 25 mmol/l HEPES (pH 7.4) (growth medium). Preconfluent myoblasts (80–90%) were induced to differentiate by lowering FBS to a final concentration of 2% (v/v) (differentiation medium). Cells were completely differentiated after 4 days in this medium.

### Adenoviral preparation and transduction of L6E9 cells

Ad-CPT1A encoding rat CPT1A, Ad-FATP1 encoding mouse FATP1, Ad-FAT/CD36 encoding rat FAT/CD36, and Ad-LacZ, which expresses bacterial  $\beta$ -galactosidase, were constructed as previously described (18, 23). Adenoviruses were amplified using the human embryonic kidney cell line (HEK 293) as host. Lysates obtained were titrated using the Adeno-X™ Rapid Titer kit (Clontech) and used directly for cell transduction. The titers of the lysates were  $2.3 \times 10^9$  pfu/ml for Ad-LacZ,  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml for Ad-CPT1A,  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml for Ad-FAT/CD36, and  $3 \times 10^{10}$  pfu/ml for Ad-FATP1. Myotubes were transduced at day 4 of differentiation with 20 pfu/cell of Ad-LacZ, Ad-FATP1, or Ad-CPT1A and 5 pfu/cell of Ad-FAT/CD36 in serum-free medium for 30 h. After this time, the infection medium was removed and cells were incubated with serum-free medium for a further 16 h.

### Transfection of L6E9 cells

The plasmids pFATP1-GFP and pFAT/CD36-GFP, which include an  $\text{NH}_2$ -terminal fusion protein construct with the GFP (20), were transfected in L6E9 myoblasts using FuGENE 6 (Roche) following the manufacturer's guidelines. After transfection, cells were differentiated and used for the experiments.

### Measurement of fatty acid oxidation in intact cells

Palmitate oxidation to  $\text{CO}_2$  and acid-soluble products (ASPs), essentially acyl-carnitine, Krebs cycle intermediates, and acetyl-CoA (24), were measured in L6E9 cells grown in 6-well plates, differentiated, and transduced as described above. On the day of

the assay, cells were washed in Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer (KRBH buffer: 135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , and 10 mM HEPES, pH 7.4) that contained 0.1% BSA, preincubated at 37°C for 30 min in KRBH 1% BSA and washed again in KRBH 0.1% BSA. Cells were then incubated for 3 h at 37°C with fresh KRBH containing 2.5 mM glucose and 0.8 mM carnitine plus 0.25 mM palmitate and 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitate bound to 1% BSA. Oxidation measurements were performed by trapping the radioactive  $\text{CO}_2$  in a parafilm-sealed system. The reaction was stopped by the addition of 40% perchloric acid through a syringe that pierced the parafilm.

### Isolation of mitochondria from L6E9 cells and rat skeletal muscle

Mitochondria-enriched cell fractions from L6E9 myotubes were obtained as previously described (23) with some modifications. Briefly, L6E9 cells were grown in 150 mm dishes, left to differentiate, and transduced as described above. Cells were scraped out and resuspended in 1 ml of solution A (100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM EDTA, 1 mM ATP, and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4). Cells were homogenized using a glass homogenizer (20 strokes with both the loose and the tight pestle) and centrifuged at 2,000  $g$  for 3 min at 4°C. The supernatant was centrifuged again at 16,000  $g$  for 30 min at 4°C. The mitochondria-enriched pellet was resuspended in 50–100  $\mu\text{l}$  of solution B (220 mM sucrose, 70 mM mannitol, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and used for immunoprecipitation or palmitate oxidation assays. The quality of mitochondria was assessed measuring the malonyl-CoA-resistant CPT1 activity, attributable basically to CPT2 activity inside the mitochondrion, allowing us to quantify broken mitochondria. According to this method, the integrity of mitochondria was higher than 80% (data not shown).

Mitochondria-enriched fractions from rat muscle were obtained by differential centrifugation. Two soleus muscle samples or one gastrocnemius muscle sample from each animal were homogenized separately in 9 volumes of solution A using an omnimixer and then centrifuged at 1,000  $g$  for 15 min. The pellet was homogenized and centrifuged at 600  $g$  for 10 min. The resulting supernatant was centrifuged at 15,000  $g$  for 15 min, and the pellet was washed twice in solution A and resuspended at 1  $\mu\text{l}/\text{mg}$  tissue in solution B.

### Measurement of palmitate and palmitoyl-CoA oxidation in isolated mitochondria

L6E9 cells were cultured in 150 mm dishes, differentiated, and transduced as described above. Mitochondria-enriched fractions were obtained and resuspended in solution B. Fatty acid oxidation was measured as described elsewhere (12) with minor modifications. For palmitate oxidation assays, 50  $\mu\text{l}$  (150  $\mu\text{g}$ ) of mitochondria and 50  $\mu\text{l}$  of a 2.5 mM 5:1 palmitate-BSA complex containing 10  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitate (final concentration: 0.25 mM palmitate and 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitate) were incubated for 1 h with agitation in 400  $\mu\text{l}$  of pregassed (37°C for 15 min with 5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{O}_2$ ) modified Krebs Ringer HEPES (MKRH) buffer (115 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , and 10 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with 5 mM ATP, 1 mM  $\text{NAD}^+$ , 0.5 mM L-carnitine, 0.1 mM CoA, 0.5 mM malate, and 25  $\mu\text{M}$  cytochrome C (complete MKRH buffer). For palmitoyl-CoA oxidation assays 50  $\mu\text{l}$  (400  $\mu\text{g}$ ) of mitochondria and 50  $\mu\text{l}$  of a 2.5 mM 5:1 palmitoyl-CoA-BSA complex containing 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitoyl-CoA was added to the reaction mixture (final concentration: 0.25 mM palmitoyl-CoA and 0.1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitoyl-CoA) were incubated for 0.5 h with agitation in 400  $\mu\text{l}$  of pregassed complete MKRH buffer. Oxidation measurements were performed by trapping the radioactive  $\text{CO}_2$  and ASPs in a

parafilm-sealed system in a 6-well plate with agitation. The reaction was stopped by the addition of 40% perchloric acid through a syringe that pierced the parafilm.

### Measurement of palmitate incorporation into cellular lipids

Palmitate incorporation into complex lipids was measured in L6E9 cells that were cultured on 6-well plates and pretreated as described above. Cells were incubated for 16 h at 37°C in serum-free medium containing 0.25 mM palmitate and 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitate bound to 1% BSA. On the day of the assay cells were washed in PBS, and lipids were extracted as described previously (23). Total lipids were dissolved in 30  $\mu\text{l}$  of chloroform and separated by TLC to measure the incorporation of labeled fatty acid into phospholipids (PLs), diacylglycerol (DAG), TGs, and nonesterified labeled palmitate (NE palm), as described (22).

### Measurement of acyl-CoA synthetase activity

Samples were assayed for acyl-CoA synthetase activity by the conversion of [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitate to its CoA derivative (13). The assay mixture contained, in a total volume of 200  $\mu\text{l}$ : 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 50  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitate (0.2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ), 10 mM ATP, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  CoA, 200  $\mu\text{M}$  DTT, and 0.4% Triton X-100. The assay was initiated by addition of 5–10  $\mu\text{l}$  of enzyme suspension (30–50  $\mu\text{g}$ ) from total or mitochondrial extracts from L6E9 myotubes. The reaction was carried out at 30°C for 5 min. Reactions were terminated with the addition of 1.25 ml of isopropyl alcohol:heptane: $\text{H}_2\text{SO}_4$  (40:10:1, v/v/v), 0.5 ml of water, and 0.75 ml of heptane to facilitate organic phase separation. The aqueous phase was extracted three times with 0.75 ml of heptane to remove unreacted fatty acids, and the radioactivity was determined by liquid phase scintillation counting.

### Immunoprecipitation

Immunoprecipitation studies were performed in L6E9 myotubes and rat skeletal muscle. L6E9 cells were grown on 150 mm plates, differentiated, and transduced with the adenoviruses. After transduction, cells were collected in PBS and homogenized with a douncer in 500  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1  $\mu\text{M}$  PMSF, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, and 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin) and centrifuged at 700  $g$  for 10 min to remove nuclei, cell debris, and floating cells. For muscle studies, two soleus samples or one gastrocnemius sample were homogenized in 9 volumes of lysis buffer using a polytron. Homogenates were rotated for 1 h at 4°C in an orbital shaker and centrifuged at 5,000  $g$  for 10 min at 4°C. After that, 1,000 or 2,000  $\mu\text{g}$  of protein was immunoprecipitated with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of either anti-FATP1 or anti-FAT/CD36 antibody. For immunoprecipitation studies in mitochondria, mitochondrial fractions were obtained as described above, 1% Triton X-100 was added to each preparation, and 150 or 300  $\mu\text{g}$  of each fraction was used. Immunoprecipitates were collected on protein A-Sepharose G beads, washed five times in lysis buffer, resuspended, and incubated for 5 min at 95°C in 1 $\times$  SDS-PAGE sample buffer. Samples were resolved in 8% SDS-PAGE. A CPT1A-specific polyclonal antibody against amino acids 317–430 of the rat CPT1A (25) (1/6,000 dilution) was used for the detection of CPT1A protein in the immunoprecipitates from L6E9 myotubes. A CPT1B-specific antibody against amino acids 259–760 of the rat CPT1B (26) was used (1/1,000 dilution) for detection of CPT1B protein in the immunoprecipitates from rat skeletal muscle.

### Immunofluorescence

Cells grown on cover slips were fixed for 15 min with 3% paraformaldehyde in PBS and then rinsed three times with PBS and

subsequently incubated for 10 min in PBS containing 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , for 10 min with PBS containing 20 mM glycine, and for 10 min in PBS containing 0.1% triton X-100 and 0.05% colic acid. Cells were then washed three times in PBS 1 $\times$  and for 30 min in PBS containing 10% goat serum. Thereafter, cover slips were incubated with primary antibodies at 0.5–1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-COI of complex IV (Molecular Probes) and revealed with fluorochrom-conjugated goat secondary antibodies (Texas Red). Cells were rinsed three times with PBS prior to mounting in medium for fluorescence microscopy (Vectashield). Fluorescence images were obtained with a Leica TCS 4D confocal scanning laser microscope adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope and 63 $\times$  (numerical aperture 1.4 oil) Leitz Plan-Apo objectives. The light source was an argon/krypton laser (75 mW), with which optical sections (0.1  $\mu\text{m}$ ) were obtained. Qualitative analyses of colocalization were assessed using the plugin RGB Profiler from the WCIF ImageJ software. A line was drawn arbitrarily over an area of interest and the plot presented the overlap of the staining of each laser (from distinct labeled proteins). Quantitative analyses were performed by calculating Pearson's correlation coefficient and Mander's overlap coefficient, which are both described in the online manual for the WCIF ImageJ collection. In many forms of correlation analysis, the value for Pearson's range from 1 to  $-1$ . A value close to 1 does indicates reliable colocalization. The Mander's overlap coefficient ranges from 1 to 0, with 1 being high colocalization and 0 being low. Having defined and eliminated the background noise from the original picture, we used the plugin Intensity Correlation Analysis from WCIF ImageJ software.

### Western blotting

Mitochondrial fractions were obtained by differential centrifugation of muscle cell homogenates. Extracts were prepared by scraping L6E9 cell monolayers from 6 cm dishes into 700  $\mu\text{l}$  of homogenization buffer consisting of 250 mM sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1  $\mu\text{M}$  PMSF, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin A, and 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin. Cells were homogenized with the aid of a 22G-syringe (15 times). The homogenates were centrifuged at 1,500  $g$  for 10 min, and the supernatant was then centrifuged at 10,000  $g$  for 10 min to obtain a pellet enriched in mitochondria and other organelles (27). All fractions were stored at  $-80^\circ\text{C}$ , and an aliquot of the cell extracts was used for the measurement of protein concentration. Fifty micrograms of protein was resolved in 10% SDS-PAGE, and immunoblotting was performed with the corresponding antibody.

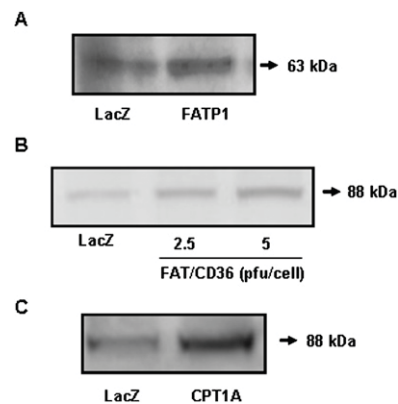
### Statistical Analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SE. The significance of differences was assessed by a one-way or two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test for comparisons post hoc. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Effect of overexpression of FATP1 on lipid partitioning in L6E9 myotubes

Mouse FATP1 cDNA was delivered into L6E9 myotubes by adenovirus. FATP1 protein levels increased 2-fold in Ad-FATP1-transduced cells compared with control Ad-LacZ-transduced cells (Fig. 1A). To assess the functionality of the overexpressed FATP1, we measured the incorporation of palmitate into lipids and oxidation in intact cells. FATP1 overexpression produced a 2-fold increase in the incorporation of palmitate into TGs (LacZ control value:



**Fig. 1.** Overexpression of FATP1, FAT/CD36, and CPT1A in L6E9 myotubes. L6E9 myotubes were transduced with Ad-FATP1, Ad-FAT/CD36, Ad-CPT1A, or Ad-LacZ as a control, and a Western blot using a specific antibody against FATP1 (A), FAT/CD36 (B), or CPT1A (C) was performed in 50  $\mu\text{g}$  of total extract.

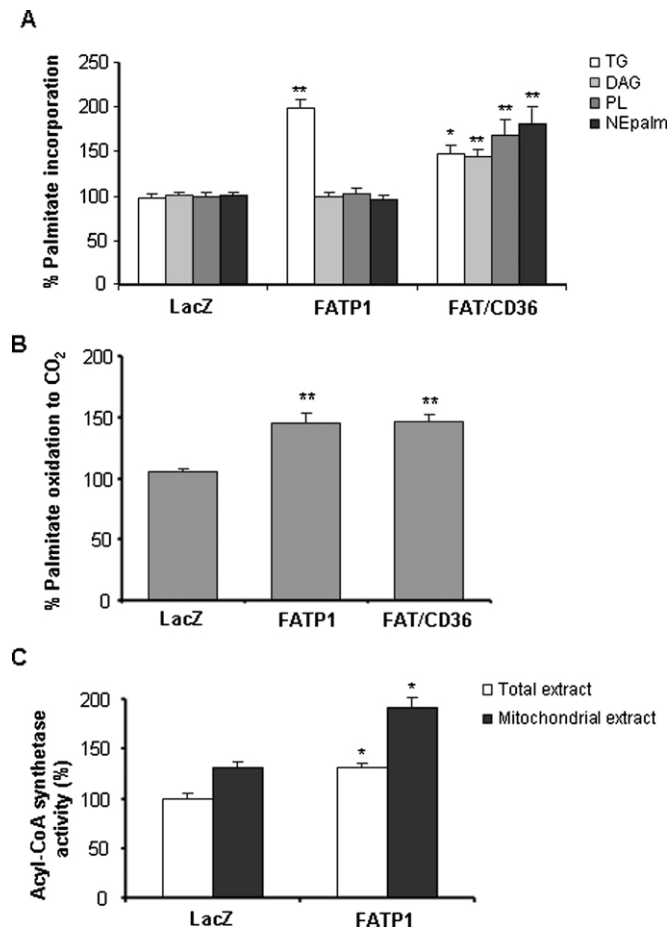
$0.36 \pm 0.04$  nmol palmitate/mg protein  $\times$  h), and no increase was seen for PLs, DAG, or nonesterified palmitate (NEPalm) (LacZ control values in nmol palmitate/mg protein  $\times$  h:  $0.14 \pm 0.01$ ,  $0.08 \pm 0.01$ , and  $0.033 \pm 0.003$  for PL, DAG, and NEPalm, respectively; Fig. 2A). L6E9 myotubes transduced with Ad-FATP1 showed a 1.5-fold increase in palmitate oxidation to  $\text{CO}_2$  compared with Ad-LacZ-transduced myotubes ( $6.5 \pm 0.27$  nmol palmitate/mg protein  $\times$  3 h; Fig. 2B). We also examined the effect of FAT/CD36 overexpression in L6E9 myotubes, a protein that has already been shown to have a role in fatty acid oxidation in muscle (12). Overexpression of FAT/CD36 (2-fold increase in protein levels; Fig. 1B) produced a 1.5- to 1.8-fold increase in palmitate esterification to TG, PL, DAG, and NEPalm (Fig. 2A) and a 1.5-fold increase in palmitate oxidation (Fig. 2B).

### Effect of FATP1 overexpression on acyl-CoA synthetase activity

As FATP1 has acyl-CoA synthetase activity (13), we evaluated whether the overexpression of FATP1 in L6E9 myotubes was followed by an increase in this activity. We determined the conversion of palmitate into palmitoyl-CoA in both total and mitochondria-enriched extracts. Acyl-CoA synthetase activity increased by 30% and 70% in total and mitochondrial extracts, respectively, in FATP1-overexpressing L6E9 myotubes compared with LacZ control cells (control values:  $2.99 \pm 0.16$  and  $3.91 \pm 0.37$  nmol palmitoyl-CoA/mg protein  $\times$  min in total and mitochondrial extracts, respectively; Fig. 2C).

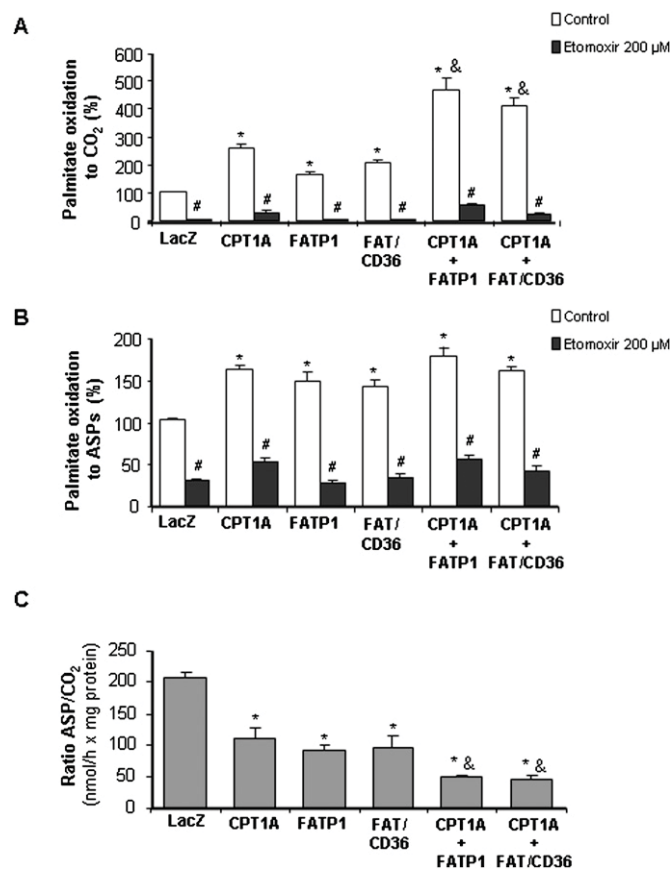
### Effect of FATP1 on fatty acid oxidation in isolated mitochondria

To assess the role of FATP1 in fatty acid oxidation, we measured palmitate oxidation in mitochondria-enriched fractions. Palmitate oxidation to  $\text{CO}_2$  increased 1.7-fold in mitochondria isolated from FATP1-overexpressing cells compared with Ad-LacZ infected cells ( $0.16 \pm 0.009$  nmol palmitate/mg protein  $\times$  h; Fig. 3A). As a positive control, we also evaluated palmitate oxidation in CPT1-overexpressing cells. Overexpression of CPT1A (3-fold increase in protein



**Fig. 2.** Effect of FATP1 overexpression on palmitate metabolism and acyl-CoA synthetase activity. A: Palmitate incorporation into complex lipids. L6E9 cells that were infected with Ad-LacZ, Ad-FATP1, and Ad-FAT/CD36 were incubated for 16 h in serum-free medium containing 1  $\mu$ Ci/ml [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitic acid and 0.25 mM unlabeled palmitate complexed to 1% (w/v) BSA. Fatty acid incorporation into TGs, DAG, PLs, and NEpalm was assessed using TLC after lipid extraction. B: Fatty acid oxidation. Cells were infected with Ad-LacZ, Ad-FATP1, or Ad-FAT/CD36, and palmitate oxidation to  $\text{CO}_2$  was measured for 3 h. C: Acyl-CoA synthetase activity was measured in both total and mitochondrial extracts coming from L6E9 myotubes transduced with Ad-LacZ or Ad-FATP1. Data are the mean  $\pm$  SE of five experiments performed in triplicate. \* $P < 0.01$  versus Ad-LacZ; \*\* $P < 0.001$  versus Ad-LacZ.

levels; Fig. 1C), the endogenous CPT1 isoform expressed in these cells (22), produced a 2.6-fold increase in mitochondrial palmitate oxidation to  $\text{CO}_2$ . Moreover, overexpression of FAT/CD36 also increased palmitate oxidation to  $\text{CO}_2$  by 2.0-fold. To further evaluate the role of FATP1 in fatty acid oxidation, we overexpressed both FATP1 and CPT1 proteins together. The overexpression of CPT1A and FATP1 enhanced fatty acid oxidation to  $\text{CO}_2$  by 4.7-fold, showing an additive effect (Fig. 3A). Similarly, coexpression of CPT1A and FAT/CD36 also produced an additive effect on palmitate oxidation to  $\text{CO}_2$  (4.1-fold increase). Palmitate oxidation to ASPs, essentially consisting of acyl-carnitines, Krebs cycle intermediates, and acetyl-CoA, was increased from 1.4- to 1.8-fold in CPT1A-, FAT/CD36-, FATP1-, CPT1A+FAT/CD36-, and CPT1A+FATP1-



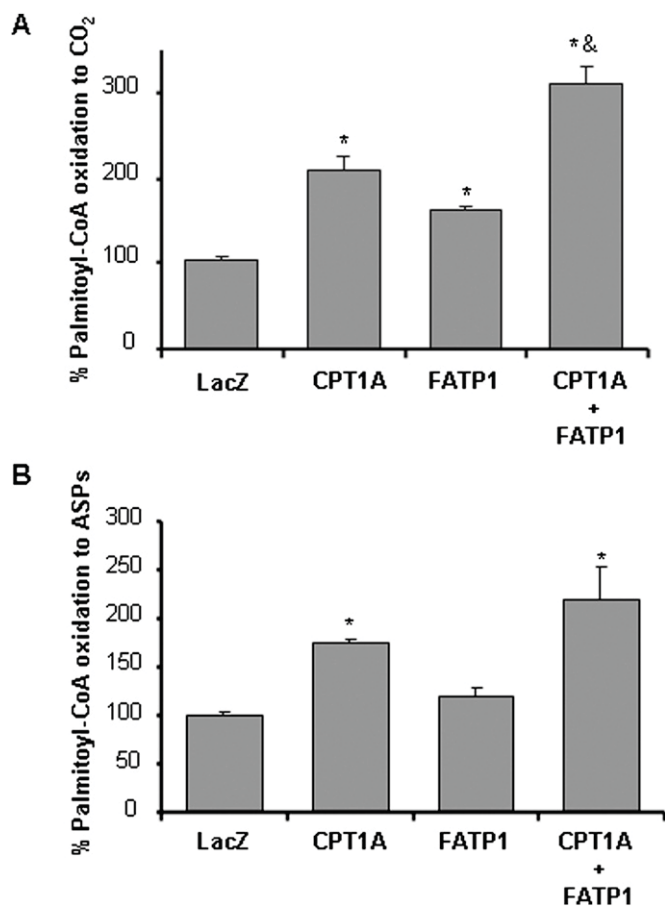
**Fig. 3.** Palmitate oxidation in mitochondrial fractions. Mitochondrial fractions that were obtained from cells infected with Ad-LacZ, Ad-FATP1, Ad-CPT1A, or Ad-FAT/CD36 were incubated for 1 h with agitation in 400  $\mu$ l of pregassed complete MKRH buffer and 50  $\mu$ l of a 2.5 mM 5:1 palmitate-BSA complex containing 10  $\mu$ Ci/ml [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]palmitic acid, and palmitate oxidation to  $\text{CO}_2$  (A) and to ASPs (B) was measured. The ratio of ASPs/ $\text{CO}_2$  was also calculated (C). Data are the mean  $\pm$  SE of five experiments performed in duplicate. \* $P < 0.01$  versus Ad-LacZ, \*\* $P < 0.001$  versus Ad-LacZ, & $P < 0.001$  versus the overexpression of only one protein (CPT1A, FATP1, or FAT/CD36), and # $P < 0.01$  versus control without etomoxir.

overexpressing cells compared with Ad-LacZ control cells ( $36.1 \pm 1.5$  nmol palmitate/mg protein  $\times$  h; Fig. 3B). When mitochondria were incubated with etomoxir, an irreversible inhibitor of CPT1, the increments in fatty acid oxidation in FATP1- and FAT/CD36-overexpressing cells were blunted, confirming that CPT1 activity is necessary for fatty acid import into mitochondria (Fig. 3A, B). We also determined the ratio of incomplete (ASPs) versus complete ( $\text{CO}_2$ ) oxidation as a measure of mitochondrial fatty acid oxidation efficiency. The overexpression of CPT1A, FATP1, and FAT/CD36 produced a 30–40% decrease in the ratio ASP/ $\text{CO}_2$ . Importantly, the coexpression of CPT1A together with FATP1 or FAT/CD36 produced a 50–60% decrease in this ratio (Fig. 3C), indicating that the overexpression of these proteins increased fatty acid oxidation efficiency.

To assess whether the role of FATP1 in the increase in mitochondrial fatty acid oxidation was due to its acyl-CoA synthetase activity, providing the substrate for CPT1, we

measured palmitoyl-CoA oxidation to CO<sub>2</sub> and ASPs in isolated mitochondria, where palmitoyl-CoA is oxidized in the absence of acyl-CoA synthetase activity. The overexpression of either CPT1 or FATP1 alone produced an increase in fatty acid oxidation to CO<sub>2</sub> compared with LacZ control cells (2.20 ± 0.11 nmol palmitoyl-CoA/mg protein × h), which was additive when both proteins were overexpressed together (Fig. 4A). However, no significant difference was observed in palmitoyl-CoA oxidation to ASPs in FATP1-overexpressing cells compared with LacZ control cells (27.6 ± 0.37 nmol palmitoyl-CoA/mg protein × h; Fig. 4B).

Increased fatty acid uptake has been shown to increase transcription of CPT1 via a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-dependent pathway (28). To assess the possibility that the increase in fatty acid oxidation was due to increased expression of CPT1 in cells overexpressing FATP1 as a consequence of an increased influx of fatty acids, we performed a Western blot for CPT1 in L6E9 myotubes. CPT1 protein levels were increased in cells overexpressing CPT1 but not in those cells overexpressing



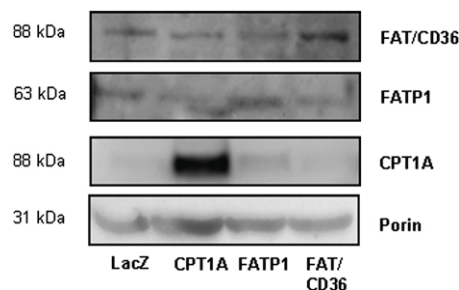
**Fig. 4.** Palmitoyl-CoA oxidation in mitochondrial fractions. Mitochondrial fractions that were obtained from cells infected with Ad-LacZ, Ad-FATP1, or Ad-CPT1A were incubated for 0.5 h with agitation in 400  $\mu$ l of pregassed complete MKRH buffer and 50  $\mu$ l of a 2.5 mM 5:1 palmitoyl-CoA-BSA complex containing 1  $\mu$ Ci/ml [<sup>14</sup>C]palmitoyl-CoA and palmitoyl-CoA, and oxidation to CO<sub>2</sub> (A) and to ASPs (B) was measured. Data are the mean  $\pm$  SE of three experiments performed in duplicate. \**P* < 0.01 versus Ad-LacZ; <sup>&</sup>*P* < 0.01 versus the overexpression of only one protein (CPT1A or FATP1).

FATP1 or FAT/CD36 (Fig. 5). Indeed, the overexpression of FATP1, FAT/CD36, or CPT1 only affected the expression of the protein that had been overexpressed but not the other proteins studied (Fig. 5).

#### Cellular localization of FATP1

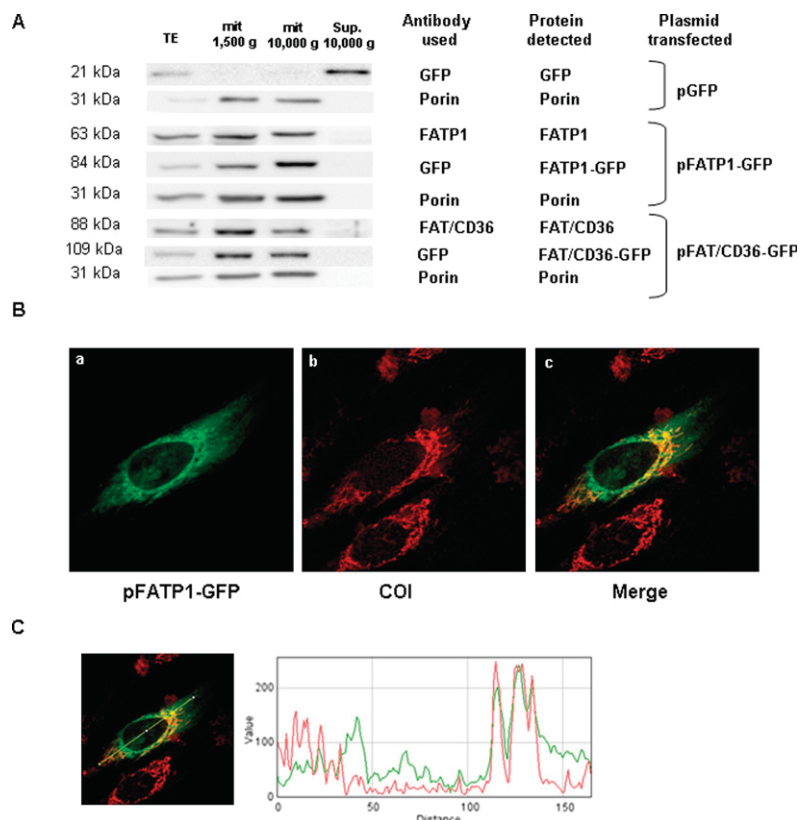
The increase in fatty acid oxidation in isolated mitochondria from FATP1-overexpressing cells suggested that FATP1 could be localized in the mitochondrion. Therefore, L6E9 myotubes were transfected with a plasmid that expressed an N-terminal FATP1-GFP fusion protein, and a Western blot against GFP or FATP1 was performed. We detected a band corresponding to the FATP1-GFP fusion protein (using the GFP antibody) and the endogenous FATP1 protein (using FATP1 antibody) in the 10,000 *g* mitochondrial pellet but not in the 10,000 *g* supernatant (Fig. 6A). Indeed, this distribution was similar to that of the mitochondrial marker protein porin. The same result was obtained for endogenous FAT/CD36 protein and overexpressed FAT/CD36-GFP fusion protein, which is consistent with the mitochondrial localization of FAT/CD36 protein in muscle (Fig. 6A).

To confirm that FATP1 is localized in mitochondria, we used immunocytochemistry in L6E9 myotubes transfected with the FATP1-GFP construct. As a marker of the mitochondrial network, we used subunit I of cytochrome c oxidase (COI), an enzyme located in the mitochondrial inner membrane that forms part of Complex IV of the respiratory chain (29). We showed that COI protein has a tubular mitochondrial pattern in L6E9 myotubes. The merging of FATP1-GFP with the mitochondrial marker COI revealed a partial overlap of these two proteins, and imaging analysis indicated a substantial colocalization of both proteins (Pearson coefficient of colocalization was 0.537, and Mander's Overlap coefficient was 0.723), confirming the mitochondrial localization of FATP1-GFP protein (Fig. 6B). Qualitative analyses of colocalization were assessed using the plugin RGB Profiler from the WCIF ImageJ software. An arbitrary line was drawn over an area of interest, and the plot presents the overlap of staining of each laser (from distinct labeled proteins; Fig. 6C).



**Fig. 5.** Protein expression levels of CPT1A, FATP1, and FAT/CD36 in L6E9 myotubes. Western blot for CPT1A, FATP1, and FAT/CD36 proteins was performed in 50  $\mu$ g of mitochondrial fractions obtained from cells infected with Ad-LacZ, Ad-CPT1A, Ad-FATP1, and Ad-FAT/CD36. Western blot against porin was used as a mitochondrial loading control.





**Fig. 6.** FATP1 localizes in mitochondria in L6E9 myotubes. **A:** L6E9 myoblasts were transfected with pFATP1-GFP or pFAT/CD36-GFP and induced to differentiate. Western blot analyses were performed 48 h posttransfection on total cell extracts (TE) (35  $\mu$ g protein), mitochondrial enriched fractions (mit) (35  $\mu$ g protein) after centrifugation at 1,500 *g* and 10,000 *g*, or the supernatant (Sup.) of the 10,000 *g* pellet (35  $\mu$ g) and membranes hybridized with antibodies against FAT/CD36, FATP1, GFP, or porin as stated. **B:** Colocalization analysis of the mitochondrial marker COI and FATP1-GFP. L6E9 cells were transfected with pFATP1-GFP and studied 48 h posttransfection. **a:** Image of the FATP1-GFP protein observed under a confocal microscope. **b:** Image of mitochondrial network by staining with antibodies against COI. **c:** Colocalization of the signal of GFP and COI. **C:** Qualitative analyses of colocalization were assessed using the plugin RGB Profiler from the WCIF ImageJ software. A line was drawn arbitrarily over an area of interest, and the plot presents the overlap of the intensity of each laser (from distinct labeled proteins).

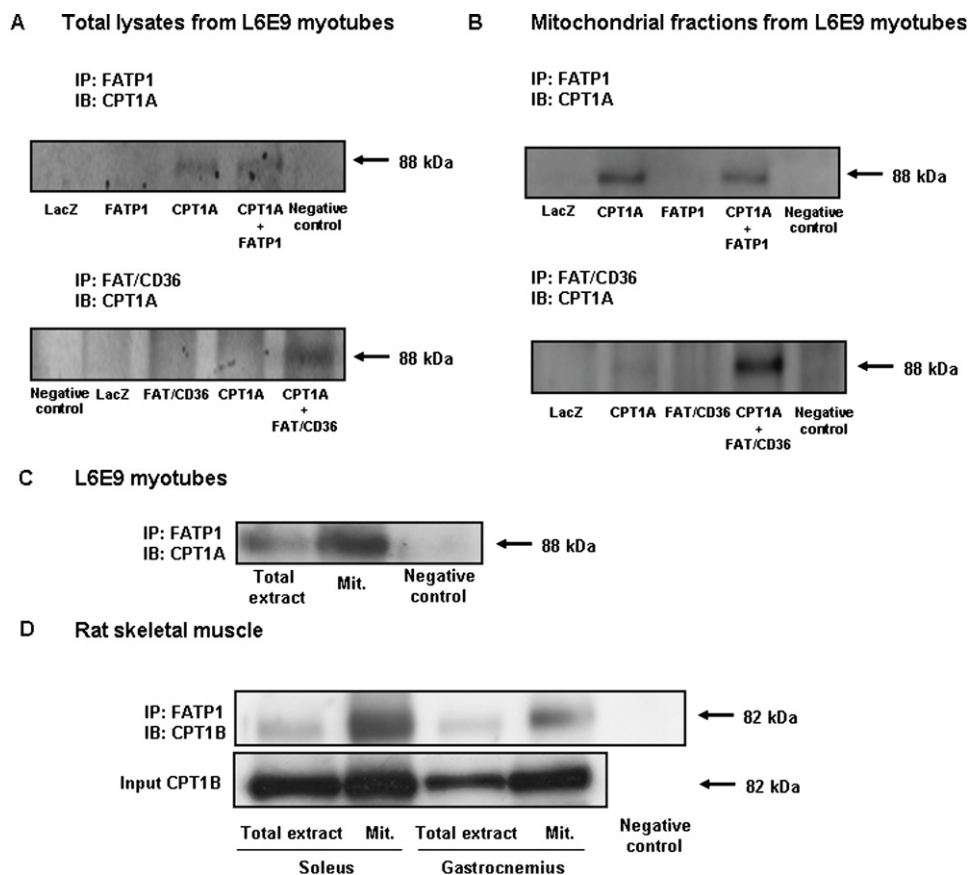
### FATP1 and CPT1 interact in mitochondria

If FATP1 is localized in mitochondria and enhances fatty acid oxidation, FATP1 and CPT1 could interact in the mitochondria. To assess this possibility, we performed coimmunoprecipitation assays. FATP1 was immunoprecipitated from total lysates of cells infected with Ad-LacZ, Ad-FATP1, Ad-CPT1A, or Ad-FATP1 + Ad-CPT1A, and these immunoprecipitates were then subjected to a Western blot analysis using a CPT1A-specific antibody. We detected a band corresponding to CPT1 in immunoprecipitates obtained from CPT1A-overexpressing cells, showing an interaction between FATP1 and CPT1 (Fig. 7A). To confirm that the two proteins interact in mitochondria, we also performed immunoprecipitation assays using mitochondrial fractions from these cells. As shown for the case of total lysates, FATP1 and CPT1A coimmunoprecipitated in these fractions (Fig. 7B). Since we did not see coimmunoprecipitation of FATP1 and CPT1A in control LacZ cells, to rule out the possibility that the coimmunoprecipitation could be an artifact of the overexpression system, we performed immunoprecipitation assays using a greater amount of either total extracts or mitochondrial extracts. Using this approach, we showed that endogenous FATP1 and CPT1A coimmunoprecipitated in both total and mitochondria-enriched extracts in control L6E9 myotubes (Fig. 7C). FAT/CD36 has been shown to coimmunoprecipitate with CPT1 in human skeletal muscle (30). We performed immunoprecipitation assays in our system, which overexpresses FAT/CD36, and found that the two proteins also coimmunoprecipitated in both total and mitochondrial extracts when both proteins

were overexpressed (Fig. 7A, B). Importantly, to confirm that FATP1 and CPT1 colocalize in mitochondria, we performed immunoprecipitation assays *in vivo* using rat skeletal muscle. FATP1 and CPT1 coimmunoprecipitated in both total extracts and in isolated mitochondrial fractions coming from gastrocnemius and soleus muscles (Fig. 7D).

### DISCUSSION

Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle has been the object of many studies attempting to explain the disconnection between malonyl-CoA levels measured in muscle and the  $IC_{50}$  for the muscle isoform of CPT1. In a recent study, we showed that overexpression of CPT1A in L6E9 myotubes enhanced CPT1 activity up to 15-fold, whereas fatty acid oxidation did not increase more than 2-fold, even when a mutant form of CPT1A insensitive to malonyl-CoA was overexpressed (22). These data indicate that other factors independent of the CPT1/malonyl-CoA interaction could be involved in the control of fatty acid oxidation in muscle. Furthermore, proteins other than CPT1 have recently been implicated in fatty acid import into mitochondria in muscle, such as FAT/CD36 (12) and UCP3 (31). FAT/CD36 translocates to the mitochondria during muscle contraction, increasing fatty acid oxidation. Furthermore, a null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals that palmitate metabolism is markedly down-regulated under insulin- and AICAR-stimulated conditions. This indicates its critical role in fatty acid esterification and oxidation and points to another level of regulation in



**Fig. 7.** Coimmunoprecipitation of FATP1 and CPT1. L6E9 myotubes were transduced with Ad-LacZ, Ad-CPT1A, Ad-FATP1, and Ad-FAT/CD36, and FATP1 or FAT/CD36 proteins were immunoprecipitated using specific antibodies in either total extracts (1,000  $\mu$ g) (A) or mitochondrial extracts (150  $\mu$ g) (B), and CPT1A protein was detected in these immunoprecipitates by Western blot. C: FATP1 protein was immunoprecipitated in either total extracts (2,000  $\mu$ g) or mitochondria-enriched extracts (300  $\mu$ g) from L6E9 myotubes, and CPT1A protein was detected by Western blot. D: FATP1 protein was immunoprecipitated in either total extracts (1,000  $\mu$ g) or mitochondria-enriched extracts (150  $\mu$ g) from both gastrocnemius and soleus muscles, and CPT1B protein was detected by Western blot using a specific antibody. Total expression of CPT1B in 50  $\mu$ g of total and mitochondrial extracts is also shown (Input). A negative control with an unspecific antibody is also shown. IP, immunoprecipitation; IB, immunoblot.

fatty acid oxidation (32). In these FAT/CD36 KO mice, there was an upregulation of FATP1 and FATP4 in the soleus muscle. This upregulation failed to normalize fatty acid oxidation, but it indicates that other proteins like FATP1 could collaborate in the maintenance of fatty acid metabolism. In search for a novel regulator of fatty acid metabolism in muscle, in this study, we demonstrate for the first time that FATP1, a fatty acid transport protein, is involved in mitochondrial fatty acid oxidation.

Overexpression of FATP1 in L6E9 myotubes using adenovirus increased acyl-CoA synthetase activity and fatty acid incorporation into TGs, but not into other lipid species such as PL, DAG, or NEPalm. These results are consistent with other *in vitro* studies in 293 cells showing that fatty acids taken up by FATP1 are preferentially channeled into TG synthesis (33). Moreover, FATP1 overexpression increased fatty acid oxidation in intact myotubes. This result contrasts with the effect of FATP1 overexpression in human skeletal muscle cells, where palmitate incorporation into TG, but not fatty acid oxidation, was also

increased (18). This discrepancy could be due to differences in the model studied and the method used: in this study, palmitate oxidation was measured in the presence of 2.5 mM glucose, whereas in the previous study, palmitate oxidation was measured in human skeletal muscle cells and in the absence of glucose. The increase in fatty acid oxidation in FATP1-overexpressing L6E9 myotubes in our study is consistent with the increase shown for transgenic mice overexpressing FATP1 in heart (17). However, the TG levels were not increased in the heart of transgenic mice.

To assess whether the increase in fatty acid oxidation is a result of an increase in fatty acid uptake at the plasma membrane or due to a mitochondrial role of FATP1, we isolated mitochondrial-enriched fractions and measured palmitate oxidation. We found that FATP1 overexpression increased mitochondrial fatty acid oxidation, as did the overexpression of CPT1A, the endogenous CPT1 isoform expressed in these cells (22). Importantly, the overexpression of both proteins together produced an additive effect, indicating that FATP1 and CPT1 collaborate in these

cells for mitochondrial fatty acid oxidation. It has been suggested that when the rate of mitochondrial  $\beta$ -oxidation is increased and exceeds flux through the tricarboxylic acid cycle and electron transport chain, incomplete fatty acid oxidation occurs, leading to intramitochondrial metabolite accumulation, mitochondrial stress, and cellular insulin resistance (34). In our study, FATP1 overexpression produced a higher increase in complete than in incomplete fatty acid oxidation, indicating that the effect of this protein on fatty acid oxidation does not involve the accumulation of intermediary species of fatty acid oxidation. Hence, FATP1 overexpression increased the efficiency of the mitochondria to oxidize fatty acids, as indicated by the diminished ratio incomplete/complete fatty acid oxidation. This effect was also seen in cells overexpressing CPT1A, especially when both FATP1 and CPT1A were coexpressed, showing a higher coupling of mitochondrial fatty acid uptake and oxidation. Interestingly, the use of etomoxir showed that the control of mitochondrial fatty acid uptake was dominated by CPT1, and the overexpression of FATP1 had no effect when CPT1 was inhibited. This indicates that FATP1 contributes to fatty acid oxidation by collaborating with CPT1, but not by controlling the entry of fatty acids to the mitochondria.

If FATP1 has a role in mitochondrial fatty acid oxidation, it might be localized in mitochondria. To examine this possibility, we used different techniques. Western blot analysis demonstrated that the protein was present in mitochondrial fractions but not in cytosolic fractions. Moreover, using immunocytochemistry, we showed both qualitatively and quantitatively that FATP1-GFP protein localized partially in structures that were also positive for the mitochondrial protein COI, indicating that FATP1 is partially localized in mitochondria in L6E9 myotubes. We used GFP fluorescence since the FATP1 antibodies were unsuitable for immunocytochemistry studies. Although the fusion with GFP could affect the localization of the protein, we do not believe this is the case. In the Western blot experiments, the FATP1-GFP and the endogenous protein showed the same distribution pattern of localization after the cellular fractionation, and another report (35) showed that the N-terminal GFP-tagged FATP1 protein retained the ability to bind to membranes. In our study, not all the FATP1 colocalized with the mitochondrial marker COI. It has been described that FATP1 can also localize in the endoplasmic reticulum (ER) (35). Given the reticular pattern of GFP fluorescence that we observed in L6E9 cells, we cannot rule out the possibility that a portion of FATP1-GFP could also localize in the ER. Furthermore, in a previous study in human myotubes, overexpressed FATP1-GFP also showed a cytosolic reticular pattern, but colocalization studies with a mitochondrial or ER marker were not performed (18). Moreover, recent data from our group demonstrated that FATP1 also localizes in mitochondria in human and C2C12 muscle cells (36), and in adipocytes, 70% of FATP1 localizes in cell membrane fraction and approximately 10% in the nuclear-mitochondrial fraction (16).

The additive effect of FATP1 and CPT1 overexpression in fatty acid oxidation and the mitochondrial localization of

both proteins indicate that these two proteins may interact in the mitochondrion. We show that both proteins coimmunoprecipitated both in total extracts and in mitochondrial extracts, strongly supporting the hypothesis that FATP1 and CPT1 interact in mitochondria. Importantly, using rat skeletal muscle, we also showed that FATP1 and CPT1 coimmunoprecipitated both in total extracts and in mitochondria-enriched fractions, indicating that the interaction between FATP1 and CPT1 also occurs in skeletal muscle *in vivo*. Moreover, this coimmunoprecipitation was higher in soleus than in gastrocnemius muscle. This indicates that in oxidative muscle, which uses primary fatty acids as an energy source, the interaction between FATP1 and CPT1 could be higher than in glycolytic muscles. Furthermore, FATP1 expression in rat oxidative muscle (soleus) is approximately twice that in glycolytic (gastrocnemius) muscle (37). Our immunoprecipitation assays in L6E9 myotubes and rat skeletal muscle show that FATP1 and CPT1 interact in basal conditions, suggesting that FATP1 could be constitutively present in mitochondria. However, some hormonal or physiological factors that induce fatty acid oxidation, such as exercise, could also induce the presence of FATP1 in mitochondria. Future studies are needed to examine this possibility.

FATP1 is an integral membrane protein with at least one transmembrane and multiple membrane-associated domains (35). It contains an AMP-binding motif that is essential for transport function (38). FATP1 has acyl-CoA synthetase activity, suggesting that fatty acid uptake catalyzed by FATP1 is linked to the esterification of these fatty acids with CoA (13). Moreover, FATP1 was shown to heterooligomerize with the LCFA-CoA synthetase ACSL1 in differentiated 3T3-L1 adipocytes (39). Given all the above observations, it could be hypothesized that FATP1 could act as a long-chain acyl-CoA synthetase in mitochondria to activate LCFAs, which CPT1 can then use as a substrate. However, interestingly, although acyl-CoA synthetase activity is increased in mitochondrial fractions from FATP1-overexpressing L6E9 myotubes, we show that mitochondrial palmitoyl-CoA oxidation to  $\text{CO}_2$  is also increased in these fractions, as is the oxidation of palmitate, suggesting a role for FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation independent of its acyl-CoA synthetase activity.

In this study, we have also analyzed the effect of overexpression of FAT/CD36 in L6E9 myotubes. This has been described as a new protein involved in mitochondrial fatty acid oxidation under stimulated conditions (12). Thus, the presence of FAT/CD36 in mitochondria is induced by exercise or contraction (12). However, FAT/CD36 KO mice have normal basal mitochondrial fatty acid oxidation despite the absence of FAT/CD36 protein (40). These results suggest that FAT/CD36 could have a role in mitochondrial fatty acid oxidation only under certain conditions of increased requirements for fatty acid oxidation, such as during exercise or muscle contraction. Moreover, FAT/CD36 has been shown to translocate from intracellular vesicles to the plasma membrane in response to insulin (41). In this study, we have demonstrated that overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation, in agreement with the increase in fatty acid oxidation shown

in contracting muscle in transgenic mice overexpressing FAT/CD36 (42). Furthermore, FAT/CD36 coimmunoprecipitated with CPT1 in L6E9 myotubes, and its overexpression increased mitochondrial fatty acid oxidation and mitochondrial fatty acid oxidation efficiency, showing an additive effect when cooverexpressed with CPT1. It has already been shown that FAT/CD36 translocates to the mitochondrial membrane in response to exercise, increasing the ability of mitochondria to oxidize palmitate, both in rats and in humans (12, 43). Moreover, FAT/CD36 coimmunoprecipitates with CPT1, and this correlates with the level of fat oxidation in skeletal muscle (30). Thus, our results in L6E9 myotubes are in agreement with these previous data and validate our model of study. Therefore, according to our data, FATP1 enhances fatty acid oxidation similar to FAT/CD36, suggesting that such effect may be due to fatty acid recruitment at mitochondria by either fatty acid binding protein. However, in a recent study, we have shown that FATP1, unlike FAT/CD36, stimulates the pyruvate dehydrogenase complex activity and glucose oxidation in cultured myotubes (36), indicating that FATP1 exerts differential effects on mitochondrial metabolism.

In summary, we demonstrate for the first time that FATP1 has a role in mitochondrial fatty acid oxidation in collaboration with CPT1. The exact mechanism of this interaction and its regulation remain to be resolved. However, the data presented here reveal a new protein involved in mitochondrial oxidation of fatty acids and could help us to understand the complex regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. **■**

We thank Dr. Prip-Buus and Dr. Zammit for supplying anti-rat liver CPT1 antibody and anti-rat muscle CPT1 antibody respectively. The L6E9 rat skeletal muscle cell line was kindly provided by Dr. A. Zorzano (University of Barcelona). We are also grateful to Robin Rycroft of the Language Service for valuable assistance in the preparation of the manuscript.

## REFERENCES

- Bonen, A., A. Chabowski, J. J. Luiken, and J. F. Glatz. 2007. Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)*. **22**: 15–29.
- McGarry, J. D., and N. F. Brown. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* **244**: 1–14.
- Esser, V., C. H. Britton, B. C. Weis, D. W. Foster, and J. D. McGarry. 1993. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J. Biol. Chem.* **268**: 5817–5822.
- Yamazaki, N., Y. Shinohara, A. Shima, and H. Terada. 1995. High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett.* **363**: 41–45.
- Price, N., F. van der Leij, V. Jackson, C. Corstorphine, R. Thomson, A. Sorensen, and V. Zammit. 2002. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*. **80**: 433–442.
- Odland, L. M., G. J. Heigenhauser, G. D. Lopaschuk, and L. L. Spriet. 1996. Human skeletal muscle malonyl-CoA at rest and during prolonged submaximal exercise. *Am. J. Physiol.* **270**: E541–E544.
- Odland, L. M., G. J. Heigenhauser, D. Wong, M. G. Hollidge-Horvat, and L. L. Spriet. 1998. Effects of increased fat availability on fat-carbohydrate interaction during prolonged exercise in men. *Am. J. Physiol.* **274**: R894–R902.
- Dean, D., J. R. Dugaard, M. E. Young, A. Saha, D. Vavvas, S. Asp, B. Kiens, K. H. Kim, L. Witters, E. A. Richter, et al. 2000. Exercise diminishes the activity of acetyl-CoA carboxylase in human muscle. *Diabetes*. **49**: 1295–1300.
- Chien, D., D. Dean, A. K. Saha, J. P. Flatt, and N. B. Ruderman. 2000. Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**: E259–E265.
- McGarry, J. D., S. E. Mills, C. S. Long, and D. W. Foster. 1983. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem. J.* **214**: 21–28.
- McGarry, J. D. 2002. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. **51**: 7–18.
- Campbell, S. E., N. N. Tandon, G. Woldegiorgis, J. J. Luiken, J. F. Glatz, and A. Bonen. 2004. A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**: 36235–36241.
- Hall, A. M., A. J. Smith, and D. A. Bernlohr. 2003. Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1. *J. Biol. Chem.* **278**: 43008–43013.
- Stahl, A. 2004. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch.* **447**: 722–727.
- Bonen, A., D. Miskovic, and B. Kiens. 1999. Fatty acid transporters (FABPpm, FAT, FATP) in human muscle. *Can. J. Appl. Physiol.* **24**: 515–523.
- Schaffer, J. E., and H. F. Lodish. 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. **79**: 427–436.
- Chiu, H. C., A. Kovacs, R. M. Blanton, X. Han, M. Courtois, C. J. Weinheimer, K. A. Yamada, S. Brunet, H. Xu, J. M. Nerbonne, et al. 2005. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ. Res.* **96**: 225–233.
- Garcia-Martinez, C., M. Marotta, R. Moore-Carrasco, M. Guitart, M. Camps, S. Busquets, E. Montell, and A. M. Gomez-Foix. 2005. Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**: C1264–C1272.
- Kim, J. K., R. E. Gimeno, T. Higashimori, H. J. Kim, H. Choi, S. Punreddy, R. L. Mozell, G. Tan, A. Stricker-Krongrad, D. J. Hirsch, et al. 2004. Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* **113**: 756–763.
- Stahl, A., J. G. Evans, S. Pattel, D. Hirsch, and H. F. Lodish. 2002. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev. Cell*. **2**: 477–488.
- Wu, Q., A. M. Ortegon, B. Tsang, H. Doege, K. R. Feingold, and A. Stahl. 2006. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 3455–3467.
- Sebastian, D., L. Herrero, D. Serra, G. Asins, and F. G. Hegardt. 2007. CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**: E677–E686.
- Rubi, B., P. A. Antinozzi, L. Herrero, H. Ishihara, G. Asins, D. Serra, C. B. Wollheim, P. Maechler, and F. G. Hegardt. 2002. Adenovirus-mediated overexpression of liver carnitine palmitoyltransferase I in INS1E cells: effects on cell metabolism and insulin secretion. *Biochem. J.* **364**: 219–226.
- Veerkamp, J. H., T. B. van Moerkerk, J. F. Glatz, J. G. Zuurveld, A. E. Jacobs, and A. J. Wagenmakers. 1986. <sup>14</sup>C<sub>2</sub> production is no adequate measure of [<sup>14</sup>C]fatty acid oxidation. *Biochem. Med. Biol.* **35**: 248–259.
- Prip-Buus, C., I. Cohen, C. Kohl, V. Esser, J. D. McGarry, and J. Girard. 1998. Topological and functional analysis of the rat liver carnitine palmitoyltransferase I expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **429**: 173–178.
- van der Leij, F. R., K. B. Cox, V. N. Jackson, N. C. Huijckman, B. Bartelds, J. R. Kuipers, T. Dijkhuizen, P. Terpstra, P. A. Wood, V. A. Zammit, et al. 2002. Structural and functional genomics of the CPT1B gene for muscle-type carnitine palmitoyltransferase I in mammals. *J. Biol. Chem.* **277**: 26994–27005.

27. Lanni, A., M. Moreno, A. Lombardi, and F. Goglia. 1996. Biochemical and functional differences in rat liver mitochondrial subpopulations obtained at different gravitational forces. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**: 337–343.
28. Mascaro, C., E. Acosta, J. A. Ortiz, P. F. Marrero, F. G. Hegardt, and D. Haro. 1998. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 8560–8563.
29. Pich, S., D. Bach, P. Briones, M. Liesa, M. Camps, X. Testar, M. Palacin, and A. Zorzano. 2005. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum. Mol. Genet.* **14**: 1405–1415.
30. Schenk, S., and J. F. Horowitz. 2006. Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**: E254–E260.
31. Schrauwen, P., and M. K. Hesselink. 2004. The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc. Nutr. Soc.* **63**: 287–292.
32. Bonen, A., X. X. Han, D. D. Habets, M. Febbraio, J. F. Glatz, and J. J. Luiken. 2007. A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**: E1740–E1749.
33. Hatch, G. M., A. J. Smith, F. Y. Xu, A. M. Hall, and D. A. Bernlohr. 2002. FATP1 channels exogenous FA into 1,2,3-triacyl-sn-glycerol and down-regulates sphingomyelin and cholesterol metabolism in growing 293 cells. *J. Lipid Res.* **43**: 1380–1389.
34. Koves, T. R., J. R. Ussher, R. C. Noland, D. Slentz, M. Mosedale, O. Ilkayeva, J. Bain, R. Stevens, J. R. Dyck, C. B. Newgard, et al. 2008. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* **7**: 45–56.
35. Lewis, S. E., L. L. Listenberger, D. S. Ory, and J. E. Schaffer. 2001. Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1. *J. Biol. Chem.* **276**: 37042–37050.
36. Guitart, M., A. L. Andreu, E. García-Arumi, P. Briones, E. Quintana, A. M. Gómez-Foix, and C. García-Martínez. 2009. FATP1 localizes to mitochondria and enhances pyruvate dehydrogenase activity in skeletal myotubes. *Mitochondrion.* **9**: 266–272.
37. Marotta, M., A. Ferrer-Martnez, J. Parnau, M. Turini, K. Mace, and A. M. Gomez Foix. 2004. Fiber type- and fatty acid composition-dependent effects of high-fat diets on rat muscle triacylglyceride and fatty acid transporter protein-1 content. *Metabolism.* **53**: 1032–1036.
38. Stuhlsatz-Krouper, S. M., N. E. Bennett, and J. E. Schaffer. 1998. Substitution of alanine for serine 250 in the murine fatty acid transport protein inhibits long chain fatty acid transport. *J. Biol. Chem.* **273**: 28642–28650.
39. Richards, M. R., J. D. Harp, D. S. Ory, and J. E. Schaffer. 2006. Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. *J. Lipid Res.* **47**: 665–672.
40. King, K. L., W. C. Stanley, M. Rosca, J. Kerner, C. L. Hoppel, and M. Febbraio. 2007. Fatty acid oxidation in cardiac and skeletal muscle mitochondria is unaffected by deletion of CD36. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**: 234–238.
41. Luiken, J. J., D. J. Dyck, X. X. Han, N. N. Tandon, Y. Arumugam, J. F. Glatz, and A. Bonen. 2002. Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**: E491–E495.
42. Ibrahim, A., A. Bonen, W. D. Blinn, T. Hajri, X. Li, K. Zhong, R. Cameron, and N. A. Abumrad. 1999. Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J. Biol. Chem.* **274**: 26761–26766.
43. Bezaire, V., C. R. Bruce, G. J. Heigenhauser, N. N. Tandon, J. F. Glatz, J. J. Luiken, A. Bonen, and L. L. Spriet. 2006. Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**: E509–E515.

## Molecular Therapy for Obesity and Diabetes Based on a Long-Term Increase in Hepatic Fatty-Acid Oxidation

Josep M. Orellana-Gavaldà<sup>1</sup>, Laura Herrero<sup>1</sup>, Maria Ida Malandrino<sup>1</sup>, Astrid Pañeda<sup>2,3</sup>, Maria Sol Rodríguez-Peña<sup>2</sup>, Harald Petry<sup>2</sup>, Guillermina Asins<sup>1</sup>, Sander Van Deventer<sup>2</sup>, Fausto G. Hegardt<sup>1</sup> and Dolors Serra<sup>1</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB) and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), E-08028 Barcelona, Spain, and <sup>2</sup>Amsterdam Molecular Therapeutics, Amsterdam, Holland. <sup>3</sup>Current address: Division of Gene Therapy and Hepatology, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spain.

**Keywords:** AAV, fatty-acid oxidation, obesity and insulin resistance

### Contact Information:

Dolors Serra, PhD

Department of Biochemistry and Molecular Biology

School of Pharmacy

University of Barcelona

Av. Diagonal 643

E-08028 Barcelona, Spain

Tel: (34) 934 024 522

Fax: (34) 934 024 520

Email: dserra@ub.edu

**Abbreviations:** AAV, adeno-associated viruses; ACC1, acetyl-CoA carboxylase 1; ASP, acid-soluble products; BHB-CoA,  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA; CPT1A, carnitine palmitoyltransferase I liver isoform; DGAT2, diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2; GFP, green fluorescent protein; G6Pase, glucose-6-phosphatase; HFD, high-fat diet; HMGS2, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 2; MCD, malonyl-CoA decarboxylase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MTP, microsomal triacylglycerol transfer protein; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase-4; SCD1, stearoyl-Coenzyme A desaturase 1; TAG, triacylglyceride; UCP1, uncoupling protein 1; VLCAD, very long-chain acyl-CoA dehydrogenase.

**Financial Support:**

This study was supported by the Ministry of Education and Science, Spain (Grant SAF2007-61926 to F.G.H.), by Instituto de Salud Carlos III (Grant CB06/03/0026 to F.G.H. and research contract to J.M.O-G), and by Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya, Spain (Grant 2005SGR-00733 to F.G.H.).

## Abstract

Obesity-induced insulin resistance is associated with both ectopic lipid deposition and chronic, low-grade adipose tissue inflammation. Despite their excess fat, obese individuals show lower fatty-acid oxidation (FAO) rates. This has raised the question of whether burning off the excess fat could improve the obese metabolic phenotype. Here, we used human-safe non-immunoreactive adenoassociated viruses (AAV) to mediate long-term hepatic gene transfer of carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A), the key enzyme in fatty-acid  $\beta$ -oxidation, or its permanently active mutant form CPT1AM, to high-fat diet-treated and genetically obese mice. High-fat diet CPT1A- and, to a greater extent, CPT1AM-expressing mice showed an enhanced hepatic FAO which resulted in increased production of CO<sub>2</sub>, ATP and ketone bodies. Notably, the increase in hepatic FAO not only reduced liver triacylglyceride content, inflammation and ROS levels but also affected systemically to decrease epididymal adipose tissue weight and inflammation and to improve insulin signaling in liver, adipose tissue and muscle. Obesity-induced weight gain, increase in fasting blood glucose and insulin levels, and augmented expression of gluconeogenic genes were restored to normal only 3 months after AAV treatment. Thus, CPT1A- and, to a greater extent, CPT1AM-expressing mice were protected against obesity-induced weight gain, hepatic steatosis, diabetes and obesity-induced insulin resistance. In addition, genetically obese db/db mice that expressed CPT1AM showed reduced glucose and insulin levels, and liver steatosis. *Conclusion:* A chronic increase in liver FAO improves the obese metabolic phenotype, which indicates that AAV-mediated CPT1A expression could be a potential molecular therapy for obesity and diabetes.



## Introduction

Obesity is a major risk factor for disorders ranging from insulin resistance and type 2 diabetes (T2D) to hepatic steatosis and cardiovascular disease. The incidence of obesity is increasing worldwide and a concerted effort is being made to understand its pathogenesis. Two main mechanisms have been proposed to explain obesity-induced insulin resistance: on the one hand the ectopic deposition of triacylglyceride (TAG) outside the adipose tissue,<sup>1</sup> and on the other, the heightened inflammatory state of the adipose tissue and liver.<sup>2</sup>

However, the ultimate cause of obesity is an energy imbalance between intake and expenditure, leading to the accumulation of excess nutrients in lipid deposits. Therefore, any strategy able to tilt the balance towards fatty-acid oxidation (FAO) could improve obesity-induced disorders. Malonyl-CoA, derived from glucose metabolism and the first intermediate in lipogenesis, regulates FAO by inhibiting carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). This makes CPT1 the rate-limiting step in mitochondrial fatty-acid  $\beta$ -oxidation. Short-term genetic studies that increased FAO in liver showed a decrease in hepatic TAG content<sup>3</sup> and insulin resistance in obese rodents.<sup>4,5</sup> However, to date there is no successful approach to chronically increase FAO and improve whole-animal obesity-induced insulin resistance *in vivo*.

Here, we achieved hepatic gene transfer of CPT1A (CPT1 liver isoform) to obese mice by injecting adeno-associated viruses (AAV) into the tail vein. This led to a non-immunoreactive, long-term increase in lipid oxidation. We also used a mutant but active form of CPT1A (CPT1AM<sup>6</sup>), which is insensitive to malonyl-CoA and therefore leads to a permanent increase in the rate of FAO, independently of the glucose-derived malonyl-CoA levels. Our results show that an increase in hepatic FAO through AAV-mediated gene transfer of CPT1A and CPT1AM reduced obesity-induced hepatic steatosis, weight gain, inflammation, diabetes and insulin resistance in mice consuming a high-fat diet (HFD). Furthermore, CPT1AM expression also reduced glucose and insulin levels, and liver steatosis in genetically obese *db/db* mice.

## Results

### ***AAV1-Mediated Expression of CPT1A and CPT1AM in Mouse Liver Increases***

**FAO.** To deliver CPT1A, CPT1AM and GFP as a control to the mouse liver we prepared three adeno-associated virus: AAV1-CPT1A, AAV1-CPT1AM and AAV1-GFP. The genome of each virus contained the target gene under the control of a liver-specific promoter EalbAATp (Fig. 1A). AAV were administrated by the tail-vein injection to C57Bl/6J mice that had been feeding for two weeks on either normal chow diet (NCD) or HFD. Mice were studied throughout the dietary treatment, and killed at either 4 or 13 weeks after AAV administration, for short- or long-term studies, respectively (Fig. 1A). Long-term expression of the virus was evaluated in mice injected with AAV-GFP until they were 33 weeks old (Supporting Fig. 1A-D). Specific expression of CPT1A and CPT1AM in the liver was measured by qRT-PCR (Fig. 1B). CPT1A mRNA expression levels were 58%, and 62% higher in liver of CPT1A- and CPT1AM-expressing mice, respectively, compared to GFP control mice. No significant differences were seen in other tissues such as muscle or white adipose tissue (Fig. 1B). Liver CPT1 protein and activity levels were increased in those animals injected with AAV-CPT1A and AAV-CPT1AM compared to control AAV-GFP in both HFD (Fig. 1C,D) and NCD (Supporting Fig. 2A,B). Liver protein levels increased  $3.08 \pm 0.2$ - and  $3.01 \pm 0.15$ -fold in HFD CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice, respectively, compared to GFP control mice (Supporting Fig. 1E). CPT1 activity was also higher in HFD CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice compared to GFP control mice (GFP:  $2.51 \pm 0.07$ , CPT1A:  $3.96 \pm 0.25$ , and CPT1AM:  $4.53 \pm 0.15$  nmol.mg prot<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>;  $P < 0.05$ ) (Fig. 1D).

CPT1AM is not inhibited by malonyl-CoA in yeast, pancreatic  $\beta$ -cells, muscle cells or primary rat hepatocytes.<sup>6-9</sup> We measured CPT1 activity in the presence of increasing concentrations of malonyl-CoA in liver mitochondrion-enriched fractions of GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice. At physiological concentrations of malonyl-CoA (1 to 10  $\mu$ M), CPT1AM-expressing mice retained up to 78% of their activity, while GFP- and CPT1A-expressing mice retained only 48% (Fig. 1E). This indicates that cells expressing CPT1AM will retain most of their CPT1 activity independently of the malonyl-CoA levels. Notably, liver

malonyl-CoA levels were similar for GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice fed on either NCD or HFD (Supporting Fig. 1F).

Next, we examined whether the increase in CPT1 mRNA, protein and activity seen in CPT1A- and CPT1AM-expressing mice affected fatty-acid  $\beta$ -oxidation. We isolated primary hepatocytes from GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice treated with NCD or HFD and measured [1-<sup>14</sup>C]oleate oxidation to CO<sub>2</sub> and acid-soluble products (ASP), mainly ketone bodies. In HFD-treated mice, FAO to CO<sub>2</sub> increased by 20.9%  $\pm$  0.8, and 56.4%  $\pm$  4.6 in CPT1A- and CPT1AM-expressing mice, respectively, compared to GFP control mice (Fig. 1F). Similar results were obtained for FAO to ASP and total FAO (the sum of oxidation to CO<sub>2</sub> and ASP) in HFD-treated mice (Supporting Fig. 2C,D) and in NCD-treated mice (Supporting Fig. 2E-G). Importantly, oxidation rates were higher in CPT1AM- than in CPT1A-expressing mice, consistent with the higher efficiency of CPT1AM independently of the glucose-derived malonyl-CoA concentrations.

Long-chain fatty-acids undergoing  $\beta$ -oxidation yield acetyl-CoA moieties that have two main possible fates: 1) entry to the Krebs cycle for complete oxidation and ATP production, or 2) conversion to ketone bodies. We hypothesized that accelerated  $\beta$ -oxidation due to CPT1A expression could reduce the surplus of acetyl-CoA groups via both pathways. Liver ATP levels of CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice were increased compared to control GFP mice both in NCD and HFD (Table 1). Liver protein levels of mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGS2), the rate-limiting enzyme of hepatic ketogenesis, were increased in CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice compared to control (Fig. 1C and Supporting Figs 1E and 2A). Consistent with this, liver and serum levels of ketone bodies such as  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA (BHB-CoA) were higher in CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice than in GFP control mice both in NCD or HFD (Table 1).

***CPT1A and CPT1AM Expression Protected from Obesity-Induced Weight Gain and Insulin Resistance.*** We next examined the effects of increased  $\beta$ -oxidation on the obese metabolic phenotype. Mice injected with AAV-GFP, AAV-CPT1A or AAV-CPT1AM

were studied under a HFD treatment. While no weight differences were seen in CPT1A- or CPT1AM-expressing mice on NCD, CPT1AM-expressing mice on HFD weighed significantly less than control mice 11 weeks after AAV infection (GFP:  $38.7 \pm 1.4$  g, CPT1AM:  $32.5 \pm 1.3$  g;  $P < 0.04$ ) (Fig. 2A). Interestingly, CPT1AM-expressing mice showed a stronger anti-obesity effect than CPT1A-expressing mice, most likely due to the higher FAO rate observed in the former. The differences in weight gain were not attributable to differences in food consumption since daily rates of food intake were equal in GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice (Table 1). Notably, fasting blood glucose concentrations (GFP:  $128.6 \pm 18.0$ , CPT1A:  $87.2 \pm 10.7$ , and CPT1AM:  $82.0 \pm 7.1$  mg/dl;  $P < 0.05$ ) and insulin levels (GFP:  $0.72 \pm 0.10$ , CPT1A:  $0.25 \pm 0.02$ , and CPT1AM:  $0.22 \pm 0.02$  ng/ml;  $P < 0.04$ ) were lower in both CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice than in control mice on HFD, and similar to the levels found in the mice on NCD (Fig. 2B). Glucose tolerance (measured via an intraperitoneal GTT; Fig. 2C, left panel) and gluconeogenesis (measured via an intraperitoneal injection of pyruvate; Fig. 2C, right panel) were lower in both CPT1A- and CPT1AM-expressing mice than in HFD control mice. Thus, CPT1A and CPT1AM expression improved the obesity-induced diabetic and insulin-resistant phenotype.

We then examined the effect of the higher FAO levels in CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on liver steatosis. Liver TAG content of HFD CPT1A- and CPT1AM-expressing mice was lower than that of HFD control mice (Fig. 3A). Consistent with this, circulating levels of free fatty acids (FFA) and TAG were also reduced (Table 1). While liver from HFD control mice showed severe centrilobular steatosis, those of CPT1A-, and to a greater extent CPT1AM-expressing mice, were clearly improved (Fig. 3B). CPT1A- and CPT1AM-expression did not affect liver histology in NCD mice (Fig. 3B).

***AAV-CPT1A and AAV-CPT1AM-Treatment Reverted the HFD-Induced Increase in Hepatic Gluconeogenesis, Inflammation and ROS Levels.*** We next examined the mechanisms by which accelerated FAO in CPT1A- and CPT1AM-expressing mice improved obesity-induced diabetes and insulin resistance. Four weeks after virus injection hepatic

mRNAs levels of genes involved in gluconeogenic, lipogenic and inflammatory pathways were analyzed. At this short time glucose (data not shown) and body weight (Fig. 2A) values were already normalized in HFD CPT1AM-expressing mice compared to HFD control mice. mRNA levels of glucose-6-phosphatase (G6Pase) and pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4), which are involved in the gluconeogenic and glycolytic pathways, were increased under HFD-treatment (Fig. 4A). The increase in G6Pase and PDK4 expression attributed to HFD was restored to NCD values in CPT1A<sup>-</sup>, and CPT1AM-expressing mice. No changes were observed in PEPCK mRNA levels (Supporting Fig. 3A). We next looked at lipogenic enzymes such as acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (DGAT2) and the VLDL secretory enzyme microsomal triacylglycerol transfer protein (MTP). ACC1 and DGAT2 expression was lower in the HFD group, but this decrease was restored in CPT1A<sup>-</sup> and CPT1AM-expressing mice (Fig. 4C). Similar results were seen for other lipogenic genes such as stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (SCD1), and AAC2 mRNA levels (Supporting Fig. 3B,C). Correlating with de novo lipogenesis normalization, the HFD-increase of MTP mRNA levels seen in GFP control mice was blunted in CPT1A<sup>-</sup> and CPT1AM-expressing mice, in which values returned to NCD control levels (Fig. 4C). These results indicated that the increase in liver FAO observed in CPT1A<sup>-</sup>, and CPT1AM-expressing mice improved liver glucose and lipid metabolism.

Obesity-induced insulin resistance has been associated with chronic, low-grade inflammation in liver and adipose tissue.<sup>2</sup> To investigate the involvement of inflammation in the improvement of insulin resistance in CPT1A<sup>-</sup> and CPT1AM-expressing mice, we measured mRNA levels of several proinflammatory markers. mRNA levels for TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\alpha$  increased 1.56-, 2.30-, and 4.86-fold, respectively, in HFD GFP control mice vs. NCD ( $P < 0.04$ ) (Fig. 5A). Importantly, these values were restored to NCD values in both CPT1A<sup>-</sup> and CPT1AM-expressing mice. Similar results were obtained for iNOS, SOCS3, and MCP-1 (Supporting Fig. 3D). Thus, CPT1A and CPT1AM expression and the concomitant increase in FAO reduced obesity-induced inflammatory stress in the liver. Oxidative stress can cause inflammation.<sup>10</sup> Thus, we next evaluated the mRNA expression

of the uncoupling protein UCP2, a thermogenic protein and a marker of oxidative stress,<sup>11</sup> and ROS liver levels. While HFD increased liver UCP2 mRNA levels in control mice, this increase was blunted in CPT1A- and CPT1AM-expressing mice (Fig. 4B). These results are consistent with liver ROS levels analyzed from GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice under NCD or HFD treatment. HFD increased ROS levels by  $77.29\% \pm 12.33$  ( $P < 0.05$ ) in control mice (Fig. 5B). However, ROS levels in CPT1A- and CPT1AM-expressing mice were not significantly different from NCD values.

All together, our results indicate that the mechanisms by which CPT1A- and CPT1AM-expressing mice improved obesity-induced insulin resistance and diabetes involve a decrease in gluconeogenesis, restoration of fatty-acid synthesis levels, and decreased inflammatory and ROS levels.

**Systemic Effect of Liver CPT1A, and CPT1AM Expression.** We examined the systemic effect of a chronic increase in liver FAO in adipose tissue. Epididymal adipose tissue weight from CPT1A- and CPT1AM-expressing mice on HFD was reduced by  $34.57\% \pm 7.9$ , and  $68.15\% \pm 3.9$ , respectively, compared to HFD GFP control mice ( $P < 0.01$ ) (Fig. 6A). The stronger decrease in the epididymal fat pad from CPT1AM-expressing mice is consistent with their higher rate of liver FAO (Fig. 1F). Concordant with the decrease in the adipose tissue weight, leptin serum levels from HFD CPT1A- and CPT1AM-expressing mice were reduced 1.8-, and 2.6-fold, respectively, compared to HFD GFP control mice ( $P < 0.04$ ) (Fig. 6B).

Obese adipose tissue is characterized by enlarged adipocytes together with an increase in mononuclear cell infiltration.<sup>12-15</sup> Mononuclear cell infiltration was lower in HFD CPT1A-expressing mice, and almost undetectable in HFD CPT1AM-expressing mice (Fig. 6C). Consistent with this, expression of proinflammatory markers such as TNF $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 was lower in epididymal fat pads from HFD CPT1A- and CPT1AM-expressing mice than in HFD GFP control mice (Fig. 6D-F).

The effect of an increase in hepatic FAO on insulin signaling was evaluated in liver, adipose tissue, muscle, and spleen. Interestingly, HFD-induced reduction of insulin-stimulated AKT phosphorylation was improved in CPT1A- and CPT1AM-expressing mice not only in liver but also in epididymal adipose tissue and muscle (Fig. 7A). No differences were seen in spleen. This is consistent with the improvements in glucose and insulin levels seen in these mice (Fig. 2B,C).

**AAV-CPT1AM-Treatment Improved Obesity-Induced Insulin Resistance and Diabetes in *db/db* Mice.** Since CPT1AM expression gave the strongest effect in terms of FAO, we examined the effect of AAV-CPT1AM-treatment on genetically obese mice. AAV-GFP or AAV-CPT1AM was injected into 8-week-old *db/db* and *db/+* control mice and the metabolic phenotype was analyzed 3 months later. CPT1AM treatment reduced glucose by  $41.2\% \pm 3.5$  and insulin levels by  $51.3\% \pm 4.6$  in *db/db* mice (Fig. 7B,C). Hepatic steatosis was reduced (Fig. 7D) but no differences were seen in epididymal adipose tissue (Supporting Fig. 3F).

## Discussion

It is widely accepted that pharmacological or genetic strategies to enhance FAO may be beneficial for the treatment of obesity and T2D. Shulman and colleagues<sup>1,17</sup> showed that increasing FAO can ameliorate insulin resistance by reducing hepatic and intramyocellular lipid levels. However, increased rates of FAO in muscle have also been associated with skeletal muscle insulin resistance<sup>18,19</sup> due to mitochondrial overload and incomplete FAO.<sup>20</sup> Furthermore, recent studies from Hoehn *et al.*<sup>21</sup> reported that an increase of FAO has little effect on adiposity and weight-gain in mice fed HFD. These findings raise questions about whether strategies that increase FAO *per se* are sufficient to reduce whole-body adiposity *in vivo*, and which are the most appropriate tissue and gene targets. The data presented here support the notion that increased flux of fatty acids exclusively into liver mitochondria by chronic over expression of the  $\beta$ -oxidation key enzyme, CPT1A, protects against obesity-induced insulin resistance and T2D.

The beneficial effects of CPT1A, and CPT1AM gene transfer reported here were mainly the consequence of three key factors. First, the use of AAV for long-term gene expression. Recombinant AAVs are attractive candidates for use as human gene therapy vehicles because they may overcome the problem of preexisting immunity<sup>22,23</sup> against human AAV serotypes, and produce long-term expression of the target genes. Second, the choice of the liver as a target organ, since it plays a central role in both energy expenditure and lipid/glucose homeostasis. And third, the use of a mutant but active form of CPT1A (CPT1AM<sup>6</sup>), which is insensitive to its physiological inhibitor, malonyl-CoA. We and others have shown that expression of CPT1AM leads to a permanent rise in the rate of FAO, independently of the glucose-derived malonyl-CoA levels.<sup>7-9</sup> Overall, the use of AAV-CPT1A and AAV-CPT1AM led to a long-term liver-selective gene transfer that allowed us to evaluate the metabolic impact and underlying mechanisms of increased FAO in HFD and genetically obese mice.

HFD CPT1A- and CPT1AM-expressing mice showed general improvement in hepatic glucose and lipid metabolism as a consequence of increased hepatic fatty acid flux



through mitochondria. This, in turn, prevented intracellular lipid accumulation in liver and adipose tissue, especially in CPT1AM-expressing mice. However, increased fatty acid flux in the absence of a concomitant dissipation of FAO metabolites has been associated with enhanced ROS production<sup>24</sup> and a consequent inflammatory state.<sup>10,25,26</sup> Interestingly, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on HFD had normalized liver ROS levels and inflammatory state in both liver and adipose tissue, with a significant decrease in proinflammatory mediators such as TNF $\alpha$ , IL-6 and MCP-1. These results suggest that factors other than a chronic FAO increase *per se* are responsible for ROS production and inflammation. Accumulation of toxic substances (DAG or ceramides),<sup>27</sup> hypoxia<sup>28</sup> as well as adipose tissue-derived cytokines<sup>2</sup> might participate in the induction of ROS production and inflammation. On the other hand, the beneficial effect of an increased FAO rate observed in HFD CPT1A- and CPT1AM-expressing mice might also be attributed to a concomitant enhancement of hepatic ketone body production (present data and<sup>29</sup>). Although to a lesser extent, increased FAO to CO<sub>2</sub>, ATP and ASPs was also observed in NCD CPT1A- and CPT1AM-expressing mice. Importantly, no changes were seen in this case in body weight, hepatic ROS levels or other hepatic parameters. The present results reinforce the idea that hepatic CPT1A-, and to a greater extent CPT1AM-, treatment is a valid *in vivo* strategy to reduce obesity and improve metabolic parameters without producing undesired alterations on NCD conditions. However, we cannot rule out possible side effects produced by hepatic FAO induction for periods longer than those tested in this study.

Several authors have focused on treatments to increase FAO in order to reduce hepatic steatosis, such as liver-specific ACC suppression<sup>5</sup> or hepatic MCD overexpression.<sup>4</sup> They reported a decrease in hepatic TAG content and insulin resistance in obese animals, which is consistent with our findings. However, the contribution of an increase in FAO was difficult to discern since these were short-term studies using approaches that also targeted other metabolic functions. In contrast, a direct increase in FAO through adenovirus-mediated over expression of CPT1A was reported by Odoherly *et al.*<sup>3</sup> The latter study also showed a reduction in hepatic TAG levels, although it was too short to reveal any

improvement in insulin sensitivity. Our strategy directly and chronically increased FAO in HFD-treated mice. This led to a decrease in hepatic TAG content and circulating FFA and a consequent improvement in insulin signaling, not only in liver but also in muscle and adipose tissue. Thus, AAV-mediated expression of CPT1A, and to a greater extent CPT1AM, protected mice from HFD-induced whole-animal insulin resistance without altering any of these parameters in NCD control mice..

The lack of pathogenicity of the AAV vectors used and the improvement in hepatic steatosis, serum glucose and insulin levels observed in the severe obesity developed by genetically obese *db/db* mice are encouraging results with which to address new challenges related with this gene transfer system. Further studies will be required to elucidate long-term risks which involve both vector and transgene. Uncertainties surrounding gene transfer such as gene integration, the effects of long latencies and the probability of subtle effects during long-term gene expression must be studied with care. Furthermore, additional caution is needed regarding the feasibility of extrapolating these data to humans, particularly in NAFLD , which is considered a relatively benign disease.

In summary, we report a novel and efficient gene therapy approach to reduce body weight, liver steatosis, fat accumulation in adipose tissue, and obesity-induced diabetes and insulin resistance in rodents. This was achieved by an AAV-mediated, long-term increase in FAO. These results point towards CPT1A as new potential therapeutic target against obesity-induced disorders

## Materials

**Adeno-Associated Vectors.** AAV vectors, serotype 1, AAV1-AAT-GFP, AAV1-AAT-CPT1A and AAV1-AAT-CPT1AM were constructed to drive mouse liver expression of GFP, CPT1A and CPT1AM respectively. Vector plasmids carried the human albumin enhancer element and the human  $\alpha$ 1-antitrypsin (EalbAATp) liver-specific promoter described by Kramer et al.;<sup>30</sup> the cDNA sequence of GFP,<sup>31</sup> CPT1A<sup>31</sup> and CPT1AM;<sup>6</sup> the woodchuck posttranscriptional regulatory element (WPRE, acc #AY468-486);<sup>32</sup> and the bovine growth hormone polyadenosine transcription termination signal [bGH-poly(A)] (bases 2326-2533 GenBank acc #M57764). The expression cassette was flanked by two inverted terminal repeats (ITRs) derived from AAV2. AAV1 vectors were produced in insect cells using baculovirus<sup>33</sup>. The vector preparations used had titers of  $1 \times 10^{12}$ ,  $7.6 \times 10^{11}$ , and  $7.5 \times 10^{11}$  genome copies (gc)/ml for AAV1-AAT-GFP, AAV1-AAT-CPT1A, and AAV1-AAT-CPT1AM respectively.

**Animals.** Eight-week-old male C75Bl/6J mice were fed for 10-15 weeks with either NCD (TestDiet D8Y2, 10% Kcal fat) or HFD (TestDiet D8Y1, 60% Kcal fat). Two weeks after diet treatment, AAV1 vectors were administered by tail vein injection in a single dose of  $7.5 \times 10^{12}$  gc/kg of body weight. Mice were killed 4 to 13 weeks after virus injection. Eight-week-old male C75BL/KsJ-*db/db* and C75BL/KsJ-*db/+* control mice were injected with AAV1 vectors in the tail vein, at the single dose of  $7.5 \times 10^{12}$  gc/kg and killed 17 weeks later.

**Methods.** Primary mouse hepatocytes were isolated by the collagenase method<sup>33</sup> and used to measure fatty-acid oxidation to CO<sub>2</sub>.<sup>34</sup> Isolation of mitochondria from liver were obtained as previously described.<sup>35</sup> Measurement of CPT1 activity was determined by the radiometric method.<sup>36</sup> Glucose and pyruvate tolerance tests (2.0 g per kg body weight) were administered by intraperitoneal injection after an overnight fast. Histological examination was done using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections stained with hematoxylin-eosin at the Pathology Department of the Hospital Clinic of Barcelona.

**Statistical Analysis and Other Methods.** Data are presented as mean ± S.E.M. Student *t* tests were used for statistical analysis. Differences were considered significant at  $P < 0.05$  and complete methods are described in the supporting documents.

*Acknowledgements:* We thank Gloria González-Aseguinolaza for the supplying EalbAATp promoter, Olga Jáuregui and Eli Bermudo from the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona for their technical assistance in the HPLC/MS analysis, and Robin Rycroft of the Language Service for valuable assistance in the preparation of the English manuscript.

Accepted Preprint

## References

1. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 2007;87:507-20.
2. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007;132:2169-80.
3. Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E969-77.
4. An J, Muoio DM, Shiota M, Fujimoto Y, Cline GW, Shulman GI, Koves TR, Stevens R, Millington D, Newgard CB. Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat Med* 2004;10:268-74.
5. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu ZX, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Cline GW, Yu XX, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Shulman GI. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest* 2006;116:817-24.
6. Morillas M, Gomez-Puertas P, Bentebibel A, Selles E, Casals N, Valencia A, Hegardt FG, Asins G, Serra D. Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem* 2003;278:9058-63.
7. Herrero L, Rubi B, Sebastian D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG. Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2005;54:462-71.
8. Sebastian D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG. CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E677-86.
9. Akkaoui M, Cohen I, Esnous C, Lenoir V, Sournac M, Girard J, Prip-Buus C. Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J* 2009;420:429-38.
10. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
11. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002;415:96-9.
12. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-808.
13. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009;15:930-9.

14. Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR. T-ing up inflammation in fat. *Nat Med* 2009;15:846-7.
15. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB, Hotamisligil GS, Shi GP. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 2009;15:940-5.
16. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007;56:2910-8.
17. Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, Liu ZX, Kim S, Kulkarni A, Distefano A, Hwang YJ, Reznick RM, Codella R, Zhang D, Cline GW, Wakil SJ, Shulman GI. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16480-5.
18. Finck BN, Bernal-Mizrachi C, Han DH, Coleman T, Sambandam N, LaRiviere LL, Holloszy JO, Semenkovich CF, Kelly DP. A potential link between muscle peroxisome proliferator- activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metab* 2005;1:133-44.
19. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 2008;7:45-56.
20. Muoio DM, Koves TR. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007;32:874-83.
21. Hoehn KL, Turner N, Swarbrick MM, Wilks D, Preston E, Phua Y, Joshi H, Furler SM, Larance M, Hegarty BD, Leslie SJ, Pickford R, Hoy AJ, Kraegen EW, James DE, Cooney GJ. Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. *Cell Metab*;11:70-6.
22. Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 1995;17:237-45.
23. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 2008;16:1073-80.
24. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1095-105.
25. Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2005;280:4617-26.
26. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801.
27. Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 2006;45:42-72.

28. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007;56:901-11.
29. Drynan L, Quant PA, Zammit VA. Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over beta-oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states. *Biochem J* 1996;317 ( Pt 3):791-5.
30. Kramer MG, Barajas M, Razquin N, Berraondo P, Rodrigo M, Wu C, Qian C, Fortes P, Prieto J. In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Mol Ther* 2003;7:375-85.
31. Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem* 1993;268:5817-22.
32. Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* 1998;9:2745-60.
33. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, Postic C. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2004;279:20314-26.
34. Veerkamp JH, van Moerkerk TB, Glatz JF, Zuurveld JG, Jacobs AE, Wagenmakers AJ. <sup>14</sup>C<sub>2</sub> production is no adequate measure of [<sup>14</sup>C]fatty acid oxidation. *Biochem Med Metab Biol* 1986;35:248-59.
35. Rubi B, Antinozzi PA, Herrero L, Ishihara H, Asins G, Serra D, Wollheim CB, Maechler P, Hegardt FG. Adenovirus-mediated overexpression of liver carnitine palmitoyltransferase I in INS1E cells: effects on cell metabolism and insulin secretion. *Biochem J* 2002;364:219-26.
36. Morillas M, Clotet J, Rubi B, Serra D, Asins G, Arino J, Hegardt FG. Identification of the two histidine residues responsible for the inhibition by malonyl-CoA in peroxisomal carnitine octanoyltransferase from rat liver. *FEBS Lett* 2000;466:183-6.



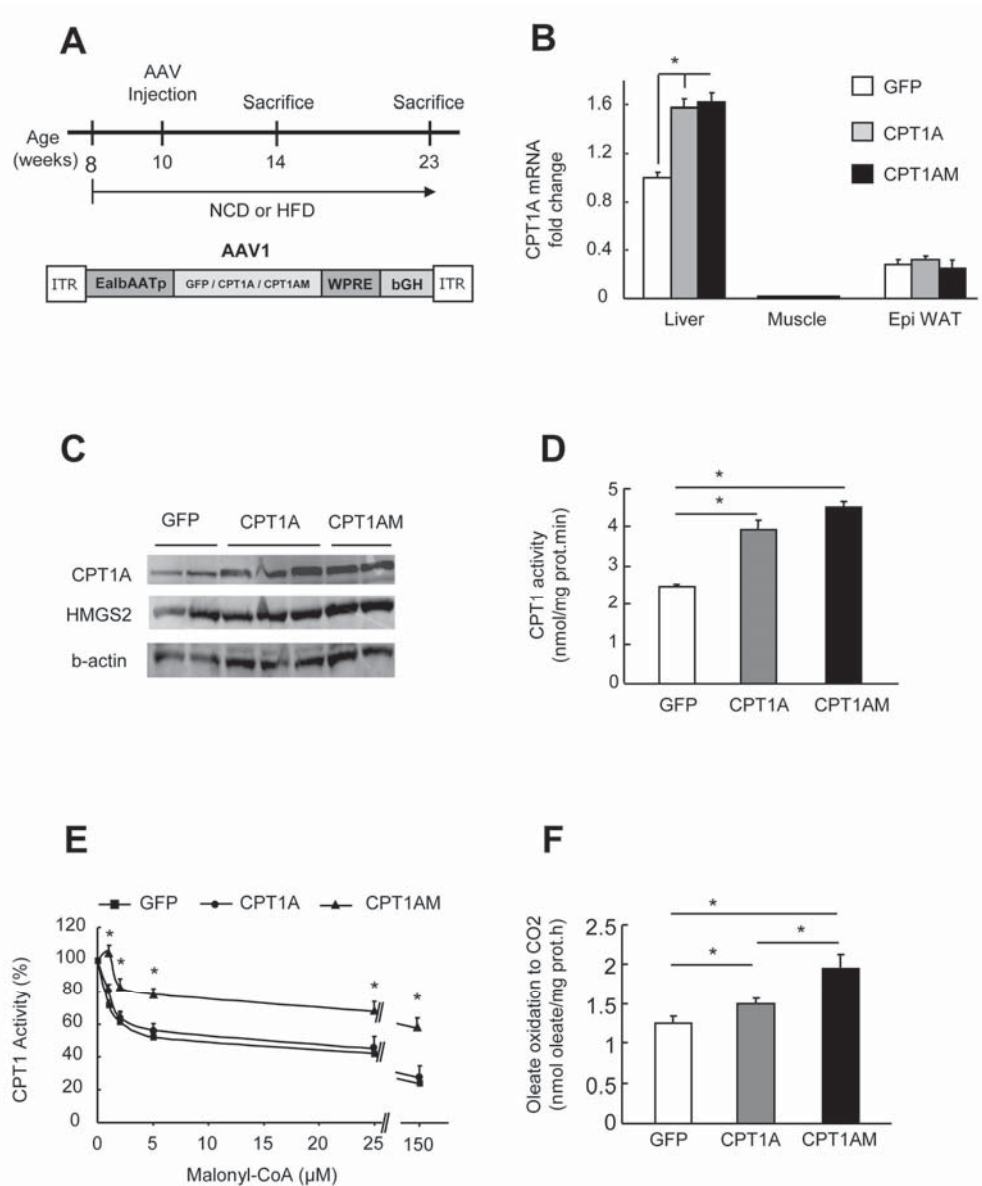


Fig. 1. Increased CPT1A mRNA, protein, activity and oleate oxidation in CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on HFD. (A) Experiment time course and schema of the AAV vectors: AAV-GFP; AAV-CPT1A, and AAV-CPT1AM. The cassettes contain the GFP, CPT1A or CPT1AM transgene driven by liver specific EalbAATp promoter. (B) CPT1A mRNA expression in liver, epididymal white adipose tissue (epi WAT), and muscle from 14-week-old HFD-treated mice. Primers recognize both CPT1A and CPT1AM sequences. (C) Protein levels from liver mitochondria of HFD mice. (D,E) CPT1 activity from isolated liver mitochondria of HFD fed mice and CPT1 activity from NCD liver mitochondria-enriched cell fractions incubated with different amounts of malonyl-CoA. Data are means  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. (F) Oleate oxidation to CO<sub>2</sub> from primary hepatocytes isolated from HFD GFP-, CPT1A-, or CPT1AM-expressing mice. Experiments were done at 4 weeks after the virus treatment. Shown representative experiments performed in triplicate. n=6-10. \*P < 0.05. \*\*P < 0.05 vs. GFP. 189x224mm (300 x 300 DPI)

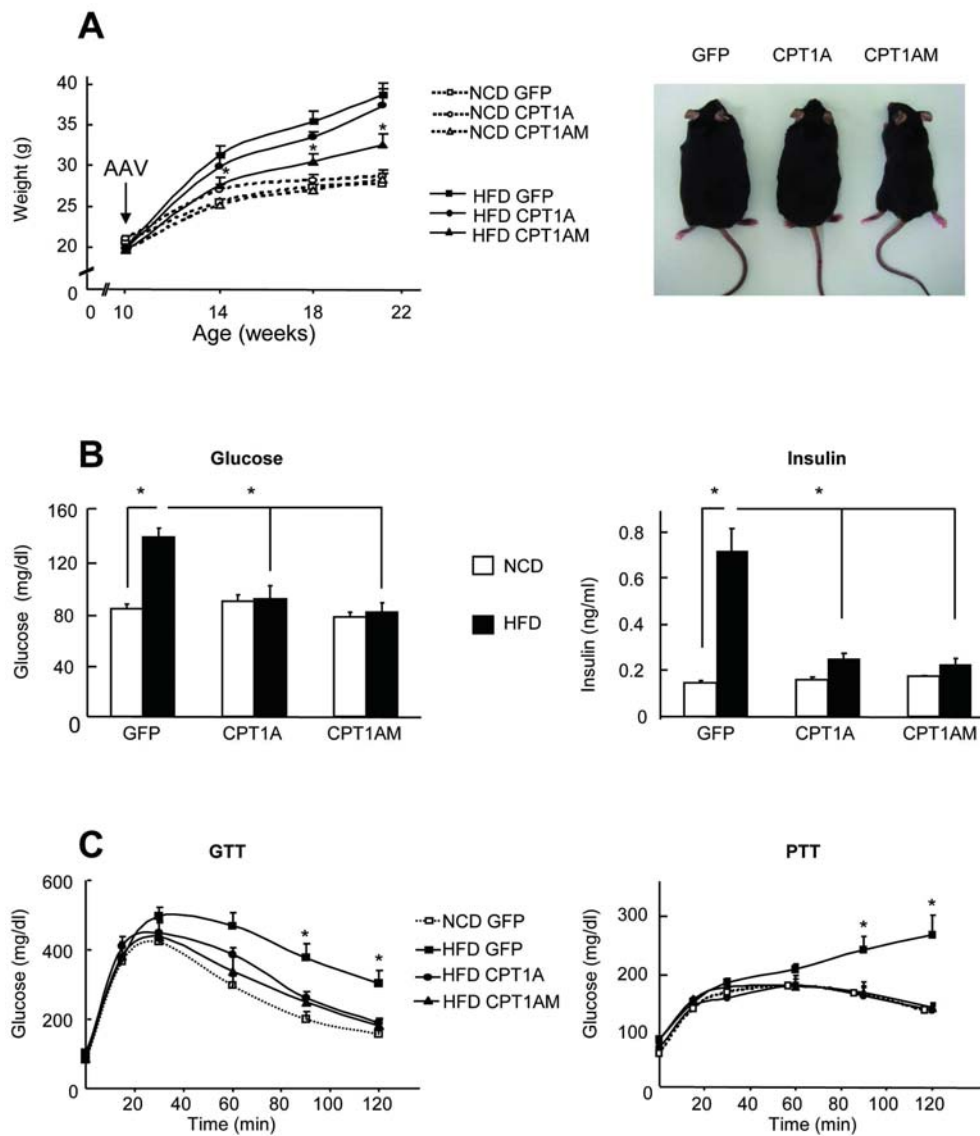


Fig. 2. Metabolic parameters in CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice. (A) Body weight. \*  $P < 0.05$  HFD AAV-CPT1AM vs. NCD AAV-GFP, left panel and mice receiving CPT1A, and CPT1AM remained leaner than control 3 months after AAV injection and HFD treatment, right panel. (B) Fasting blood glucose, left panel and insulin levels, right panel. (C) Glucose tolerance test, left panel and pyruvate tolerance test, right panel.  $n=6-10$ . \*  $P < 0.05$ .

191x219mm (300 x 300 DPI)

Accepted Preprint

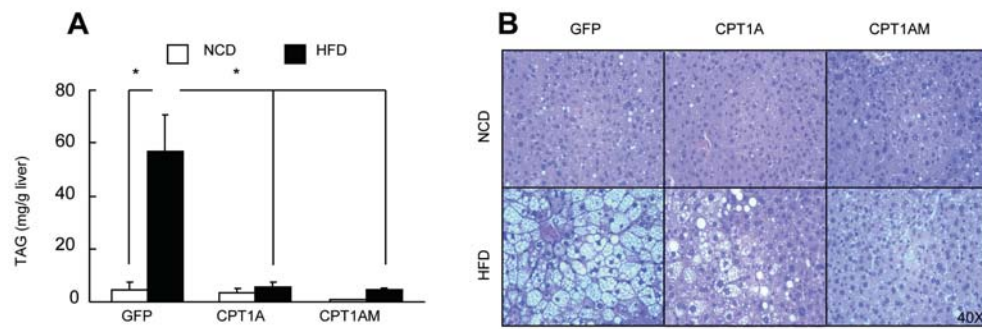


Fig. 3. Liver TAG content and liver histology in CPT1A<sup>-/-</sup> and CPT1AM<sup>-/-</sup> expressing mice. (A) Liver TAG content of 14-week-old GFP, CPT1A<sup>-/-</sup>, and CPT1AM<sup>-/-</sup> expressing mice. (B) Liver histological sections (H&E staining) from representative 29-week-old GFP<sup>-/-</sup>, CPT1A<sup>-/-</sup>, and CPT1AM<sup>-/-</sup> expressing littermates. n=6-10. \* P < 0.05. 234x78mm (300 x 300 DPI)

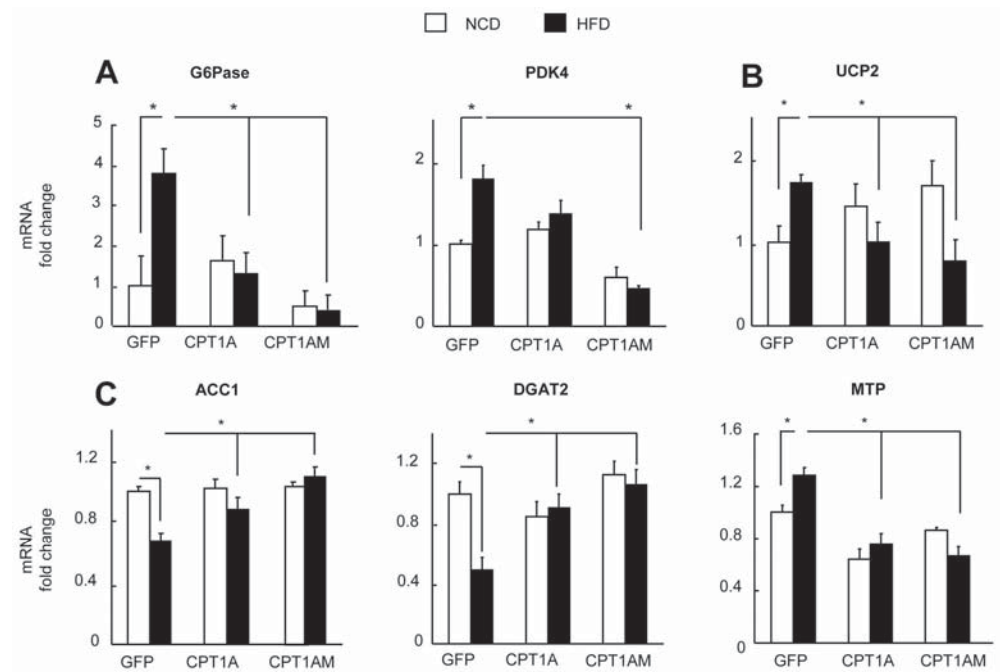


Fig. 4. Liver gene expression. (A-C) mRNA expression in liver of 14-week-old GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on NCD (open bars) vs. HFD (filled bars). n= 6-10. \* P < 0.05. 215x144mm (300 x 300 DPI)

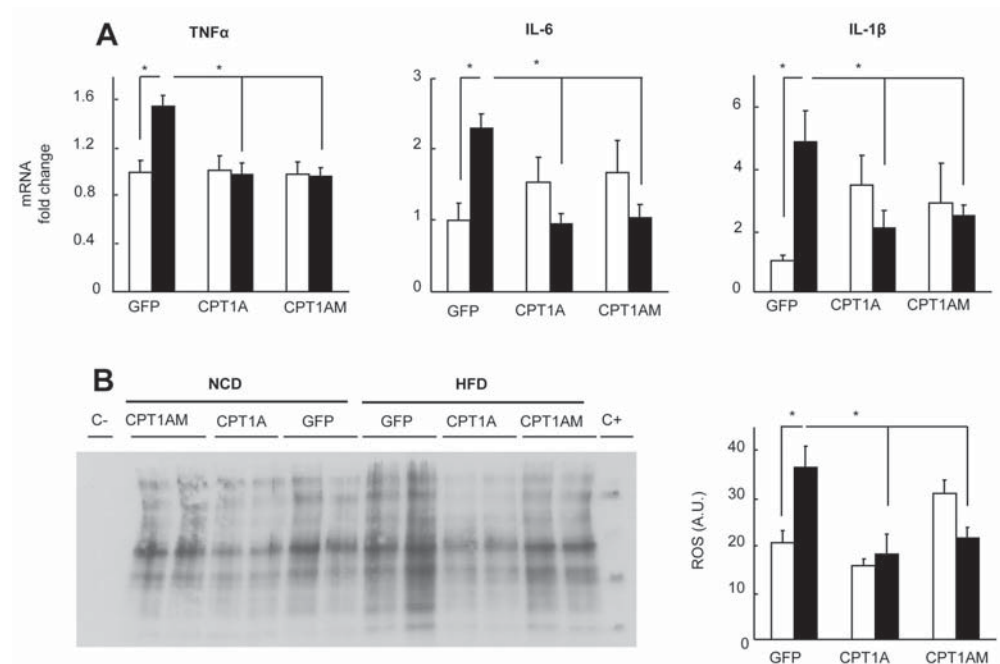


Fig. 5. Liver gene expression and ROS levels. (A) mRNA expression in liver of 14-week-old GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on NCD (open bars) vs. HFD (filled bars). (B) Analysis and quantification of ROS from liver total extract of 14-week-old GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on NCD (open bars) and HFD (filled bars). A.U., arbitrary units. n= 6-10. \* P < 0.05. 226x150mm (300 x 300 DPI)

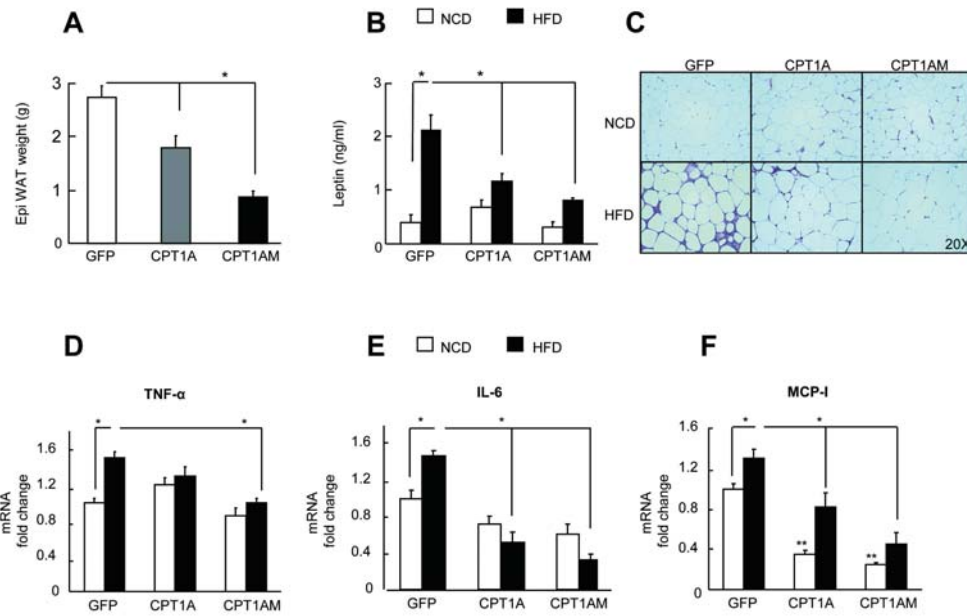


Fig. 6. Adipose tissue weight, circulating leptin, histology and gene expression (A) Epididymal white adipose tissue (Epi WAT) weight from GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice after 11 weeks on HFD. (B) Circulating leptin concentrations from GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on NCD (open bars) or HFD (filled bars). (C) Histological sections from epididymal adipose tissue from a representative GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing littermates stained with H&E. (D-F) mRNA expression in adipose tissue of 14-week-old GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on NCD (open bars) and HFD (filled bars).  $n = 6-10$ . \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.05$  NCD AAV-GFP vs. NCD AAV-CPT1A or AAV-CPT1AM.

247x153mm (300 x 300 DPI)

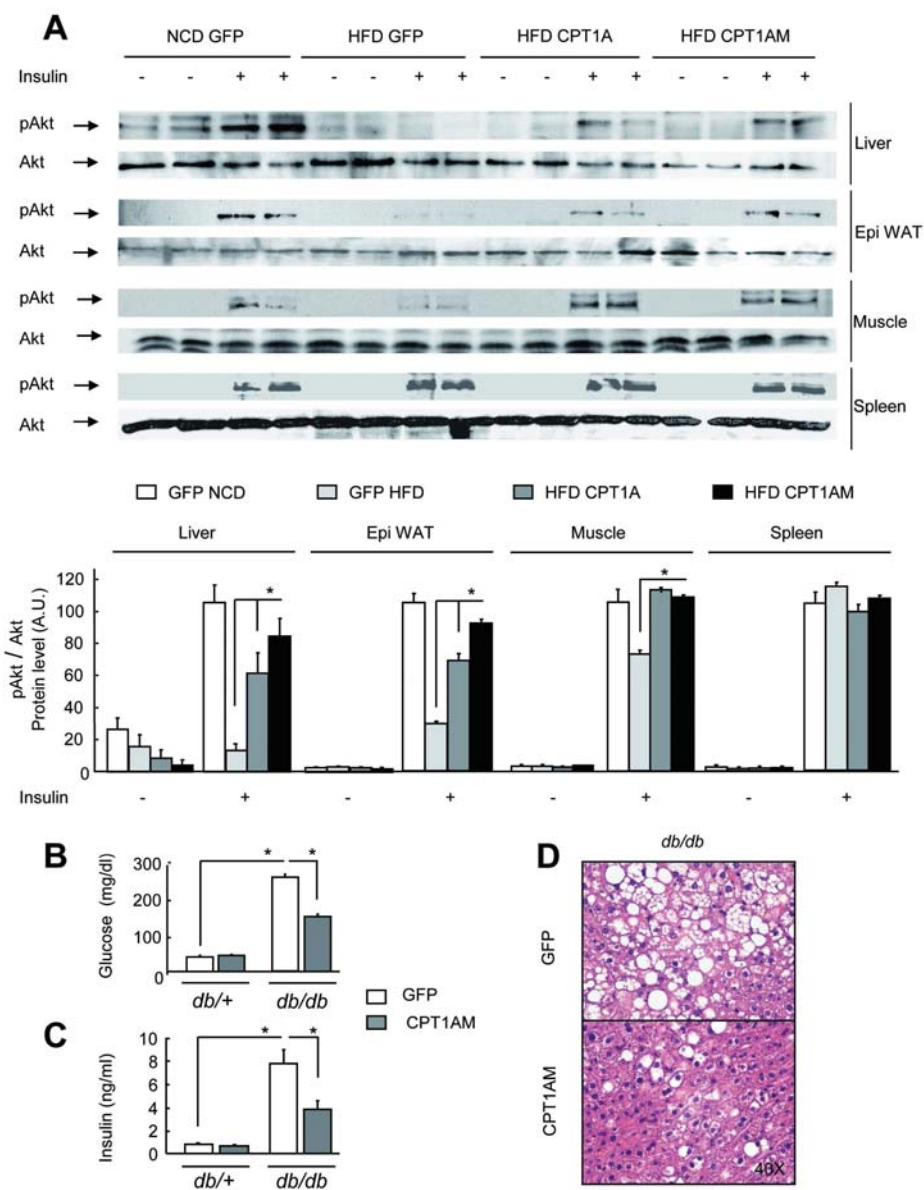


Fig. 7. Improvement of insulin signaling on HFD mice and metabolic parameters in *db/db* mice injected with AAV-CPT1A or AAV-CPT1AM. (A) Insulin signaling in liver and epididymal white adipose tissue (WAT), as indicated by Western blotting of insulin-induced AKT phosphorylation (pAKT, Ser473) and quantification of pAKT normalized by total AKT. A.U., arbitrary units. (B) Fasting blood glucose on *db/db* mice 3 months after AAV injection. (C) Insulin levels on *db/db* mice 3 months after AAV injection. (D) Liver histological sections from representative *db/db* mice 3 months after injection with AAV-GFP or AAV-CPT1AM and stained with H&E.  $n = 8-10$ . \*  $P < 0.05$ . 196x246mm (300 x 300 DPI)

TABLE 1  
Daily food intake and metabolic variables in serum and liver

	NCD			HFD		
	AAV-GFP	AAV-CPT1A	AAV-CPT1AM	AAV-GFP	AAV-CPT1A	AAV-CPT1AM
Daily food intake (g)	3.43 ± 0.14	3.68 ± 0.12	3.49 ± 0.14	2.72 ± 0.15*	2.91 ± 0.19	2.52 ± 0.13
<i>serum</i>						
FFA (mM)	0.94 ± 0.1	1.23 ± 0.08	1.24 ± 0.16	1.34 ± 0.08*	1.05 ± 0.07#	1.11 ± 0.08#
TAG (mg/dl)	82.97 ± 6.90	84.31 ± 3.20	78.61 ± 2.70	113.79 ± 10.00*	114.09 ± 9.3	89.96 ± 8.3#□
BHB (mM)	1.40 ± 0.04	1.74 ± 0.04#	1.82 ± 0.17#	1.57 ± 0.1*	1.59 ± 0.06	1.90 ± 0.13#□
<i>liver</i>						
BHB-CoA (nmol/g liver)	7.4 ± 0.8	9.7 ± 1.1	12.6 ± 1.3#	6.8 ± 0.9	10.2 ± 1.8	14.6 ± 1.7#
ATP (nmol/g liver)	6.9 ± 0.5	15.4 ± 1.6#	25.1 ± 2.4#□	7.2 ± 0.8	16.8 ± 1.2#	23.2 ± 2.8#□

Daily food intake and circulating free fatty acids (FFA) and triacylglycerides (TAG) and  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and  $\beta$ -hydroxybutyrate-CoA (BHB-CoA) and ATP from 16-week-old overnight fasted mice. Average food intake was calculated for the period between 8 to 14 weeks of age. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. \*  $P < 0.05$  AAV-GFP HFD vs. NCD. #  $P < 0.05$  compared to AAV-GFP on the same diet. □  $P < 0.05$  compared to AAV-CPT1A vs. AAV-CPT1AM on the same diet.



## Supporting Information

### Materials and Methods

**Animals.** Male C75Bl/6J, C75BL/KsJ-*db/db*, and C75BL/KsJ-*db/+* (6 weeks old) were purchased from Janvier Laboratories (France) for gene-transfer studies *in vivo*. Mice were maintained for 2 weeks in our facility to acclimatize prior to the experiments. Eight-week-old C75Bl/6J mice were fed for 10-15 weeks with either NCD (International Products Supplies Limited, TestDiet D8Y2, 10% Kcal fat) or HFD (TestDiet D8Y1, 60% Kcal fat). Two weeks after NCD or HFD treatment, AAV1 vectors were administered by tail vein injection in a single dose of  $7.5 \times 10^{12}$  gc/kg of body weight. Mice were killed 4 to 13 weeks after virus injection. For the experiments on genetically obese mice, eight-week-old C75BL/KsJ-*db/db* and C75BL/KsJ-*db/+* control mice were also injected with AAV1 vectors in the tail vein, at the single dose of  $7.5 \times 10^{12}$  gc/kg of body weight and killed 17 weeks later. All mice had free access to water and chow and were housed under alternating 12h light and dark cycles. Experiments were conducted in accordance with the University of Barcelona guidelines under protocols approved by the Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA).

### **Isolation of Primary Mouse Hepatocytes and Fatty-Acid Oxidation.**

Hepatocytes were isolated from the livers of fed anesthetized mice by a modification of the collagenase method<sup>41</sup>. Briefly, livers were perfused with Hank's balanced salt solution (HBSS, pH 7.4, 37°C, gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>: 5.4 mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 138 mM NaCl, 4.17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.338 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.56 mM glucose, 50 mM HEPES, and 0.5 mM EGTA) through the inferior vena cava for 5 min at a rate of 5 ml/min. Livers were then perfused with HBSS (without EGTA) containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.25% (w/v) collagenase IV (Sigma) for 12 minutes approximately. The liver was then removed and gently teased apart in HBSS, and the cell suspension was washed three times in HBSS. Cell viability as assessed by the trypan blue exclusion test was

always higher than 80%. Hepatocytes were seeded at a density of  $3.5 \times 10^6$  cells in 0.1% (w/v) gelatin-treated 25-cm<sup>2</sup> flasks in DMEM medium (Gibco #11966), supplemented with 10% FBS, 10 mM glucose, 10 µg/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin, 100 nM dexamethasone (Sigma), and 100 nM insulin (Sigma). After cell attachment (5 h), the medium was replaced for 16 h by fresh DMEM medium containing either 0.1% BSA, 1 mM carnitine, 20 mM glucose, 10 nM insulin, 10 µg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin.

Fatty-acid oxidation to CO<sub>2</sub> and acid-soluble products (ASPs), essentially consisting of acyl-carnitine, Krebs-cycle intermediates, and acetyl-CoA,<sup>42</sup> was measured in isolated primary mouse hepatocytes cultured in 25-cm<sup>2</sup> flasks. Hepatocytes were incubated for 3 h at 37°C in a CO<sub>2</sub>-free incubator with DMEM medium as described above containing 0.3 mM oleate and 1 µCi/ml [1-<sup>14</sup>C]oleic acid bound to 1% (w/v) BSA. Oxidation to CO<sub>2</sub> and ASPs was measured as previously described.<sup>43</sup>

**Isolation of Mitochondria from Liver.** Mitochondria-enriched cell fractions from hepatocytes were obtained as previously described<sup>16</sup> with minor modifications. Briefly, hepatocytes were scraped and resuspended in 2 ml of solution A (70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 2 mM EDTA, 5 mM HEPES and protease inhibitor cocktail from Roche, pH 7.4). Cells were homogenized using a glass Wheaton-Dounce homogenizer (20 strokes with both the loose and the tight pestle) and centrifuged at 2,000 x g for 3 min at 4°C. The supernatant was centrifuged again at 16,000 x g for 30 min at 4°C. The mitochondria-enriched pellet was resuspended in 50-100 µl of solution A. Mitochondria-enriched cell fractions from liver were obtained as previously described.<sup>44</sup>

**Measurement of CPT1 Activity.** CPT1 activity in 10 µg of protein from mitochondrial-enriched cell fractions was determined by the radiometric method as

previously described<sup>45</sup> with minor modifications. The substrates were L-[methyl-<sup>3</sup>H]carnitine and palmitoyl-CoA. Enzyme activity was assayed for 4 min at 30°C in a total volume of 200 µl. For malonyl-CoA inhibition assays, 10 µg of mitochondrion-enriched cell fractions was preincubated for 1 min at 30°C with different amounts of malonyl-CoA prior CPT1 activity assay.

**Western Blot Analysis.** CPT1A and CPT1AM detection from liver mitochondrial-enriched fractions were determined as previously described.<sup>12</sup> HMG-CoA synthase detection from liver mitochondrial-enriched fractions was as previously described.<sup>46</sup>

**Measurement of plasma metabolic variables.** Blood samples were obtained from the tails of unanesthetized mice after an overnight fast. Blood glucose concentrations were measured using a Glucometer Elite (Bayer). Serum insulin and leptin were measured by ELISA (Millipore). Plasma triacylglycerides, β-hydroxybutyrate and free fatty-acids were measured with a kit from Linear Chemicals S.L.

**TAG content.** Pulverized frozen liver (100 mg) was homogenized in 500 µl PBS. Chloroform-extracted lipid was dried under an N<sub>2</sub> stream and redissolved in isopropanol, and triacylglycerides were quantified using the Cromatest Triglycerides MR kit (Linear Chemicals S.L.).

**Analysis of Insulin/AKT Signaling Pathway.** Overnight-fasted mice were anesthetized, injected through the inferior vena cava with 2.5 units of insulin (HumulinR, Lilly), and killed after 5 min. Harvested epididymal white adipose tissue, liver, muscle and spleen, stored until use in liquid N<sub>2</sub>, were pulverized and homogenized with a Polytron for 30s in lysis buffer (30 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 3 µM aprotinin, 10 µM leupeptin, 5 µM pepstatin A,

25 mM benzamidine, 25 mM sodium vanadate, 5 mM glycerol phosphate, 100 mM NaF, 1.0 mM ammonium molybdate, 30 mM tetrasodium pyrophosphate, 5 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, and 0.5% sodium deoxycholate, pH 7.4). Lysates were shaken for 1 hour at 4°C and centrifuged for 20 min at 16,500 x *g*. Tissue extracts (30 µg protein) were resolved on 8% acrylamide gels, transferred into Hybond-P PVDF membranes (GE Healthcare) and incubated for 1 h at r.t. with antibodies against AKT (Cell Signaling #9272) and Ser473-phosphorylated AKT (Cell Signalling #4051S). Detection was carried out with the ECL detection system (Biological Industries).

**RNA Extraction and Quantitative RT-PCR.** Total RNA was extracted from frozen, pulverized tissue from overnight fasted mice using RNeasy (QIAGEN). cDNA was synthesized with the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche). PCR amplifications using LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and measured with the Roche LightCycler 480 Real-Time PCR System were normalized against ACT-B. Primers from Roche include ACT-B (#05046190001) and TNFα (5'-CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT-3' and 5'-AAGCAAAAGAGGAGGCAACA-3' with Probe #103, #04692217001). Forward/reverse primers for other genes:

ACC1: 5'-TGGATCCGCTTACAGAGAGACT-3'/5'-GCCGGAGCATCTCATTTCG-3'

ACC2: 5'-CCAGTCTTCCGTGCCTTTGTAC-3'/5'-CTCATCCCTCGCTCTGAACG-3'

ACTINB: 5'-ATGCTCCCCGGGCTGTAT-3'/5'-CATAGGAGTCCTTCTGACCCAT-3'

CPT1A: 5'-GACCCTAGACACCACTGGCCG-3'/5'-GAGAGGACCTTGACCATAGCC-3'

DGAT2: 5'-GCACAGAGGCCACAGAAGTG-3'/5'-CCCTCAACACAGGCATCG-3'

G6Pase: 5'-AGGAAGGATGGAGGAAGGAA-3'/5'-TGGAACCAGATGGGAAAGAG-3'

IL-1α: 5'-GCCCATCCTCTGTGACTCAT-3'/5'-AGGCCACAGGTATTTTGTTCG-3'

IL-6: 5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAGT-3'/5'-GAAGTAGGGAAGGCCGTGG-3'

iNOS: 5'-CGAAACGCTTCACTTCCAA-3'/5'-TGAGCCTATATTGCTGTGGCT-3'

MCP1: 5'-TCCCAATGAGTAGGCTGGAG-3'/5'-AAGTGCTTGAGGTGGTTGTG-3'

MTP: 5'-GTGGAGGAATCCTGATGGTGA-3'/5'-TGATCTTAGGTGTACTTTTGCCC-3'

PDK4: 5'-TTTCTCGTCTCTACGCCAAG-3'/5'-GATACACCAGTCATCAGCTTCG-3'

PEPCK: 5'-GTCAACACCGACCTCCCTTA-3'/5'-CCCTAGCCTGTTCTCTGTGC-5'

SCD1: 5'-TTCTTGCGATACTCTGGTGC-3'/5'-CGGGATTGAATGTTCTTGTTCG-3'

SOCS3: 5'-CCTTCAGCTCCAAAAGCGAG-3'/5'-GCTCTCCTGCAGCTTGCG-3'

UCP2: 5'-CCGGGGCCTCTGGAAAG-3'/5'-CCCAAGCGGAGAAAGGA-3'

**Histology.** Histological examination was done using 4  $\mu\text{m}$  thick formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) at the Pathology Department of the Hospital Clinic of Barcelona.

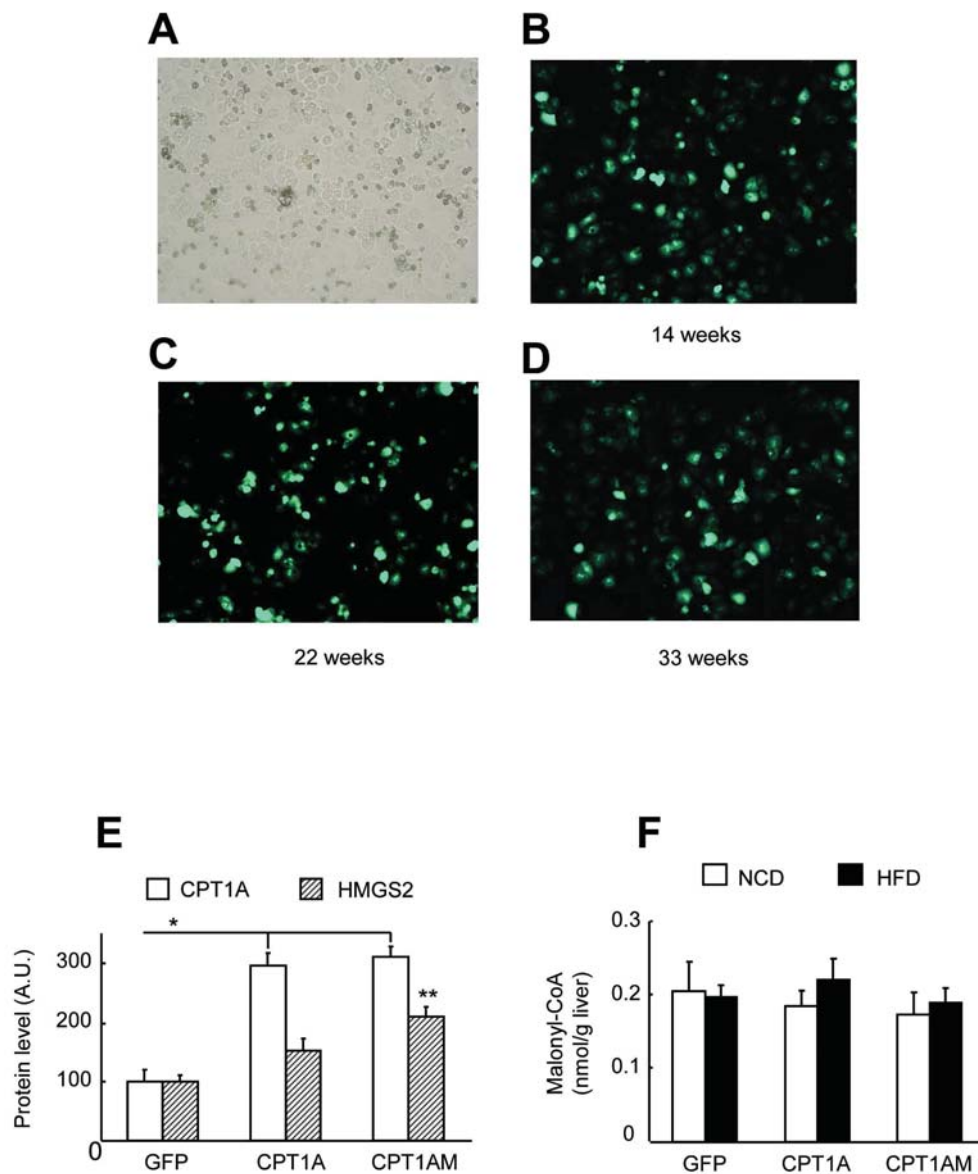
**Malonyl-CoA and  $\beta$ -Hydroxybutyrate-CoA Measurements.** Liver samples were obtained as previously described<sup>47</sup> with minor modifications. Powdered tissue was homogenized in 1 ml of ice-cold 10% trichloroacetic acid containing 50  $\mu\text{M}$  DTT. HPLC/MS analysis was performed at the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona as previously described.<sup>48</sup>

**ATP Extraction and Measurement.** Liver samples were immediately frozen in liquid nitrogen until the extraction procedure. The frozen tissue was powdered and homogenized in 1.0 mL of 40% ice-cold  $\text{HClO}_4$  and incubated for 10 minutes. The precipitated proteins were removed by centrifugation (10,000  $\times g$  for 10 minutes), and 300  $\mu\text{l}$  of supernatant was neutralized by 5M  $\text{KHCO}_3$ . Ten microliters of supernatant was pipetted into the wells of a white nonphosphorescent microplate, placed in a luminometer (Turner System), and processed by addition of 90 of ATP monitoring reagent (Invitrogen A220066). ATP concentrations were calculated from a calibration curve constructed at the same time by means of standard ATP dissolved in the appropriate solution for each experiment.

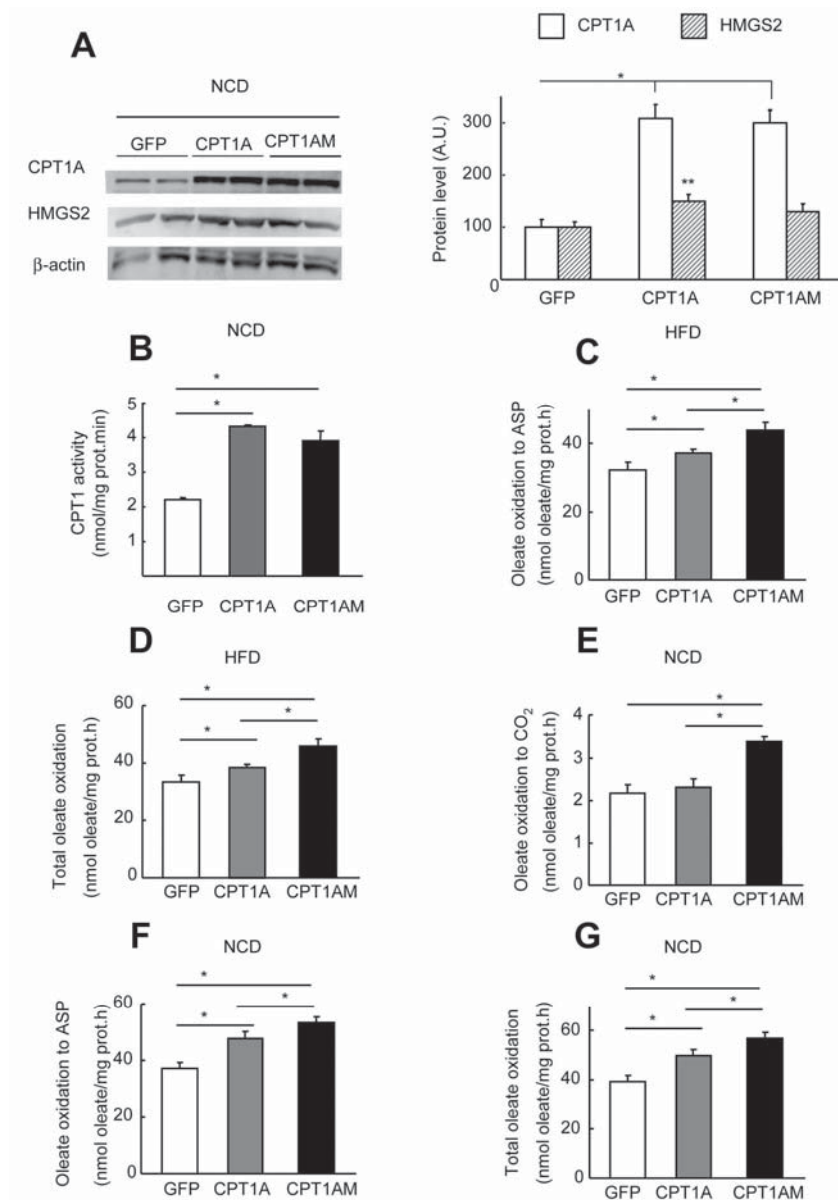
**Glucose and pyruvate tolerance test.** Glucose (2.0 g per kg body weight) or sodium pyruvate dissolved in PBS (2.0 g per kg body weight) were administered by intraperitoneal injection after an overnight fast for GTTs or pyruvate tolerance tests, respectively. Blood glucose concentrations were measured using a Glucometer Elite (Bayer) before, 15, 30, 60, 90 and 120 min after the administration.

**Carbonylation (Oxidative Stress) Measurement of Liver Proteins.** Liver proteins were extracted in solution A described above. Carbonylation of liver protein extracts was assessed using the OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore).

Accepted Preprint



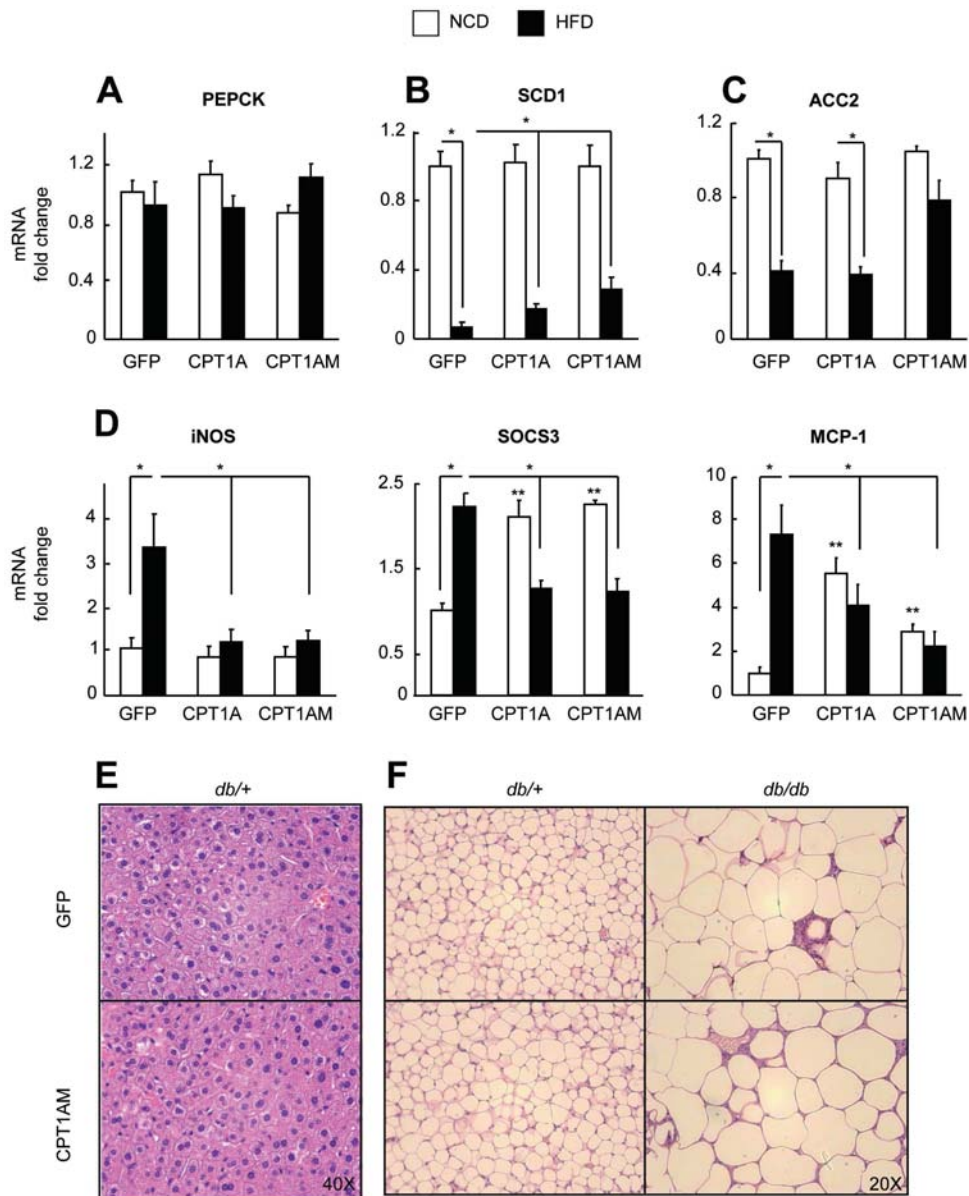
Supporting Fig. 1. Long-term expression of AAV-GFP-infected mice, protein levels and liver malonyl-CoA levels. (A-D) White image (A) and GFP fluorescence (B-D) of primary hepatocytes isolated from AAV-GFP-infected mice on NCD at 14, 22, and 33 weeks of age. (E) Quantification of CPT1A and HMGS2 protein levels from liver mitochondria of HFD mice, (A.U.), arbitrary units (F) Liver malonyl-CoA levels analyzed by HPLC/MS on 14-week-old GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on NCD (open bars) vs. HFD (filled bars). n= 6-10.  
164x195mm (300 x 300 DPI)



Supporting Fig. 2. Increased CPT1A protein, activity, oleate oxidation and ketogenesis in CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice. (A) Protein levels and quantification from liver mitochondria of NCD mice (A.U.), arbitrary units. (B) CPT1 activity from isolated liver mitochondria of NCD fed mice. (C, D) Oleate oxidation to ASP and total oxidation from primary hepatocytes isolated from HFD GFP-, CPT1A-, or CPT1AM-expressing mice. (E-G) Oleate oxidation to CO<sub>2</sub>, ASP and total oxidation from primary hepatocytes isolated from NCD GFP-, CPT1A-, or CPT1AM-expressing mice. Experiments done at 4 weeks after the virus treatment. Shown representative experiments performed in triplicate. n=6-10. \*P < 0.05. \*\*P < 0.05 vs. GFP.

167x240mm (300 x 300 DPI)





Supporting Fig. 3. Gene expression and tissue histology. (A-D) mRNA expression in liver of 14-week-old GFP-, CPT1A-, and CPT1AM-expressing mice on NCD (open bars) vs. HFD (filled bars).  $n=6-10$ . \*  $P < 0.05$  NCD AAV-GFP vs. HFD AAV-GFP, AAV-CPT1A or AAV-CPT1AM; \*\*  $P < 0.05$  NCD AAV-GFP vs. NCD AAV-CPT1A or AAV-CPT1AM. (E) Liver and adipose tissue histology from *db/db* mice treated with AAV-GFP or AAV-CPT1AM. (F) Liver histological sections from representative *db/+* mice 3 months after injection of AAV-GFP or AAV-CPT1AM and stained with H&E. (H) Epididymal adipose tissue histological sections stained with H&E from representative *db/+* or *db/db* mice 3 months after injection with AAV-GFP or AAV-CPT1AM.  $n=8-10$ .  
189x229mm (300 x 300 DPI)