

6.1.3 Anàlisi d'una caixa *E-box* en el promotor del gen S_A .

L'anàlisi computacional de la seqüència promotora del gen S_A amb els programes MatInspector i TFSEARCH han identificat varis llocs d'unió consens per a diferents factors de transcripció, entre ells trobem una caixa consens *E-box* (CAXXTG) localitzada en la posició -668 nt, reconeguda per varis factors de transcripció de la família dels b-HLH-ZIP (*Helix-loop-helix/leucine zipper factors*) entre els que es troba el factor de transcripció SREBP-1. Aquesta caixa SREBP-1 presenta la seqüència TATCACATGAA i en ella es troba inclosa la caixa E-box. En la figura 42 es representa els resultats obtinguts amb el programa TFSEARCH en la recerca de factors de transcripció que reconeixen aquesta seqüència, com es pot observar la caixa E-box és reco-

entry	score
c-Myc/	86.4
USF	86.2
USF	86.1
USF	86.1
SREBP1	85.9
GATA-2	85.8

Fig.42. Resultats obtinguts en la identificació de varis llocs d'unió consens per a diferents factors de transcripció en un fragment de la seqüència promotora del gen S_A , amb el programa TFSEARCH. Es representa una seqüència de 50 nt del promotor en la posició -705, en vermell s'il·lumina els nt que formen part de la caixa E-box. Les sagetes amb línia discontinua senyalen la seqüència consens que reconeix cada un dels diferents factors de transcripció indicats a la dreta a continuació de cada sageta.

neguda per diferents factors de transcripció que pertanyen a la família dels b-HLH-ZIP com el c-Myc, l'USF i el SREBP.

S'ha demostrat que el factor de transcripció SREBP humà està regulat per andrògens en la línia cel·lular de pròstata LNCaP, ja que conté un element de resposta a andrògens (ARE) en l'intró 8 de llur gen, *target* directe del receptor d'andrògens (Heemers H *et al*, 2004). S'ha observat, a més, que l'SREBP-1 és activat després d'un tractament androgènic en les glàndules sebàcees, regulant la síntesi de lípids a través de la via del SREBP (Rosignoli C *et al*, 2003).

En la línia cel·lular de càncer de pròstata els andrògens estimulen l'expressió de varis gens lipogènics, aquest efecte però, s'ha observat també en cèl·lules no canceroses i que responen als andrògens. En rates WKY castrades es dona una marcada disminució en els nivells de mRNA i proteïnes involucrades en la síntesi d'àcids grassos i colesterol. L'administració de testosterona i DHT restaura l'expressió d'aquests gens, això a més, be acompanyat per l'increment en el nucli del SREBP, factor de transcripció lipogènic clau (Heemers H *et al*, 2003). Swinnen *et al*, demostraren a més que la presència d'un lloc d'unió a SREBP en el gen d'un àcid gras sintasa era essencial per la regulació pels andrògens (Swinnen *et al* 1997).

La relació dels andrògens amb el SREBP ens va fer escollir aquest factor de transcripció entre els altres com a possible candidat funcional en el promotor del gen S_A . Per veure si la proteïna SREBP reconeixia la seqüència nucleotídica consens d'unió per aquest factor vam utilitzar la tècnica de retard en gel o EMSA. Dissenyàrem varis oligonucleòtids corresponents a aproximadament 30nt de la seqüència promotora incloent-hi la caixa SREBP en la part central. També varem sintetitzar aquests mateixos oligonucleòtids però amb la caixa E-box mutada, concreta-

ment varem fer dos mutants, el primer va ser delectonar la caixa E-box (M1) i el segon vàrem produir un canvi en l'ordre dels nt (M2). Com a control positiu vam dissenyar un oligonucleòtid que contenia l'element de resposta consens per al SREBP (SRE). En la taula 16 es presenta la seqüència de cada un dels oligonucleòtids utilitzats en l'EMSA.

La proteïna SREBP-1c es va obtenir per expressió *in vitro* mitjançant el sistema de reticulòcit utilitzant un vector d'expressió que codifica per la forma madura del SREBP-1c cedit pel Dr. Francesc Villarroya del departament de Bioquímica de la Universitat de Barcelona. La proteïna SREBP-1c es va hibridar durant 30 min a 37°C amb els

Taula 16. Oligonucleòtids utilitzats en la tècnica de Band Shift.

Nom	Seqüència 5'-3'
SRE	GATCCTGATCACCCCACTGAGGAGA
-668WT	CTGTTCACATATCACATGAAACATTACTA
-668M1	CTGTTCACATATCAAAACATTACTAGATG
-668M2	CTGTTCACACATATTGAAACATTACTAGATG

Els nt subratllats pertanyen a les caixes consens per al SREBP

oligonucleòtids SRE i -668WT marcats radioactivament amb ^{32}P , el resultat s'analitzà en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0.5X (veure apartat MÈTODES). Com a control negatiu s'hibridaren els mateixos oligonucleòtids amb el lisat de reticulòcit mancat del plàsmid d'expressió. D'altra banda, també s'utilitzà extracte nuclear obtingut a partir de ronyons de ratolins C57BL/6 mascles, per hibridar les sondes SRE i -668WT. Com podem veure en la figura 43 la proteïna SREBP-1c és capaç d'unir-se a la seqüència consens SRE ja que es produeix un retard en el gel senyalat per una sageta (part esquerra del panel), en canvi no s'uneix en la seqüència -668WT del promotor del gen S_A (part dreta del panel). L'extracte nuclear de ronyó (ENR σ^1) en tots dos casos dona un retard en el gel, concretament dues bandes per a la seqüència SRE i una única banda per a la caixa -668WT. Les bandes senyalades amb un asterisc pertanyen a bandes inespecífiques obtingudes amb el lisat de reticulòcit (TNT).

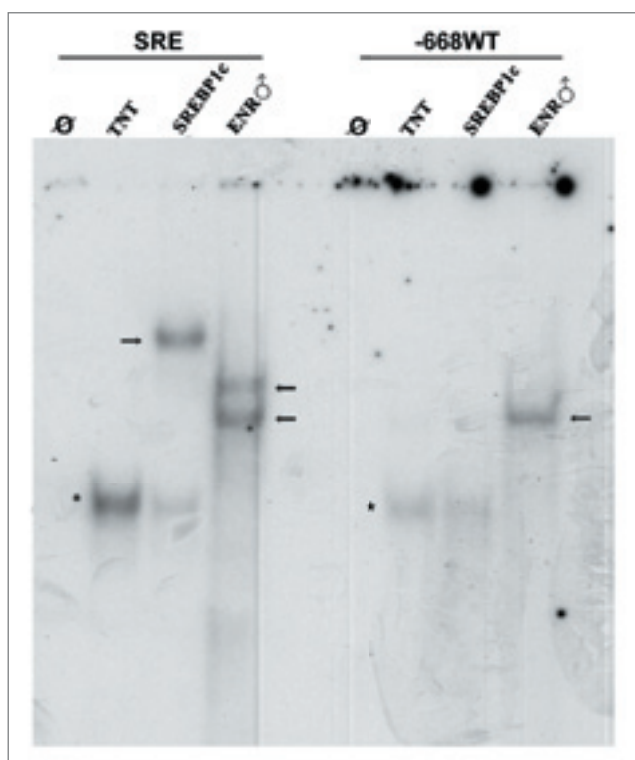


Fig. 43. Anàlisi per EMSA de la possible caixa SREBP-1 del promotor del gen S_A . Els oligonucleòtids SRE (element de resposta a SREBP) i la caixa -668WT marcats amb ^{32}P , es van hibridar amb la proteïna SREBP-1c expressada *in vitro* (SREBP-1c) i amb extracte nuclear de ronyó de ratolins mascle (ENR σ^1). Com a control negatiu s'hibridaren amb el lisat de reticulòcit sense vector d'expressió (TNT). El resultat es resolgué en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0.5X. Es va afegir també com a control negatiu els oligonucleòtids marcats nus (\emptyset). Les sagetes indiquen les bandes específiques i els asteriscs les inespecífiques.

Per comprovar l'especificitat de la banda obtinguda amb l'extracte nuclear de ronyó es va utilitzar l'oligonucleòtid SRE fred com a competidor. En la figura 44, s'observa una banda retardada obtinguda amb l'extracte nuclear i la sonda WT que no desapareix quan se li afegeix l'oligonucleòtid SRE fred en excés, en canvi no s'observa banda quan la sonda WT competeix amb ella mateixa, panel de l'esquerra.

La delecció de la caixa E-box (M1) així com el canvi en l'ordre dels nucleòtids d'aquesta caixa (M2) impedeix la unió del suposat factor de transcripció que s'uneix al WT ja que no obtenim el mateix patró de banda, panel central i panel de la dreta de la figura 44, no s'impedeix però, la unió proteïna-DNA quan els mutants s'utilitzen com a competidors freds de la sonda WT.

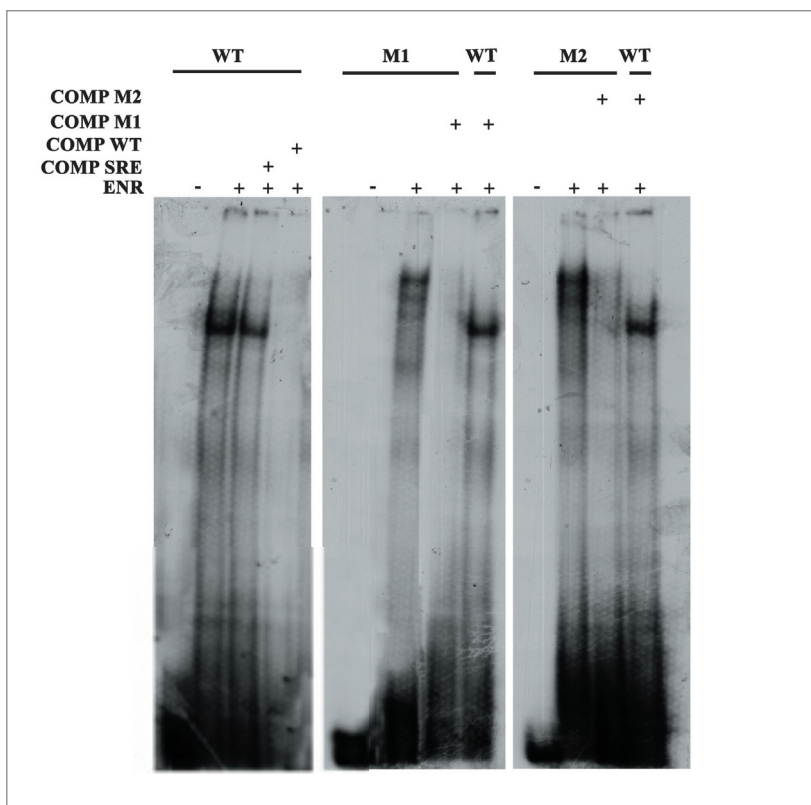


Fig.44. Anàlisi per la tècnica d'EMSA de l'especificitat de la caixa -668 en front a l'extracte nuclear de ronyó de ratolí. Els oligonucleòtids WT, M1 i M2 marcats amb ^{32}P es van hibridar amb ENR de ratolins mascle. S'utilitzaren com a competidors els oligonucleòtids, SRE (COMP SRE), WT (COMP WT), M1 (COMP M1) i M2 (COMP M2) no marcats radioactivament.

Es va repetir aquest mateix experiment però utilitzant extracte nuclear de fetge (ENF) de ratolins C57BL/6 mascle, per comprovar si la caixa -668 era específica de teixit. S'hibridaren les sondes marcades amb ^{32}P , el WT i els seus corresponents mutants M1 i M2, amb extracte nuclear de fetge durant 30 min i a 37°C , els resultats es van resoldre en un gel d'acrilamida al 8% en TBE 0.5X. També s'afegiren dues situacions de competició, la sonda WT marcada en front als mutants M1 i M2 no marcats i en excés. Els resultats es presenten en la figura 45; els dos primers carrils corresponent a la sonda WT amb i sense ENR per comparar-lo amb els resultats obtinguts amb l'ENF part dreta del panel, la hibridació de la caixa -668 (WT) amb l'ENF ens

dóna una banda a la mateixa alçada que l'obtinguda amb l'ENR que desapareix en els dos mutants, M1 i M2. L'excés dels oligonucleòtids M1 i M2 freds en front al WT marcat no impedeix la unió proteïna-DNA. En tot cas la caixa -668 és reconeguda de manera específica per un factor de transcripció present tant en l'extracte nuclear de ronyó com en el de fetge, interacció que desapareix en tots dos casos quan la caixa E-box és mutada.

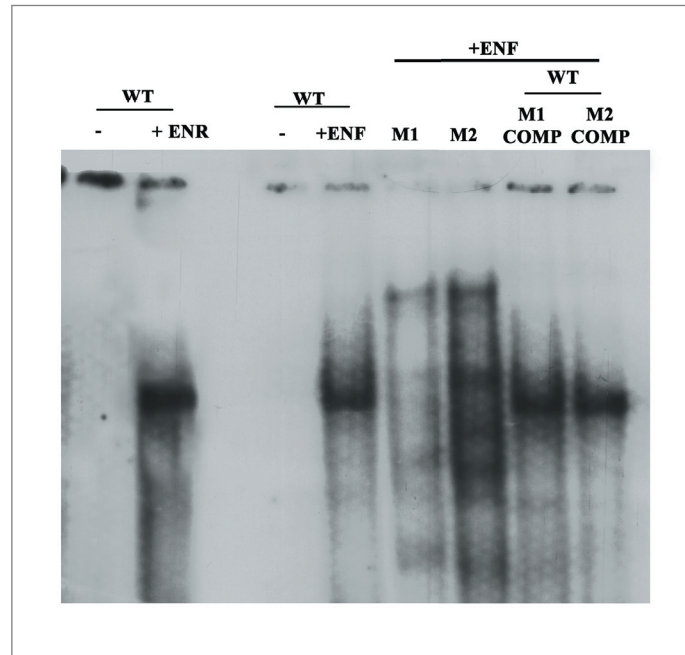


Fig.45. Anàlisi de la caixa -668 per la tècnica d'EMSA emprant extracte nuclear de fetge de ratolí mascle. Els oligonucleòtids WT, M1 i M2 marcats amb ^{32}P es van hibridar amb ENF de ratolins mascle. S'utilitzaren com a competidors els oligonucleòtids, M1 (M1 COMP) i M2 (M2 COMP) no marcats radioactivament. Com a control positiu es va hibridar la sonda WT amb ENR.

Tot i que hem demostrat que el subtipus SREBP-1c no s'uneix a aquesta caixa, existeixen els subtipus SREBP-1a i SREBP-2 que podrien unir-se. Donada la regulació androgènica a la que estan sotmesos els membres de la família SREBP, varem voler observar si l'utilització d'extractes nuclears de ronyó i fetge de ratolins castrats, modificava els resultats obtinguts en mascles intactes. Els resultats obtinguts es representen en la figura 46; s'observa que la presència o absència d'andrògens no determina la unió d'aquest factor de transcripció a la caixa -668 (WT).

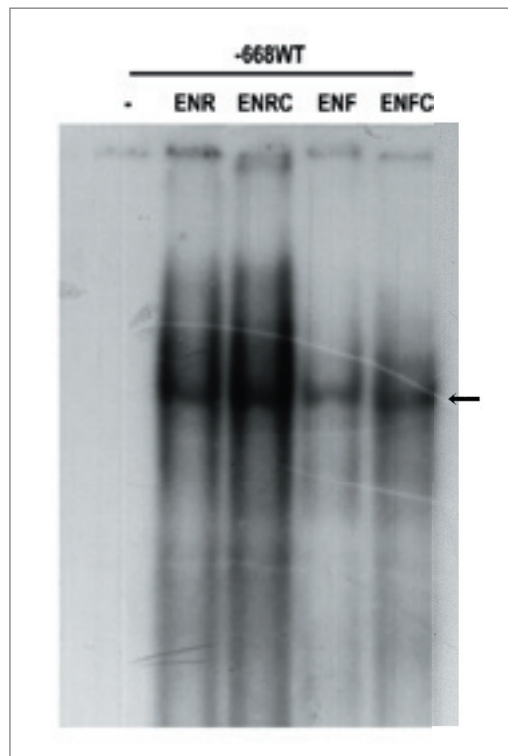


Fig. 46. Anàlisi utilitzant la tècnica d'EMSA de la caixa -668WT en front a extractes nuclears de ronyó i fetge de ratolins castrats. La sonda WT (-668WT) s'hibrida amb extracte nuclear de ronyó de ratolins mascle normals (ENR) i castrats (ENRC). El mateix es fa amb extractes nuclears de fetge de ratolins normals (ENF) i castrats (ENFC). La sageta indica les bandes específiques.

7. Estudi comparatiu de la proteïna S_A

En la tesi doctoral de la Dra. M^a Jesús Melià, 1999, es fa un primer anàlisi de la seqüència aminoacídica deduïda del cDNA de S_A de ratolí clonat per primer cop en el nostre laboratori, així com la descripció de les primeres homologies amb altres proteïnes, dades incloses en l'apartat INTRODUCCIÓ. Del 1999 fins ara ha hagut un augment considerable en el nombre de seqüències dipositades en les bases de dades, com per exemple la seqüenciació complerta del genoma humà, de ratolí i de rata, entre d'altres que estan en procés, així com la millora en les eines biocomputacionals a l'abast de qualsevol usuari. Aprofitant totes aquestes eines hem actualitzat l'anàlisi comparatiu de la proteïna S_A, obtenint els resultats que es representen a continuació.

En l'estudi inicial, es comparen les seqüències aminoacídiques de la proteïna S_A de rata i ratolí i, es mostra l'existència d'un *gap* en la proteïna S_A de rata (Tesi doctoral M^a Jesús Melià, 1999). A mesura que s'ha resolt el genoma de rata hem pogut observar que la proteïna S_A de rata conté aproximadament el mateix nombre d'aminoàcids que la proteïna S_A de ratolí amb una homologia del 94%. En la figura 47 es compara les seqüències d'aminoàcids en forma d'alineament múltiple entre les proteïnes S_A de ratolí (mSA), de rata (rSA) i de l'humà (hSA), utilitzant l'algoritme *CLUSTALW*.

La recerca d'altres seqüències homòlogues s'ha realitzat mitjançant els programes *BLAST*,

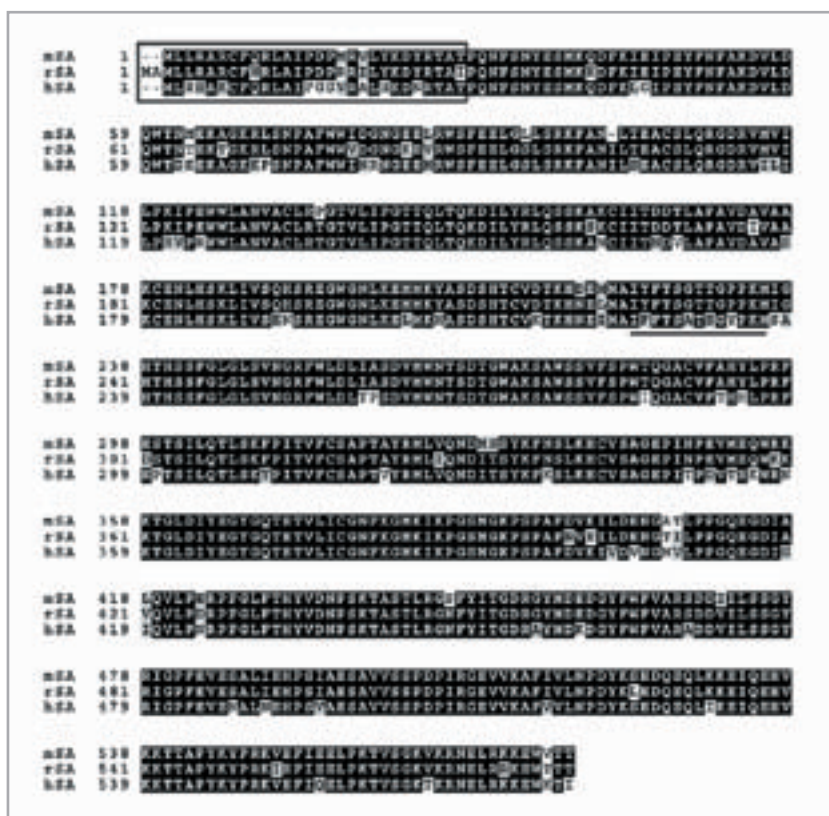


Fig.47. Alineament entre les proteïnes S_A de les tres espècies, ratolí (mSA), rata (rSA) i humana (hSA). Comparació entre les seqüències d'aminoàcids deduïdes dels cDNAs de les tres espècies amb número de GenBank: mSA, AF068246; hSA, D16350; rSA, AY456695. Els residus ressaltats en negre indiquen les posicions idèntiques entre les proteïnes. Mitjançant un requadre es destaca la possible senyal de translocació a la mitocondria, en posició N-terminal de la proteïna S_A en les tres espècies. Un domini d'unió a AMP s'indica amb una línia negra. L'alineament s'ha realitzat utilitzant el programa *CLUSTALW* disponible als servidors del EBI.

BLASTn, *BLASTx* i *psi-BLAST* amb un valor $E \leq 0.005$, en tots els casos hem trobat un gran nombre de seqüències que presenten alineaments significatius amb la proteïna S_A , en la taula 17 es representa les proteïnes que presenten una homologia significativa amb la S_A .

La proteïna S_A presenta una elevada homologia amb altres enzims *Acetyl-CoA synthetase*, de moltes espècies diferents desde l'humana fins a vàries de procariotes. A part de les proteïnes especificades en la taula 17, existeixen moltes altres proteïnes *Acetyl-CoA synthetase* homologues a S_A , amb homologies del 42 al 32% d'un bon nombre d'espècies eucariotes unicel·lulars i procariotes.

Taula 17. Diverses proteïnes amb homologia significativa amb la S_A murina.

Proteïna	Espècie	% homologia	Núm. GenBank
MGC82117	<i>Xenopus laevis</i>	66	AAH75176.1
Similar a S_A	<i>Gallus gallus</i>	66	XP_424601.1
Medium-chain acyl-CoA synthetase específica del sistema olfatori	<i>Rattus norvegicus</i>	59	NP_859046.1
Cc1-38 (<i>Liver regeneration-related protein</i>)	<i>Rattus norvegicus</i>	59	AAP92645.1
similar a xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase	<i>Homo sapiens</i>	56	XP_058743.7
xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase forma XL-III	<i>Bos taurus</i>	56	AAD39140.1
Kidney-specific protein (KS)	<i>Rattus norvegicus</i>	55	AAH78721.1
Butyryl Coenzyme A synthetase 1	<i>Bos taurus</i>	55	NP_777107.1
xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase	<i>Homo sapiens</i>	56	NP_872423.2
Medium-chain acyl-CoA synthetase	<i>Homo sapiens</i>	55	BAB64535.1
Butyryl Coenzyme A synthetase 1	<i>Mus musculus</i>	53	NP_473435.1
Acyl-CoA synthetase/AMP-(fatty) acid ligase	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	45	ZP_00187688.2
Acyl-CoA synthetase/AMP-(fatty) acid ligase	<i>Clostridium thermocellum</i>	44	ZP_00313608.1

Possible existència de la proteïna S_A en altres espècies de mamífers

El cDNA de S_A de rata va ser el primer en clonar-se i es coneix des del 1991 (Iwai *et al* 1991); degut a la seva possible implicació en hipertensió es va clonar el cDNA del S_A humà (Samani *et al* 1994) i, per últim, es va clonar en el nostre laboratori el cDNA del S_A murí quan es va realitzar un cribatge per a la identificació de nous gens regulats per andrògens en el ronyó de ratolí, utilitzant tècniques de RDAcDNA i RAP-PCR. En aquests darrers anys s'han obtingut les seqüències complertes dels genomes d'espècies superiors com la humana, la de ratolí i la de rata, està en marxa la resolució genòmica d'espècies com la de gos, de vaca, d'ovella, de porc i d'orangutà entre d'altres. Aquest fet és engrescador a l'hora d'utilitzar aquestes eines per veure si el gen S_A es troba en altres espècies diferents a les ja descrites.

Les eines utilitzades han estat programes com el *BLAST* i el *CLUSTALW*, comparant la seqüència de cDNA del S_A murí en front a les bases de dades disponibles de cada una de les

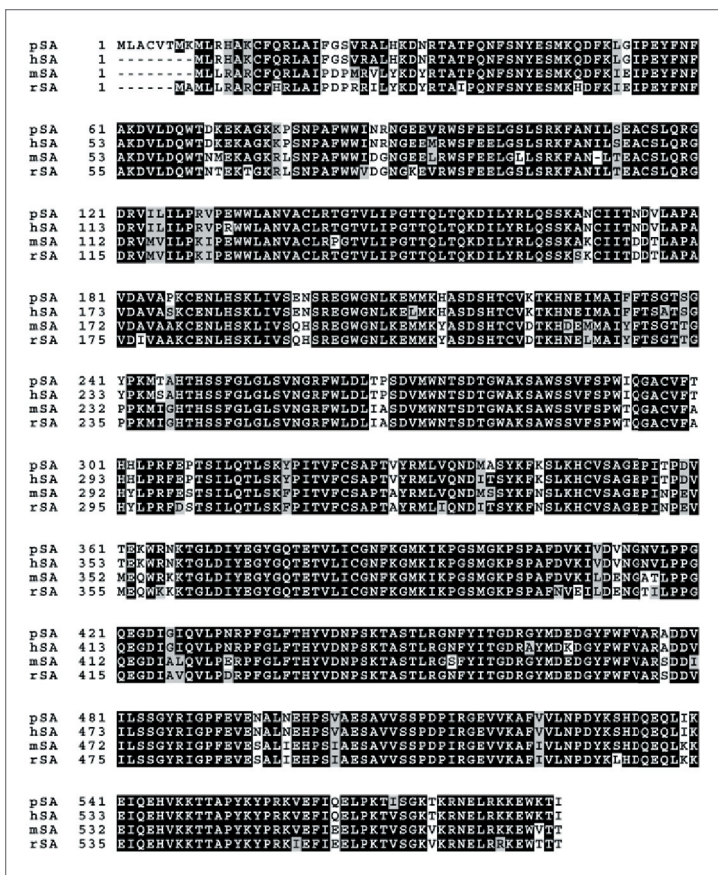
espècies accessibles en el NCBI, i comparant-les entre elles.

La proteïna SA en l'Orangutà (Pongo pygmaeus)

Existeix una entrada en el GenBank que correspon al SA d'orangutà, **CR857411.1**, el cDNA l'han obtingut a partir de ronyó d'orangutà adult. A nivell de cDNA el SA d'orangutà presenta una homologia del 84% respecte al cDNA del SA murí, el mateix percentatge que presenten els cDNAs comparats del SA humà i de ratolí, ja que aquests també tenen un 84% d'homologia. En canvi com és d'esperar l'homologia entre els cDNAs de SA d'orangutà i l'humà és major, amb un 96% d'homologia.

La proteïna deduïda del cDNA del SA d'orangutà presenta una homologia del 89% respecte a la proteïna murina i un 98% respecte a la proteïna SA humana. En la figura 48 es compara les seqüències d'aminoàcids en forma d'alineament múltiple entre les proteïnes SA de ratolí (mSA), de rata (rSA), de l'humà (hSA) i de l'orangutà (pSA), utilitzant l'algoritme *CLUSTALW*.

Fig. 48. Alineament entre les proteïnes SA de les 4 espècies, ratolí (mSA), rata (rSA), humana (hSA) i orangutà (pSA). Comparació entre les seqüències d'aminoàcids deduïdes dels cDNAs de les 4 espècies amb número de GenBank: mSA, AF068246; hSA, D16350; rSA, AY456695; pSA, CR857411.1. Els residus ressaltats en negre indiquen les posicions idèntiques entre les proteïnes. L'alineament s'ha realitzat utilitzant el programa *CLUSTALW* disponible als servidors del *EBI*



El gen SA en gos (Canis familiaris)

Hi ha una entrada al GenBank amb número d'accés **AF022384** *Canis familiaris SA gene, partial cds* que consisteix en un fragment de 1472 nucleòtids del gen SA de gos, no està complet per tant no poden deduir la seqüència de la proteïna; a més es tracta d'un fragment del gen amb dos exons, no saben si sencers o parcials i un intró. Quan comparem aquest fragment del gen SA en front al genoma de gos resolt fins ara, observem que es troba en el cromosoma 6, més amunt dels gens ZP2 i Umod; si ho comparem amb la posició aproximada que ocupa l'SA en el cromosoma 7 de ratolí així com en els cromosomes 1 i 16 de rata i humà respectivament, el gen SA també es troba al voltant dels gens ZP2 i Umod.

Els dos exons resolts en aquest fragment del gen SA de gos i la regió del cDNA del gen

S_A murí amb el que s'identifiquen, presenten una homologia del 84%. El cDNA de S_A murí en front al genoma de gos troba homologia amb un fragment del cromosoma 6 de gos donant lloc a tres possibles exons del gen S_A caní, ja que coincideixen amb els exons 12, 13 i 14 del gen S_A de ratolí. Si enfrontem el fragment genòmic del S_A de gos resolt en el GenBank amb el genoma caní, es resolen els dos exons i l'intró d'aquest fragment de 1472 nucleòtids i que es troben a una distància més amunt dels altres tres exons obtinguts amb el cDNA de ratolí. En la figura 49 es representa de manera esquemàtica aquestes homologies.



Fig.49. Esquema representatiu de l'homologia trobada entre el gen S_A de ratolí i el de gos. S'ha utilitzat els programes BLAST i CLUSTALW.

El gen S_A en la vedella (*Bos taurus*)

Utilitzant com a motllo el cDNA de S_A de ratolí en un blast en front a les bases de dades resoltes fins ara del genoma de vedella; trobem un EST de 756 nucleòtids amb número de GenBank **CR852097**, que presenta una homologia d'un 87% amb la regió de 1732-2294 nt del cDNA del S_A murí. Aquest EST s'ha obtingut a partir d'endometri de vaca de 20 a 64 dies de gestació. No sorprèn ja que el S_A també s'ha pogut clonar a partir d'endometri de ratolins amb 11 dies de gestació (GenBank AK077247). Quan s'enfronta el cDNA de ratolí al genoma de vedella obtenim quatre fragments d'homologies del 80 al 87%, que coincideixen amb els exons 12, 13, 14 i 15 del gen S_A murí amb aproximadament les mateixes mides intròniques que presenta el gen de ratolí, el que no especifica és el número de cromosoma (número d'entrada AAFC01193278.1). En la figura 50 es representa de manera esquemàtica aquestes homologies.

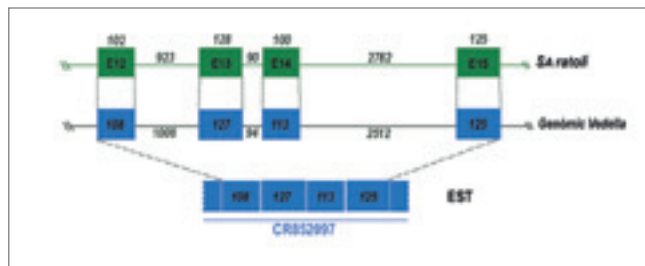


Fig.50. Esquema representatiu de l'homologia existent entre el gen S_A de ratolí i vedella. S'han utilitzat els programes BLAST i CLUSTALW.

Possible gen S_A en el porc (*Sus scrofa*)

Existeix un EST de 828 nucleòtids amb número de GenBank **CK454381.1** on els primers 400 nucleòtids de l'EST presenten una homologia del 89 % amb la regió 1920-2739 del cDNA del S_A murí, en canvi els següents 400 nt presenten una homologia del 70% amb la regió 3' UTR que segueix al 2739 nt del cDNA murí.

*Possible presència del S_A en una espècie no mamífera com la gallina (*Gallus gallus*).*

Hem trobat varis EST amb tamanys de 600-870 nucleòtids que presenten homologies del 75-77 % amb el cDNA de S_A de ratolí.

1. BU243504.1; EST de 869 nt obtingut a partir de fetge de femella, el fragment del 39-581 nt presenta una homologia del 77% amb la regió 1565-2106 nt del cDNA murí.

2. BX262146.2; EST de 591 nt obtingut en la construcció d'una llibreria de cDNA a partir d'un *pool* de teixits d'embrions i adults. El fragment de 8-588 nt presenta una homologia del 76 % amb la regió 1517-2097 nt del cDNA murí.

3. BU375160.1; EST de 842 nt obtingut en la construcció d'una llibreria de cDNA a partir de ronyó de femella adulta. El fragment de 1-537 nt presenta una homologia del 75 % amb la regió 1732-2261 nt del cDNA murí.

4. BU379068.1; EST de 836 nt obtingut en la construcció d'una llibreria de cDNA a partir de ronyó de femella adulta. El fragment de 17-533 nt presenta una homologia del 75 % amb la regió 1753-2269 nt del cDNA murí.

5. BX262145.2; EST de 618 nt obtingut en la construcció d'una llibreria de cDNA a partir d'un *pool* de teixits d'embrions i adults. El fragment de 3-309 nt presenta una homologia del 76 % amb la regió 1963-2269 nt del cDNA murí.

8. Producció d'anticossos policlonals contra la proteïna S_A i identificació de la mateixa per western-blot

Es van obtenir anticossos policlonals contra un pèptid específic de la proteïna S_A (veure MÈTODES) immunitzant dos conills contra aquest pèptid anomenats 261 i 262. Els sèrums es van testar per *Western blot* essent el αS_A -261 el més eficient. L'obtenció d'aquest anticòs ens va permetre visualitzar la proteïna S_A i per tant saber, tot i que sembla obvi, si la proteïna S_A de la mateixa manera que el mRNA es veu modificada pel tractament hormonal.

Uns 100 μ g d'extracte proteic cru obtinguts a partir de ronyons dels mateixos ratolins mascles normals i castrats tractats amb dosis farmacològiques de DHT i E_2 utilitzats en l'apartat anterior, es van analitzar per Western-blot. Les proteïnes es van separar per electroforesi en un gel del poliacrilamida al 10% i les membranes després de bloquejar-se amb 5% de llet en PBS tota la nit, es van hibridar amb el sèrum αS_A -261 diluït a 1:350 en tampó de bloqueig durant 1h.

L'anticòs 261 revela quatre bandes de diferent tamany molecular, dos d'elles les corresponents als tamanys de 118kDa i 62 kDa desapareixen en mascles castrats i reapareixen en animals castrats tractats amb DHT (figura 51A panel de l'esquerra). En canvi quant l'anticòs es bloqueja amb el pèptid- S_A l'única banda que desapareix és la de 62 kDa, indicant que es tracta de la banda específica i per tant de la proteïna S_A , a més correspon al tamany més o menys esperat de la proteïna, (figura 51A panel de la dreta).

Com podem veure en la figura 51B el tractament amb estrògens disminueix dràsticament l'expressió de la proteïna S_A (62kDa) en ratolins mascle i en ratolins mascle castrats i tractats amb DHT; per tant la proteïna S_A segueix el mateix patró d'expressió depenent d'esteroides sexuals que el mRNA. La natura del producte de 118kDa és desconegut, sembla però que segueix un patró depenent d'andrògens però independent d'estrògens. En aquest treball no

s'ha aprofundit més en el coneixement d'aquesta proteïna.

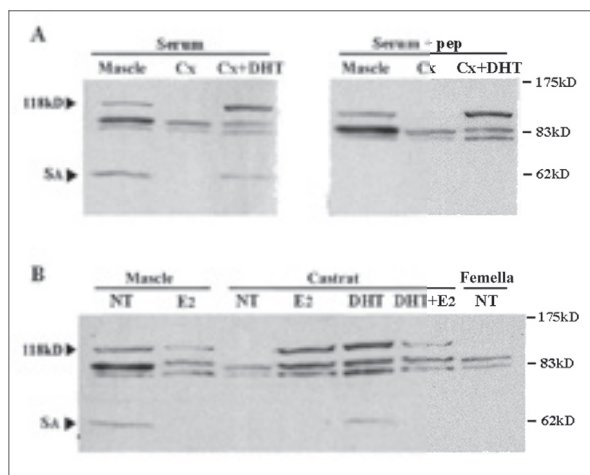


Fig. 51. Anàlisi per Western-blot d'homogenat cru a partir de ronyons de ratolí. A. 100 µg/línia de proteïna de ronyó de ratolins intactes no tractats (NT), castrats (Cx) i castrats tractats amb DHT (Cx+DHT), es van analitzar per Western blot utilitzant sèrum de conill immunitzat contra un pèptid de S_A sintètic (panel de l'esquerra). La preabsorció de l'anticòs amb excés del pèptid S_A antigènic prova l'especificitat de la reacció (panel de la dreta). B. En aquest experiment es van incloure homogenats crus de ronyó de ratolins intactes i castrats, tractats amb estrògens (E2), i ratolins castrats tractats ambdues hormones (DHT+E2). S'afegeix homogenat de ronyó de ratolí femella com a control negatiu.

9. Localització cel·lular de la proteïna S_A

El nivell d'expressió de la proteïna S_A en les línies cel·lulars renals, PCT3 i PR10 és indetectable, per tant per poder identificar i localitzar la proteïna hem transfectat les cèl·lules amb un vector d'expressió que conté el cDNA de S_A . Es va escollir el vector d'expressió pFLAG-CMVα (SIGMA), amb el que s'obté una proteïna de fusió que conté un octapèptid en posició C-terminal, FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys); en la figura 52A es representa de manera esquemàtica la proteïna de fusió S_A -FLAG. La visualització de la proteïna es dona gràcies a la disponibilitat d'un anticòs monoclonal (abFLAG) que reconeix l'octapèptid.

Les cèl·lules PCT3 són transfectades transitòriament amb el vector que expressa la proteïna de fusió S_A -FLAG. A les 24-48 hores posttransfecció es fixen les cèl·lules per ser analitzades per immunocitoquímica (ICQ). S'utilitza com anticòs primari l'abFLAG i com anticòs secundari un *anti-mouse* conjugat amb peroxidasa per visualitzar en microscopi òptic o un *anti-mouse* conjugat amb FITC per visualitzar la ICQ en microscòpia de fluorescència o confocal (veure apartat MÈTODES). La figura 52B presenta els resultats obtinguts en ambdues ICQ, com podem veure en les dos imatges la proteïna no es distribueix de manera uniforme a tot el llarg del citoplasma i, tampoc es troba en el nucli, sinó que sembla inclosa en algun tipus d'organel·la citoplasmàtica.

Per assegurar-nos que la proteïna S_A -FLAG s'expressa correctament es procedeix a immunoprecipitar la proteïna a partir d'extracte proteic total de cèl·lules transfectades amb

aquest constructe, utilitzant el sèrum 261 obtingut de conills immunitzats contra un pèptid de la proteïna S_A (αS_A -261) (veure RESULTATS). La proteïna immunoprecipitada es visualitza per western-blot utilitzant aquest cop com a anticòs primari l'abFLAG, obtenim una única banda d'aproximadament 62 kDa que correspon a la proteïna de fusió S_A -FLAG presentada en la figura 52C.

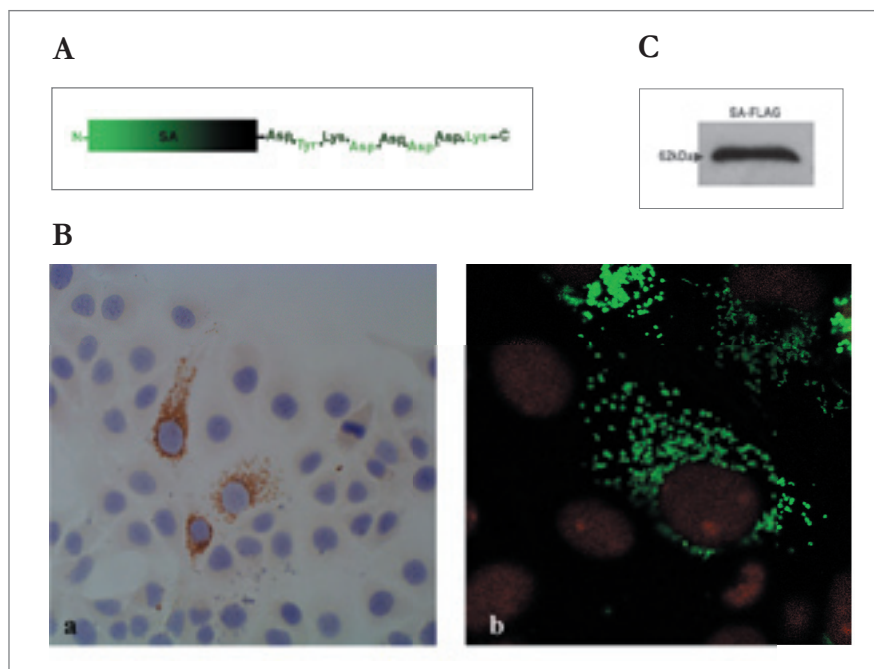


Fig. 52. Expressió i localització de la proteïna de fusió SA-FLAG en les cèl·lules renals PCT3. A. Representació esquemàtica de la proteïna de fusió SA-FLAG, el clonatge de l'ORF de SA en el sistema FLAG permet obtenir la proteïna amb una cua de buit pèptids (FLAG) en posició C-terminal, facilitant l'observació de la proteïna de fusió mitjançant un anticòs contra l'octapèptid FLAG. B. Representa els resultats obtinguts mitjançant ICQ, la figura a és el resultat d'hibridar les cèl·lules amb un anticòs secundari *anti-mouse* conjugat amb peroxidasa i revelat amb DAB (Diaminobenzidina), per la visualització en microscopi òptic. La figura b presenta el resultat obtingut en la utilització d'un anticòs *anti-mouse* conjugat amb FITC, per visualització en microscopi fluorescent o confocal. C. Resultat de la immunoprecipitació a partir d'un extracte proteic de cèl·lules transfectades amb el constructe SA-FLAG, utilitzant com a anticòs immunoprecipitador el sèrum 261 (αS_A -261), la visualització de la proteïna immunoprecipitada es dur a terme mitjançant western-blot utilitzant com anticòs primari l'abFLAG.

Un article d'en Fujino *et al* (2001) posterior a l'obtenció d'aquests resultats demostrava mitjançant fraccionament subcel·lular a partir de ronyons de ratolí, que la proteïna S_A murina es localitzava en la matriu mitocondrial. Era doncs, molt probable que les organel·les il·luminades per l'anticòs abFLAG on es trobava la proteïna S_A fossin mitocòndries. Per demostrar-ho vam utilitzar un marcador mitocondrial, el MitoTracker-Red (MOLECULAR PROBES, veure apartat MÈTODES), compost químic que emet llum quan és oxidat en la mitocòndria.

Les cèl·lules PCT3 són transfectades amb el constructe S_A -FLAG i a les 24h tripsinitzades i sembrades sobre portaobjectes. Passades 24h més, les cèl·lules adherides al portaobjectes són tractades amb 500 nM de MitoTracker-Red diluït en el mateix medi de cultiu durant una hora i mitja a 37°C i 0.5% de CO₂. Després les cèl·lules són fixades per ser analitzades per immunocitoquímica fluorescent i observades al microscopi confocal.

Els resultats obtinguts es representen en la figura 53, en cada filera es representa diferents

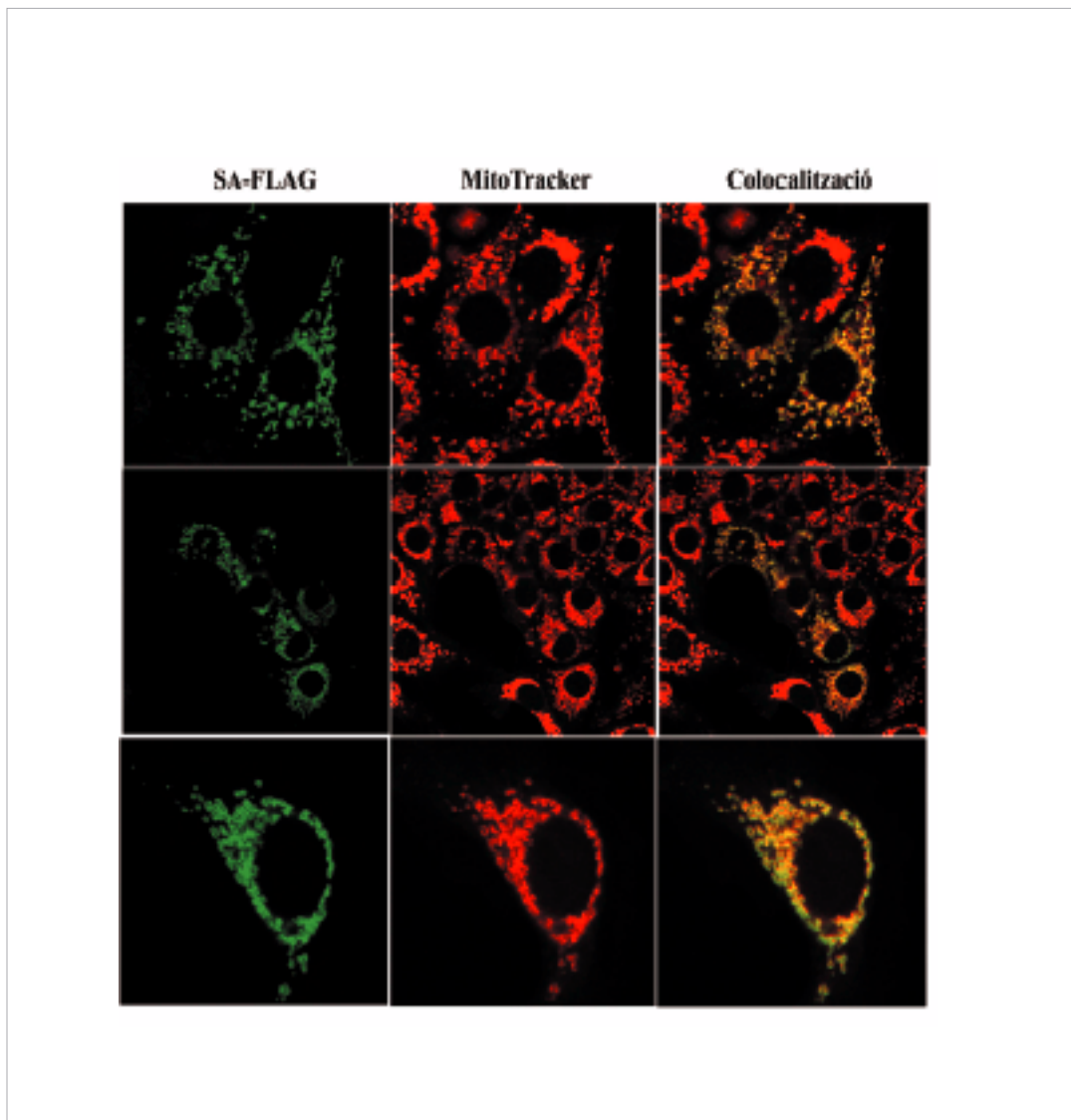


Fig. 53. Localització mitocondrial de la proteïna S_A en les cèl·lules PCT3. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia confocal. La primera columna (SA-FLAG) representa les cèl·lules transfectades amb el SA-FLAG i il·luminades en color verd gràcies a un anticòs secundari *anti-mouse* (que reconeix l'abFLAG) conjugat amb FITC. La segona columna (MitoTracker) és el mateix pla que l'anterior però aquest cop es visualitza el MitoTracker-Red i per tant les mitocondries il·luminades en vermell de totes les cèl·lules incloses en aquests plànols. La tercera columna (Colocalització) representa la superposició de les dos imatges anteriors, les colocalitzacions es visualitzen en groc.

zones de variis portaobjectes captades pel microscopi confocal. En la primera columna està representat el resultat de la immunocitoquímica, il·luminant-se en color verd la proteïna S_A -FLAG tant sols en les cèl·lules transfectades amb aquest constructe, la segona columna representa totes les cèl·lules tenyides amb el MitoTracker-Red, il·luminant-se en color vermell, i per últim la tercera columna presenta les dos imatges anteriors superposades, que ens demostra clarament la colocalització entre la proteïna S_A i la mitocondria.

Bloqueig del transport de la proteïna S_A a mitocondria.

Les proteïnes codificades en el nucli i que han de ser transportades a la mitocondria presenten un pèptid senyal que pot estar en posició N-terminal o bé en una posició molt més

interna en la seqüència peptídica, dependent del destí final de la proteïna dins la mitocondria. Segons el programa iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT>) la proteïna S_A presenta un pèptid de localització mitocondrial en posició N-terminal. Es va clonar l'ORF del cDNA de S_A en un vector d'expressió per la GFP (*Green Fluorescence Protein*) en posició C-terminal respecte a la GFP, per tal d'obtenir la proteïna de fusió GFP- S_A representada esquemàticament en la figura 54 panel superior. Les cèl·lules PCT3 es van transfectar transitòriament amb el vector GFP buit i amb el constructe GFP- S_A . A les 24 h post-transfecció es van tripsinitzar i es van sembrar sobre portaobjectes; passades 24 h més, les cèl·lules van ser fixades i observades directament al microscopi confocal. El resultat obtingut es representa en la figura 53 panel inferior; la proteïna GFP sola es distribueix per tota la cèl·lula inclòs el nucli, en canvi la proteïna de fusió GFP- S_A es troba en tot el citoplasma menys en el nucli però no presenta el patró de distribució mitocondrial.

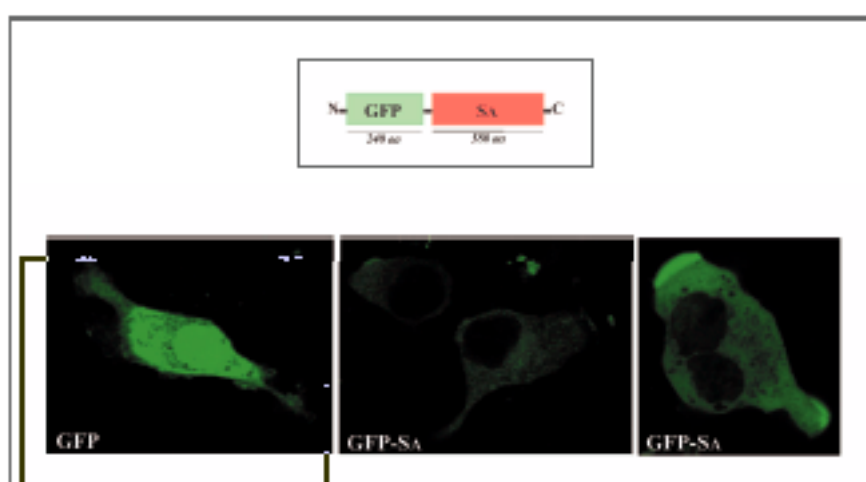


Fig. 54. Distribució cel·lular de la proteïna GFP- S_A en cèl·lules PCT3. Les cèl·lules PCT3 són transfectades amb el vector buit que expressa la GFP i amb el constructe GFP- S_A ; la proteïna GFP es distribueix per tota la cèl·lula incloent-hi el nucli, figura de l'esquerra; en canvi la proteïna de fusió GFP- S_A la trobem distribuïda per tot el citoplasma però no segueix un patró mitocondrial, figures del centre i dreta. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia confocal.

10. Altres trets característics de la proteïna S_A murina.

Aproximació de la vida mitja de la proteïna S_A

Per determinar la vida mitja d'una proteïna s'utilitza la tècnica del marcatge metabòlic que consisteix en proporcionar a les cèl·lules en cultiu un precursor marcat radioactivament com el ^{35}S -Met, que s'incorpora a les proteïnes que estan sent sintetitzades per la maquinària biosintètica de la cèl·lula. Per portar a terme aquest experiment transfectem la proteïna de fusió S_A -FLAG. Es sembren tantes plaques de 6 cm de diàmetre com els temps de recollida que vulguem analitzar (veure MÈTODES). Les cèl·lules es marquen radioactivament durant 15 minuts i passat aquest temps es canvia el medi radiactiu per medi normal; a partir d'aquest

moment es recullen les cèl·lules en diferents temps, essent el punt 0 els 15 minuts de marcatge. Els temps de recollida escollits han estat, 0', 30', 1h, 2h, 6h, 10h, 14h, 18h, 22h i 26h.

La proteïna S_A-FLAG és immunoprecipitada a partir dels extractes proteïcs obtinguts de les cèl·lules recollides en els diferents temps amb el sèrum 261 anti-S_A (α S_A-261) i visualitzada mitjançant wester-blot amb l'abFLAG. Una part de l'extracte immunoprecipitat es carrega en un gel d'acrilamida, el gel s'asseca i es visualitza la radioactivitat total en un film fotogràfic.

Els resultats obtinguts es representen en la figura 55, podem observar que la proteïna S_A comença a decaure a partir de les 6h tot i que encara la podem veure a les 26h, indicant que la proteïna té una vida mitja força llarga, superior a les 26h.

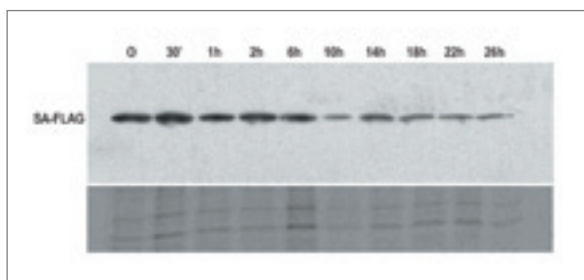


Fig.55. Aproximació de la vida mitja de la proteïna S_A murina, mitjançant marcatge metabòlic. SDS-PAGE i western-blot d'immunoprecipitat de diferents temps de recollida de cèl·lules PCT3 transfectades amb S_A-FLAG i marcades radioactivament amb ³⁵S-Met durant 15 min. El panel superior mostra el resultat del western-blot amb l'abFLAG dels immunoprecipitats en els diferents temps. El panel inferior és l'immunoprecipitat en gel d'acrilamida i revelat en film fotogràfic.

11. Anàlisi de l'activitat *medium-chain acyl-CoA synthetase* de la proteïna S_A en les cèl·lules PCT3 i PR10.

Fujino *et al* (2001), van identificar la proteïna S_A com un Acil-CoA sintetasa per a àcids grassos de cadena mitja (*Medium-chain acyl-CoA synthetase*) i Iwai *et al* van veure que la S_A presentava afinitat pel l'àcid octanoic en experiments *in vitro* i en cèl·lules COS. Nosaltres vam voler veure si en el nostre sistema cel·lular, la proteïna S_A murina presentava activitat enzimàtica en presència de l'àcid octanoic.

Per tal de dur a terme aquest experiment vam transfectar transitòriament cèl·lules PCT3 i PR10 amb el constructe S_A-FLAG. A les 24 h post-transfecció es sembren de tres a quatre flascons T25 per situació, utilitzant com a mostra control cèl·lules transfectades amb el vector FLAG buit. A l'endemà s'afegeix el substracte a les cèl·lules, en aquest cas àcid octanoic marcat amb ¹⁴C i es deixen incubar durant 1h i 30min a 37°C i 0.5% de CO₂. L'àcid octanoic és metabolitzat en la mitocondria i el ¹⁴C és incorporat al CO₂ resultant de l'oxidació, aquest s'enganxarà a un paper de filtre petit ubicat en el coll del flascó que es troba tancat hermèticament per un tap de goma (veure MÈTODES). El paper de filtre es summergeix en líquid de centelleig i es mesura directament en el comptador beta. Les dades obtingudes es normalitzen amb la concentració de proteïna total. Els resultats obtinguts es representen en la figura 56A, com podem veure la presència de la proteïna S_A en les cèl·lules renals augmenta ~x2.3 vegades la quantitat de CO₂ marcat respecte a les cèl·lules transfectades amb el vector buit i, per tant

demostrem una vegada més que l'àcid octanoic és substrate per la S_A . Els mateixos resultats s'obtingueren en cèl·lules PCT3 (no mostrats). Alhora podem mesurar la incorporació del ^{14}C en els triglicèrids sintetitzats de novo, a partir d'un extracte lipídic (veure MÈTODES) obtingut a partir del *pellet* de les mateixes cèl·lules transfectades, els resultats obtinguts es representen en la figura 56B i mostren que l'àcid octanoic activat per la S_A es utilitza per la via catabòlica i no la anabòlica.

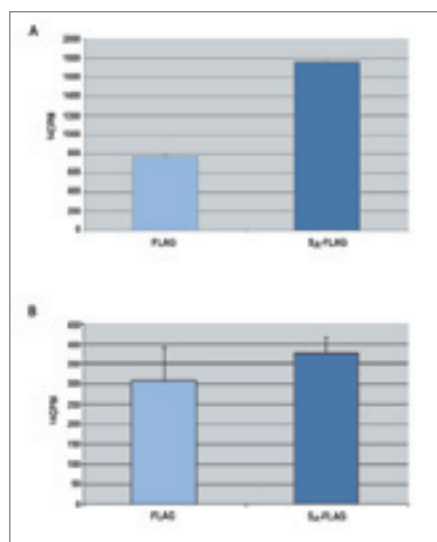


Fig.56. Activitat enzimàtica de la proteïna S_A utilitzant com a substrate metabòlic un àcid gras de cadena mitja, l'àcid octanoic, en cèl·lules PR10. Cèl·lules PR10 transfectades transitòriament amb el vector FLAG buit i el constructe S_A -FLAG s'incuben amb àcid octanoic marcat amb ^{14}C . **A.** El $^{14}CO_2$ resultant de l'oxidació de l'àcid octanoic s'incorpora a un paper de filtre fàcilment mesurable en un comptador beta. Els resultats obtinguts són normalitzats respecte a la concentració de proteïna total. **B.** Comptatge del ^{14}C incorporat en els triglicèrids formats de novo a partir d'un extracte lipídic de les mateixes cèl·lules transfectades amb el constructe S_A -FLAG i incubades amb l'àcid octanoic.

12. Identificació d'un possible domini d'unió als àcids grassos en la proteïna S_A murina.

Els enzims *fatty acyl-CoA synthetase* (fatty acid:CoA ligase, AMP-forming; EC 6.2.1.3) catalitzen la formació de l'acil-CoA mitjançant dos passos a través de la hidròlisi del pirofosfat (veure INTRODUCCIÓ). Tots els enzims acil-CoA sintetasa presenten varis dominis aminoacídics amb una elevada similitud tant en procariotes com eucariotes indicant un ancestre comú. Una d'aquestes regions comunes entre tots els enzims és el domini d'unió a AMP també present en la proteïna S_A com s'indica en la figura 47. Un altre domini comú en totes les *fatty acyl-CoA synthetases* és una seqüència consens d'uns 25 aminoàcids proposada com a *fatty acyl-CoA synthetase signature motif* (*FACS signature motif*) o regió d'unió als àcids grassos (Black *et al* 1997). Aquesta seqüència és pràcticament idèntica en tots els enzims de la família sobretot pels enzims acil-CoA sintetasa d'àcids grassos de cadena llarga; més endavant es va identificar una seqüència d'uns 35 aminoàcids on bona part d'ella, exactament els primers 19 aminoàcids, estan inclosos en el *FACS signature motif*, per als enzims acil-CoA sintetasa d'àcids grassos de cadena mitja (Morszeck *et al* 2001).

Fent un estudi comparatiu d'aquest domini entre algunes proteïnes identificades com a acil-CoA sintetasa, tant de cadena llarga com mitja i la proteïna S_A hem pogut trobar el possible domini d'unió als àcids grassos en la proteïna S_A comú en tots els enzims d'aquesta família.

Com podem veure en la figura 57 en tots aquests enzims existeix un domini de 35 aminoàcids situats entre el 400-500 aminoàcid i que presenten una elevada homologia. És desta-

cable la presència d'una glicina en primera posició, un àcid aspàrtic en posició 2, una glicina en posició 10, una arginina en 17 posició i una glicina i un àcid glutàmic en posicions 26 i 35 respectivament, conservats en tots aquests enzims.

FadD	436	GDI	A	V	M	D	E	E	G	F	L	R	I	V	D	R	K	K	D	M	I	L	V	S	G	F	N	V	Y	P	N	E	I	E	470	
LcfA	438	G	D	I	G	Y	M	D	K	D	G	F	F	I	V	D	R	K	K	D	V	I	I	A	G	G	N	I	Y	P	R	E	I	E	472	
Acs(EA) ¹	385	G	D	M	G	Y	M	D	E	D	G	Y	L	W	F	V	G	R	S	D	D	V	I	K	S	S	D	Y	R	I	G	P	F	E	419	
Acs ¹	411	G	D	R	A	Y	R	D	E	D	G	Y	L	W	F	V	G	R	S	D	D	V	I	L	S	A	G	Y	R	I	G	P	F	E	445	
OMACS	454	G	D	R	G	V	M	D	D	G	Y	L	W	F	V	G	R	A	D	D	V	I	I	S	S	G	Y	R	I	G	P	F	E	488		
Acs ²	426	G	D	K	A	W	M	D	E	D	G	Y	L	W	F	L	G	R	V	D	D	I	I	K	S	S	G	Y	R	I	G	P	F	E	460	
Acs-6	441	G	D	K	A	F	F	D	E	K	G	Y	W	F	V	G	R	A	D	D	V	I	K	T	S	D	Y	R	V	G	P	F	E	475		
FadDx	427	G	D	T	V	E	L	N	Q	D	G	S	I	S	F	V	G	R	S	D	D	V	I	T	T	S	G	Y	R	V	G	P	F	D	461	
AcsA ¹	439	G	D	S	A	Y	M	D	E	D	G	Y	F	W	F	Q	R	I	D	D	V	I	M	T	S	G	E	R	V	G	P	F	E	473		
BCS	451	G	D	R	A	T	I	D	E	E	G	Y	F	W	F	L	G	R	S	D	D	V	I	N	A	S	G	Y	R	V	G	P	A	E	485	
mMACS	447	G	D	R	A	T	I	D	E	E	G	Y	I	W	F	L	G	R	G	D	D	V	I	N	A	S	G	Y	R	I	G	P	V	E	481	
hMACS	451	G	D	R	G	K	M	D	E	E	G	Y	I	C	F	L	G	R	S	D	D	V	I	N	A	S	G	Y	R	I	G	P	A	E	485	
KS	445	G	D	R	G	I	K	D	T	E	G	Y	F	H	F	M	G	R	T	D	D	I	I	N	S	S	G	Y	R	I	G	P	S	E	479	
Acs3	493	G	D	A	A	Y	I	D	E	D	G	Y	V	W	E	T	G	R	A	D	E	V	I	K	I	A	G	H	R	I	G	T	I	E	527	
AcsA-6	482	G	D	Y	G	Y	V	D	E	D	G	Y	L	F	V	L	G	R	A	D	D	V	I	R	A	E	G	E	R	I	G	T	L	E	516	
AcsA ¹	504	G	D	N	A	H	R	D	K	D	G	Y	F	W	I	L	G	R	T	D	D	V	I	N	V	S	G	H	R	L	G	T	M	E	538	
AcsA-7	468	G	D	L	A	Y	R	D	E	E	G	Y	F	Y	I	V	G	R	S	D	D	V	I	K	V	A	G	K	R	V	G	P	A	E	502	
Mig	430	G	D	R	A	R	H	H	A	D	G	H	I	E	L	L	G	R	D	S	V	C	I	N	S	G	G	E	K	I	F	V	E	E	464	
FadD19	415	G	D	Y	A	Q	V	E	E	D	G	T	V	T	M	L	G	R	G	S	V	S	I	N	S	G	G	E	K	V	Y	P	E	E	449	
AlkK	416	G	D	V	A	T	I	D	S	D	G	F	M	T	I	C	D	R	A	K	D	I	K	S	G	G	E	W	I	S	T	V	E	E	450	
Dein	455	G	D	I	A	T	L	D	E	R	G	Y	M	H	I	Q	D	R	S	K	D	I	K	S	G	G	E	W	I	G	S	V	E	E	489	
AlkK-5	412	G	D	I	A	V	M	D	E	E	G	Y	I	T	I	V	D	R	L	K	D	V	V	K	S	G	G	E	W	I	S	T	L	T	E	446
AcoAS	448	G	D	S	G	F	V	T	D	G	K	M	F	I	I	G	R	I	K	D	L	I	V	Y	G	R	N	H	S	P	D	D	E	482		
mS _A	454	G	D	R	G	Y	M	D	E	D	G	Y	F	W	F	V	A	R	S	D	D	V	I	L	S	S	G	Y	R	I	G	P	F	E	488	

Fig.57. Alineament entre els dominis d'unió a àcids grassos de diferents enzims de la família dels Acil-CoA sintetasa. Comparació entre les seqüències aminoacídiques dels possibles dominis d'unió a àcids grassos de varis enzims identificats com a Acil-CoA sintetases per a àcids grassos de cadena llarga (LCAS) i mitja (MACS) i la proteïna S_A. L'alineament s'ha realitzat utilitzant el programa CLUSTALW disponible als servidors del EBI. FadD, LCAS (Morsceck *et al*, 2001); LcfA, acil-CoA sintetasa de *Bacillus licheniformes* (GenBank YP_092563.1); Acs(SA)¹, acil-CoA sintetasa, probable proteïna S_A de *Thermoplasma acidophilum* (Gen Bank CAC12626.1); Acs², acil-CoA sintetasa de *Rubrobacter xylanophilus* (Gen Bank ZP_00187688.2); OMACS, *olfactory specific medium-chain acyl-CoA synthetase* de rata (Gen Bank NP_859046.1); Acs³, de *Desulfovibrio desulfuricans* (Gen Bank NP_00129780.1); Acs-6, de *Archaeoglobus fulgidus* (Gen Bank NP_070115.1); FadDx, LCAS de *Pseudomonas putida* (Gen Bank AAK 18169.1); AcsA¹, de *Bacillus licheniformes* (Gen Bank YP_092673.1); BCS, butiril-CoA sintetasa I de vedella (Gen Bank NP_777107.1); mMACS, butiril-CoA sintetasa I de ratolí (Gen Bank AAH16414.1); hMACS, *medium-chain acyl-CoA synthetase* humà (Gen Bank BAB64535.1); KS, *kidney specific protein* de rata (Gen Bank AAB90564.1); AcsA-6 i AcsA-7 de *Sulfolobus solfataricus* (Gen Bank NP_343453.1 i NP_343462.1); AcsA², de *Pasteurella multocida* (Gen Bank NP_245629.1); Mig (*macrophage-induced gene*), *medium chain acyl-CoA synthetase* (Morsceck *et al*, 2001); FadD19 (Morsceck *et al*, 2001); AlkK de *P. oleovorans* (Morsceck *et al*, 2001); Dein, *Deinococcus* espec. (Gen Bank B75265); AlkK-5 de *Archaeoglobus fulgidus* (Morsceck *et al*, 2001); AcoAs de *M. bovis* (Morsceck *et al*, 2001); mS_A, proteïna S_A murina.

Procedim a la construcció d'una sèrie de mutacions directes en la proteïna S_A per evaluar la contribució d'aquest domini en l'activitat de la proteïna; utilitzant com a motllo la proteïna de fusió S_A-FLAG mitjançant el *Quickchange*TM *Site-Directed Mutagenesis* de Stratagene realitzem la substitució dels sis aminoàcids anomenats abans per una alanina, concretament són G454A, D455A, G463A, R470A, G479A i E488A. Un cop tenim tots els mutants transfectem transitoriament cèl·lules PR10 amb cada un dels constructes mutats per comprovar si s'expressen correctament, a partir de l'extracte proteic total obtingut de les cèl·lules transfectades realitzem un western-blot utilitzant com anticòs primari l'abFLAG, el resultat obtingut es presenta en la figura 58; com podem observar cada un de les proteïnes mutades s'expressa correctament.

Per mesurar l'activitat enzimàtica de cada un dels mutants i de la proteïna S_A wt es realitzà el mateix experiment exposat en l'apartat anterior, com a control negatiu s'utilitzà cèl·lules transfectades amb el vector FLAG buit. Els resultats obtinguts en cada experiment estan normalitzats respecte a la concentració de proteïna total i l'expressió de cada una de les

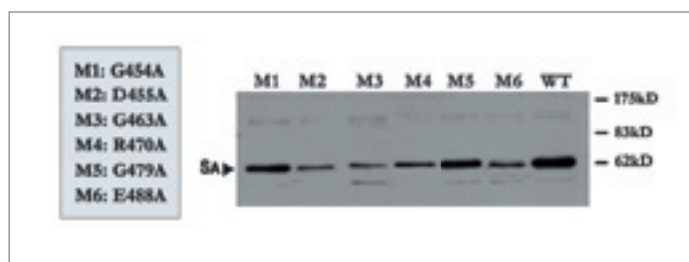


Fig.58. Anàlisi mitjançant western-blot de cada una de les proteïnes S_A mutades. En la part esquerra de la figura s'indica la nomenclatura utilitzada per cada un dels mutants. El panel dret representa el resultat obtingut en el western-blot realitzat a partir d'extracte proteic total de cèl·lules PR10 transfectades transitòriament amb cada un dels mutants i la proteïna S_A wt.

proteïnes wt i mutades visualitzades per western-blot. Com podem veure en la figura 59, els mutants G454A, D455A, G479A i E488A, experimenten una lleugera disminució en l'activitat enzimàtica essent significativa per a la glicina situada en la posició 463 (G463A), ja que assoleix valors d'activitat iguals al vector FLAG buit. No es produeix cap canvi en la proteïna que conté l'arginina 470 substituïda per una alanina (R470A).

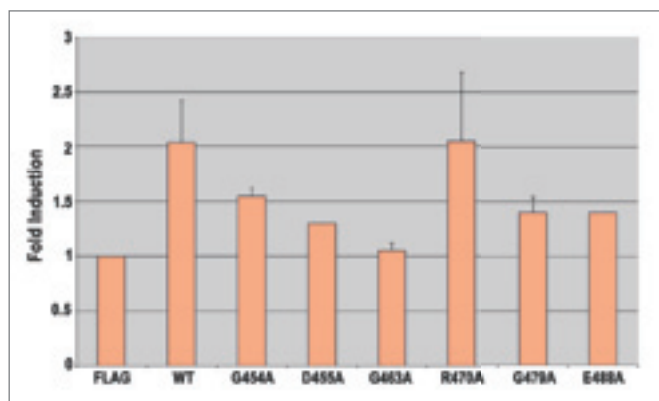


Fig.59. Activitat enzimàtica de la proteïna S_A amb el domini d'unió a àcids grassos mutats, respecte a la proteïna S_A wt. Cèl·lules PR10 transfectades transitòriament amb el vector FLAG buit, el constructe S_A -FLAG wt i els diferents constructes amb la proteïna S_A mutada, s'incuben amb àcid octanoic marcat amb ^{14}C . Els resultats obtinguts són normalitzats respecte a la concentració de proteïna total i l'expressió de cada una de les proteïnes visualitzades per western-blot. Resultats representats en *fold induction* respecte al vector FLAG buit.

13. Acció dels factors de transcripció PPAR sobre l'expressió del gen S_A .

Està ampliament demostrat que molts enzims implicats en el metabolisme lipídic estan regulats pels factors de transcripció PPAR (veure INTRODUCCIÓ); s'ha demostrat la regulació de varies enzims acil-CoA sintetasa regulats pels PPAR, mitjançant experiments *in vivo* utilitzant agonistes per aquests receptors; també s'han identificat elements de resposta a aquests receptors (PPER) en els promotors dels gens de llurs enzims. La majoria dels resultats obtinguts amb aquests treballs s'han realitzat en el fetge.

Nosaltres hem volgut investigar si el gen S_A podia estar regulat pels PPAR, ja que es tracta d'un enzim de la família dels ACS amb una possible implicació en el metabolisme lipídic. A

tal efecte hem utilitzat dos aproximacions, una primera aproximació s'ha realitzat mitjançant experiments *in vitro* amb assajos d'activitat promotora del gen S_A en presència dels PPARs amb la finalitat de saber si es podria donar una regulació gènica directa sobre el gen S_A per part dels PPARs.

Una segona aproximació s'ha realitzat mitjançant experiments *in vivo* utilitzant agonistes dels PPAR α i PPAR γ , per tractar ratolins C57BL/6 i un posterior anàlisi per Northern-blot a partir de RNA total dels ronyons i fetges dels ratolins tractats.

13.1 Activitat transcripcional del promotor del gen S_A en presència dels receptors PPAR i RXR en la línia PR10.

Una primera avaluació en l'estudi de l'activitat promotora en front als receptors PPAR es va realitzar mitjançant transfeccions transitòries en cèl·lules renals PR10 i posteriors assajos luciferasa. Amb la finalitat de mapar la/es regió/ns del promotor del gen S_A que més respon/ent als receptors PPAR, es van transfectar transitòriament en les cèl·lules PR10 alguns dels fragments de promotor descrits en l'apartat 6.1.1 de RESULTATS. En tots els casos ha estat necessària la transfecció dels vectors que codifiquen per als receptors PPAR α , PPAR γ , PPAR δ/β i RXR de ratolí (veure MÈTODES) per obtenir una activitat transcripcional específica. Per normalitzar els valors deguts a la diferència en l'eficiència de transfecció, les cèl·lules es es cotransfecten amb el vector pSEAP2. Els assajos de transfecció transitòria es van realitzar en plaques de 24 pous, les activitats luciferasa i SEAP es mesuren a les 48h posttransfecció.

La figura 60 mostra els resultats obtinguts en aquest experiment; els factors de transcripció PPAR α i PPAR γ són els que donen una major activitat transcripcional a diferència dels

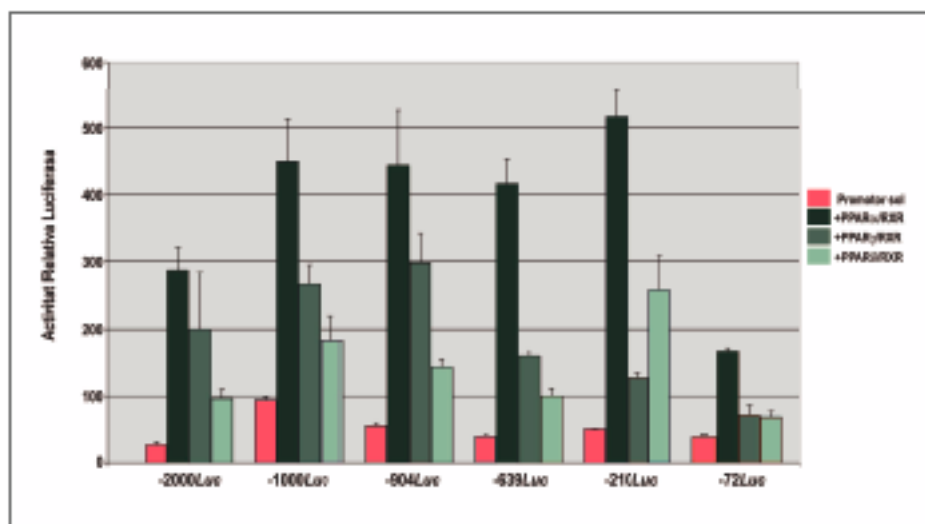


Fig. 60. Resposta del promotor del gen S_A murí als receptors PPAR α , PPAR γ i PPAR δ/β juntament amb el RXR. Alguns dels constructes del promotor S_A van ser cotransfectats en les cèl·lules PR10, juntament amb els plàsmids que codifiquen pels receptors PPAR de ratolí, també es cotransfecta amb cada un dels PPAR el receptor RXR murí. Les barres de color rosat representen les activitats luciferasa del promotor en absència de receptors. Les barres de color verd de més a menys intensitat representen els valors luciferasa de cada un dels fragments de promotor en presència de PPAR α /RXR, PPAR γ /RXR i PPAR δ/β /RXR, respectivament. Els valors estan normalitzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja \pm SD de diverses transfeccions realitzades per triplicat.

valors força discrets obtinguts amb el PPAR δ .

La màxima activitat obtinguda amb el PPAR α es troba en els fragments -210*Luc*, -639*Luc* i -2000*Luc* amb increments de ~ 10 vegades respecte al promotor sol; encara que amb tant sols 72 nucleòtids de promotor obtenim valors de ~ 4 vegades en presència de PPAR α .

Amb el PPAR γ la màxima activitat la trobem en els fragments de -2000*Luc* i -904*Luc* amb increments d'aproximadament 7.6 i 5.5 vegades, respectivament; activitat que disminueix progresivament fins al -72*Luc* on s'obtenen valors d'activitat promotora no significatius.

El PPAR δ/β és el receptor que dona una activitat promotora menor, essent la mateixa a llarg de tot el promotor a excepció del fragment -210*Luc* que assoleix induccions d'aproximadament 5 vegades respecte al promotor sol.

13.2 Efecte dels receptors PPAR i agonistes en diferents línies cel·lulars.

Existeixen varis agonistes per als PPAR, nosaltres hem triat el WY14,643 (WY14) com a agonista del PPAR α i el Ciglitazone (CTZ) agonista del PPAR γ , per fer assajos d'activitat promotora en varies línies cel·lulars, PR10, PCT3, MDCK i HepG2. Les cèl·lules s'han cotransfectat amb el fragment -639*Luc* i els diferents receptors, ja sigui el RXR sol o juntament amb el PPAR α i el PPAR γ . S'ha analitzat també el fragment -210*Luc* però només en les cèl·lules PR10.

Després de tres hores d'incubació amb la lipofectamina (veure MÈTODES) es canvia el medi de transfecció pel medi de cultiu afegint-hi a més, els diferents agonistes a una concentració de 10 μM de WY14 diluït en DMSO per a les cèl·lules cotransfectades amb el PPAR α /RXR i 60 μM de CTZ diluït en etanol per les co-ransfectades amb PPAR γ /RXR; com a control negatiu s'afegeix a les cèl·lules transfectades els vehicles, DMSO i etanol, segons el receptor emprat. En tots els casos s'utilitza com a normalitzador de l'eficiència de transfecció l'activitat SEAP. Les activitats luciferasa i SEAP es mesuren a les 48h posttransfecció.

La primera sorpresa obtinguda en aquest experiment és que el CTZ va resultar ser tòxic per a les cèl·lules PR10 i PCT3, ja que a les 24h de tractament les cèl·lules presentaven un elevat percentatge de mortalitat amb un aspecte semblant a cèl·lules apoptòtiques, per tant va ser impossible mesurar l'activitat promotora en aquestes línies cel·lulars en presència del CTZ. En la figura 61 es presenta un exemple de l'aspecte que presentaven les cèl·lules PCT3 a les 24h de tractament amb 60 μM de CTZ. Aquest fet no es va donar en les altres línies cel·lulars.

En la figura 62 es mostra els resultats obtinguts amb els assajos d'activitat luciferasa del promotor en les diferents línies cel·lulars en presència dels agonistes. El receptor PPAR α no indueix l'activitat promotora en presència del seu agonista WY14,643 més del que ja ho fa per ell mateix en cap línia cel·lular; en canvi el receptor PPAR γ necessita de la presència del ciglitazone per superar els valors luciferasa obtinguts amb el RXR per si sol, essent aquest efecte molt important en la línia MDCK.

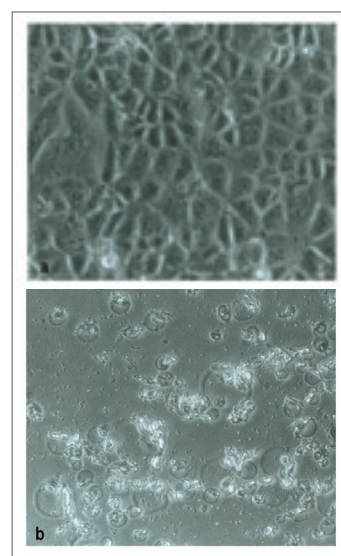


Fig. 61. Cèl·lules PCT3 tractades amb etanol (a) i amb CTZ (b) agonista de PPAR γ .

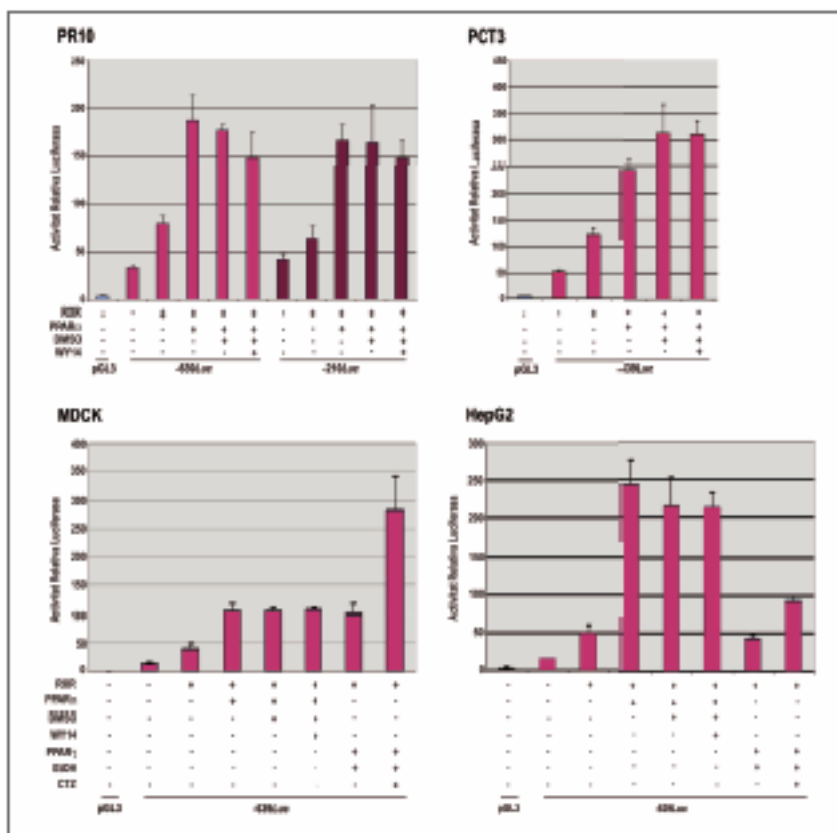


Fig. 62. Resposta del promotor de S_A als receptors PPAR α , PPAR γ i RXR en diferents línies cel·lulars en presència dels seus agonistes. Les quatre línies cel·lulars han estat transfectades amb el constructe -639Luc conjuntament amb el receptor RXR (RXR) sol o amb el PPAR α (PPAR α /RXR) o el PPAR γ (PPAR γ /RXR) en presència o absència dels seus agonistes, el WY14,643 (WY) i el vehicle (DMSO) en el cas del PPAR α i el Ciglitzone (CTZ) i el seu vehicle l'etanol (EtOH) per al PPAR γ , respectivament. El constructe -210Luc també ha estat testat en les cèl·lules PR10 seguint el mateix procediment, barres de color lila fosc. Els valors estan normalitzats en relació a les activitats fosfatasa alcalina corresponents. Cada barra representa la mitja \pm SD de varies transfeccions realitzades per triplicat.

L'activitat promotora exercida pel receptor PPAR α en les cèl·lules HepG2 és molt elevada, ja que s'obtenen induccions de x5 vegades respecte al receptor RXR sol i, aproximadament unes x16.5 vegades respecte al promotor sol. En tots els casos el RXR per si mateix pot induir l'activitat promotora amb valors luciferasa de 2 a 3 vegades respecte als obtinguts amb el *reporter* sol.

13.3 Expressió del mRNA del gen S_A en presència d'agonistes dels PPAR en ratolins mascle.

Per realitzar els estudis *in vivo* es van tractar ratolins de la soca C57BL/6 amb diferents agonistes dels PPAR. En un primer experiment es va utilitzar el Clofibrat, agonista de PPAR α a una concentració de 500 μ g/g diluït en oli d'oliva, amb injeccions intraperitoneals diàries

durant cinc dies. Finalitzat l'experiment es van extreure els ronyons i els fetges per obtenir RNA total i posterior anàlisi per Northern-blot. Es van incloure com a controls un grup d'animals tractats amb el vehicle, l'oli d'oliva. Les membranes es van hibridar amb una sonda de 645 pb del cDNA de S_A obtinguda per PCR; els valors d'expressió del gen S_A es van normalitzar amb la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de ratolí (GAPDH). Com podem veure en la figura 63, el clofibrat augmenta l'expressió del gen S_A en el ronyó, en canvi en el fetge té l'efecte contrari ja que l'expressió del gen disminueix significativament.

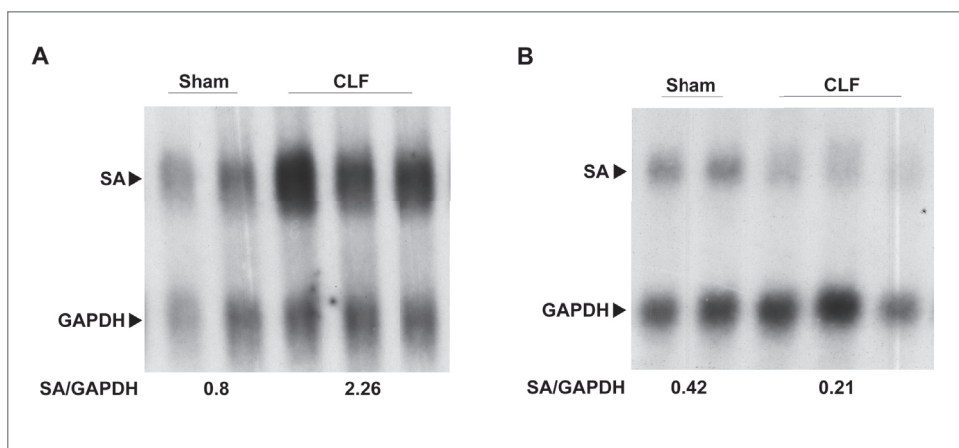


Fig. 63. Efecte del Clofibrat agonista del PPAR α sobre l'expressió del mRNA de S_A en ronyó i fetge de ratolí. 15 μ g de RNA total obtinguts a partir de ronyons (A) i fetges (B) de ratolins mascle tractats amb 500 μ g/g de Clofibrat (CLF) o amb el vehicle, l'oli d'oliva (Sham) durant cinc dies, van ser analitzats per Northern-blot. La membrana de nylon es va hibridar amb una sonda específica del cDNA de S_A marcada amb 32 P. La GAPDH es va utilitzar com a control intern de càrrega i d'integritat del mRNA. Les autoradiografies es van analitzar per densitometria, calculant-se els *ratios* entre S_A i el control intern GAPDH (SA/GAPDH) representats sota de cada panel.

Un segon experiment es va realitzar amb un altre agonista de PPAR α , el WY14,643 a una concentració de 70 μ g/g diluït en 20%DMSO i solució salina. El tractament realitzat és el mateix que l'expressat anteriorment, injeccions intraperitoneals durant cinc dies. En aquest cas els animals control estan tractats amb el vehicle o sigui 20%DMSO en solució salina. També es va procedir a l'anàlisi del RNA total a partir de ronyons i fetges dels ratolins tractats amb WY14,643, per Northern-blot. En la figura 64 es representen els resultats obtinguts amb aquest experiment, el WY14,643 no produeix cap canvi en l'expressió del gen S_A ni en el ronyó ni en el fetge.

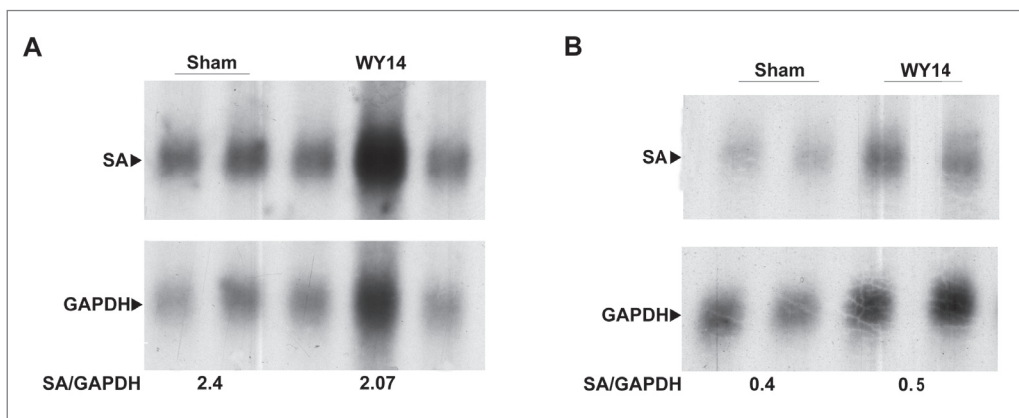


Fig. 64. Efecte del WY14,643 agonista del PPAR α sobre l'expressió del mRNA de S_A en ronyó i fetge de ratolí. 15 μ g de RNA total obtinguts a partir de ronyons (A) i fetges (B) de ratolins mascle tractats amb 70 μ g/g de WY14,643 (WY14) o amb el vehicle, 20% DMSO en solució salina (Sham) durant cinc dies, van ser analitzats per Northern-blot. La membrana de niló es va hibridar amb una sonda específica del cDNA de S_A marcada amb 32 P. La GAPDH es va utilitzar com a control intern de càrrega i d'integritat del mRNA. Les autoradiografies es van analitzar per densitometria, calculant-se els *ratios* entre S_A i el control intern GAPDH (SA/GAPDH) representats sota de cada panel.

Com agonista del PPAR γ hem utilitzat el Ciglitzone tractant ratolins mascle amb 20 μ g/g diluït en etanol i solució salina, seguint el mateix procediment explicat en les dos tractaments anteriors. El RNA total obtingut a partir dels ronyons i fetges d'aquests animals també han estat analitzats per Northern-blot. Com podem observar en la figura 65, el ciglitzone disminueix l'expressió del gen S_A en el ronyó, en canvi en el fetge no hi produeix cap efecte.

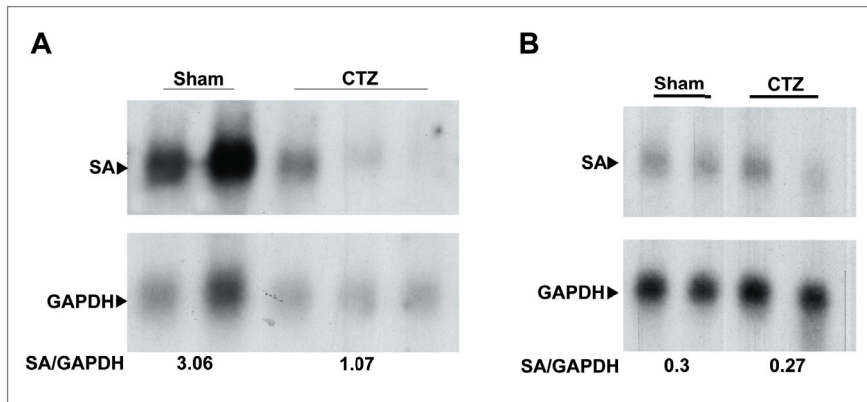


Fig. 65. Efecte del Ciglitzone agonista del PPAR γ sobre l'expressió del mRNA de S_A en ronyó i fetge de ratolí. 15 μ g de RNA total obtinguts a partir de ronyons (A) i fetges (B) de ratolins mascle tractats amb 20 μ g/g de ciglitzone (CTZ) o amb el vehicle, etanol en solució salina (Sham) durant cinc dies, van ser analitzats per Northern-blot. La membrana de niló es va hibridar amb una sonda específica del cDNA de S_A marcada amb 32 P. La GAPDH es va utilitzar com a control intern de càrrega i d'integritat del mRNA. Les autoradiografies es van analitzar per densitometria, calculant-se els *ratios* entre S_A i el control intern GAPDH (SA/GAPDH) representats sota de cada panel.