



**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona**

**IDENTIFICACIÓ D'UN NOU GEN D'OBESITAT
I D'ALTRES GENS AMB EXPRESSIÓ ALTERADA
EN CONDICIONS DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA**

**DANIEL BACH GONZÁLEZ
TESI DOCTORAL
Barcelona, desembre 2001.**

**MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE
DOCTOR EN BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOQUÍMICA, BIENNI 1997-1999, DEL
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR DE LA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Presentada per:

DANIEL BACH GONZÁLEZ

Vist i plau del director:

L'interessat,

Prof. Dr. Antonio Zorzano Olarte
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Daniel Bach González

a Carmen

I Índice

I ÍNDEX **7**

II INTRODUCCIÓ **17**

II.1 L'OBESITAT I LA DIABETIS **19**

II.2 FISIOPATOLOGIA **21**

II.2.1 OBESITAT **21**

II.2.1.1 Control de la ingesta 22

II.2.1.2 Control de la taxa metabòlica basal i de la termogènesi 25

II.2.2 DIABETIS TIPUS 2 **30**

II.3 GENÈTICA **35**

II.3.1 ESTUDI DE GENS CANDIDATS **37**

II.3.1.1 Leptina i receptor de leptina 37

II.3.1.2 POMC, FAT, receptors de melanocortina. 38

II.3.1.3 Receptors adrenèrgics β_2 i β_3 39

II.3.1.4 UCP's 40

II.3.1.5 TNF- α 40

II.3.1.6 PPAR- γ 41

II.3.1.7 Glucoproteïna PC-1 41

II.3.1.8 IRS-1 42

II.3.1.9 Glucògen sintasa 42

II.3.1.10 NeuroD1 43

II.3.2 CERCA A GENOMA COMPLET **44**

III OBJECTIUS **47**

IV MATERIALS I MÈTODES 51

IV.1 ANIMALS - EXTRACCIÓ DE TEIXITS	53
IV.2 INDIVIDUS	54
IV.3 TÈCNiques D'OBTEncIÓ D'RNA	55
IV.3.1 OBTEncIÓ D'RNA TOTAL	55
IV.3.1.1 Extracció amb kit de Quiagen	55
IV.3.1.2 Aïllament per CsCl	58
IV.3.2 AïLLAMENT D'RNA POLI-A	61
IV.3.2.1 Mètode de partícules magnètiques	61
IV.3.2.2 Mètode per columna d'oligo-dT-cel·lulosa	63
IV.4 TÈCNiques BàSIQUES DE MANIPULACIÓ DEL DNA	64
IV.5 DIFFERENTIAL DISPLAY PCR	65
IV.5.1 "PRIMERS"	66
IV.5.2 AMPLIFICACIÓ PCR	67
IV.5.3 ELECTROFORESI EN GEL D'ALTA RESOLUCIÓ DD-PAGE	69
IV.5.4 RECUPERACIÓ DE LA BANDA	71
IV.6 HIBRIDACIÓ SOSTRACTIVA	72
IV.6.1 BASES MOLECULARS DE PCR-SELECT CDNA SUBTRACTION™	72
IV.6.2 GENERALITATS	76
IV.6.3 SÍNTESI DE CDNA	77
IV.6.4 DIGESTIÓ AMB RsaI	80
IV.6.5 LLIGACIÓ D'ADAPTADORS	81
IV.6.6 HIBRIDACIONS	84
IV.6.7 AMPLIFICACIONS PER PCR	86

IV.6.8 CLONACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR	89
IV.6.9 "DIFFERENTIAL SCREENING"	91
IV.7 TÈCNiques DE DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ D'RNA	93
IV.7.1 NORTHERN BLOT	93
IV.7.1.1 Electroforesi en gel d'agarosa	93
IV.7.1.2 Transferència	95
IV.7.1.3 Síntesi de la sonda marcada	96
IV.7.1.4 Hibridació i rentats	98
IV.7.2 PCR COMPETITIVA QUANTITATIVA	100
IV.7.2.1 Bases moleculars de la PCR competitiva quantitativa	100
IV.7.2.2 Disseny de "primers"	100
IV.7.2.3 Síntesi d'estàndards	102
IV.7.2.4 Síntesi de cDNA	103
IV.7.2.5 Amplificacions PCR competitives.	104
IV.8 AMPLIFICACIÓ SMART™ RACE DE CDNA	108
IV.8.1 DISSENY DE "PRIMERS"	108
IV.8.2 SÍNTESI DE LA PRIMERA CADENA DE CDNA	109
IV.8.3 AMPLIFICACIONS D'EXTREMS DE CDNA	111
IV.8.4 ANÀLISI PER SOUTHERN BLOT	114
IV.8.5 CLONATGE I SEQÜENCIACIÓ DELS FRAGMENTS	115
IV.9 EINES BIOINFORMÀTIQUES	115
IV.9.1 DESCRIPCIÓ DE LES BASES DE DADES USADES	115
IV.9.1.1 GeneBank	115
IV.9.1.2 Expressed Sequence Tags Database (dbEST)	116
IV.9.1.3 Unigene	117
IV.9.1.4 Tentative Human Consensus (THC)	118
IV.9.1.5 Tigm Net Sequence Database	118
IV.9.2 EINES INFORMÀTIQUES PER L'ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES	119
IV.9.2.1 Basic Local Alignment Tools (BLAST)	119

IV.9.2.2 CLUSTALW per alineament múltiple de seqüències	120
IV.9.2.3 Eines per l'anàlisi de proteïnes	120
IV.9.3 ALTRES LLOCS WEB D'INTERÈS	122
IV.10 CULTIUS CEL·LULARS	123
IV.10.1 CONDICIONS GENERALS	123
IV.10.2 MEDIS I REACTIUS	123
IV.10.3 TÈCNiques GENERALS	125
IV.10.3.1 Descongelació dels estocs	125
IV.10.3.2 Manteniment del cultiu cel·lular	126
IV.10.3.3 Congelació del cultiu	128
IV.10.3.4 Detecció de micoplasma	129
IV.10.4 LÍNIES CEL·LULARS	129
IV.11 ESTUDIS DE TRANSFECCIÓ CEL·LULAR	130
IV.11.1 MÈTODE DEL FOSFAT CÀLCIC	130
IV.11.2 MÈTODE DE TRANSFECCIÓ AMB EL REACTIU COMERCIAL FUGENE™	133
IV.11.3 GENERACIÓ DE CLONS ESTABLES "ANTISENSE"	134
IV.12 TÈCNiques DE DETECCIÓ DE PROTEÍNES	136
IV.13 MESURES DE CANVIS EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL PER CITOMETRIA DE FLUX	137
IV.14 MARCATGE MITOCONDRIAL DEPENDENT DE POTENCIAL DE MEMBRANA PER MICROSCOPIA DE FLUORESCÈNCIA	139
IV.15 CITOMETRIA DE FLUX	140
IV.16 MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA	141
IV.17 ESTUDIS METABÒLICS	142

IV.17.1 MESURES D'OXIDACIÓ DE GLUCOSA	142
IV.17.2 MESURES D'OXIDACIÓ D'ÀCIDS GRASSOS	145
IV.17.3 MESURES DE CONSUM D'OXIGEN	146
IV.17.3.1 Rentat i preparació dels elèctrodes	146
IV.17.3.2 Mesura de linealitat	147
IV.17.3.3 Mesura del consum d'oxigen amb diferents inhibidors	148
IV.18 ESTUDIS D'ESTEREOLOGIA	151
IV.19 MICROSCOPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ	152
IV.19.1 TEIXITS – ESTUDIS D'ESTEREOLOGIA	153
IV.19.2 CÈL·LULES	153
IV.20 APÈNDIX I. ANTICOSSOS.	154
IV.20.1 ANTICOSSOS PRIMARIS	154
IV.20.2 ANTICOSSOS SECUNDARIS	154
IV.21 APÈNDIX II. REACTIUS GENERALS	156

V RESULTATS**163**

V.1 CLONACIÓ DE GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS EN MÚSCUL ESQUELÈTIC EN CONDICIONS DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA.	165
V.1.1 APLICACIÓ DE LA TÈCNICA DE "DIFFERENTIAL DISPLAY" EN PREPARACIONS D'RNA DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATES JOVES I VELLES.	165
V.1.2 EXPERIMENTS D'HIBRIDACIÓ SOSTRACTIVA A PARTIR D'RNA DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE RATES CONTROL I OBESES	167
V.2 ESTUDIS SOBRE MITOFUSINA-2	173
V.2.1 IDENTIFICACIÓ DEL CDNA COMPLET DE MITOFUSINA-2	173
V.2.2 EXPRESSIÓ DE MITOFUSINA-2 EN RATES OBESES ZUCKER	176
V.2.3 DISTRIBUCIÓ TISSULAR DE MITOFUSINA-2 EN RATA	178
V.2.4 EXPRESSIÓ DE MITOFUSINA-2 EN CÈL·LULES 3T3-L1 I L6E9	179
V.2.5 DISTRIBUCIÓ TISSULAR DE MITOFUSINA-2 EN HUMANS	180
V.2.6 EXPRESSIÓ DE MITOFUSINA-2 EN LA DIABETIS I L'OBESITAT HUMANA	185
V.2.6.1 Expressió de Mitofusina-2 en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos	187
V.2.6.2 Expressió de Mitofusina-2 en pacients diabètics de tipus 2 no obesos	189
V.2.6.3 Expressió de Mitofusina-2 en diabetis de tipus 1	192
V.2.7 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE L'EXPRESSIÓ DE MITOFUSINA-2	193
V.2.8 IDENTIFICACIÓ DEL CDNA DE MITOFUSINA-2 DE RATOLÍ	196
V.2.9 IDENTIFICACIÓ DEL CDNA DE MITOFUSINA-2 DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	198
V.2.10 IDENTIFICACIÓ DEL CDNA DE MITOFUSINA-1 HUMÀ	201
V.2.11 ANÀLISI DE LA SEQÜÈNCIA PROTEICA DE MITOFUSINA-2	204
V.2.12 GENERACIÓ D'UN ANTICÒS CONTRA MITOFUSINA-2	206
V.2.13 LOCALITZACIÓ DE MITOFUSINA-2 EN CÈL·LULES EN CULTIU	207
V.2.14 MORFOLOGIA DE LES MITOCÒNDRIES EN MÚSCUL DE RATES OBESES	209
V.2.15 EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE MITOFUSINA-2 SOBRE LA XARXA MITOCONDRIAL.	210
V.2.16 GENERACIÓ DE CLONS "ANTISENSE" AMB EXPRESSIÓ DE MITOFUSINA-2 DISMINUÏDA.	213
V.2.17 EFECTES DE LA REPRESSIÓ DE MITOFUSINA-2 SOBRE LA XARXA MITOCONDRIAL	215

V.2.18 EFECTES DE LA REPRESSIÓ DE MITOFUSINA-2 SOBRE EL METABOLISME CEL·LULAR	216
V.2.18.1 Efectes de la repressió de Mitofusina-2 sobre l'oxidació de glucosa	216
V.2.18.2 Efectes de la repressió de Mitofusina-2 sobre el "proton leak"	217
V.2.19 LOCALITZACIÓ CROMOSÒMICA DE MITOFUSINA-2	219
V.3 ESTUDIS SOBRE P311/PTZ-17	221
V.3.1 IDENTIFICACIÓ DE P311	221
V.3.2 EXPRESSIÓ DE P311 DURANT L'ENVELLIMENT EN LA RATA	223
V.3.3 EXPRESSIÓ DISMINUÏDA DE P311 EN UN MODEL ANIMAL DE DIABETIS DE TIPUS 2.	225
V.3.4 DISTRIBUCIÓ TISSULAR DE P311 EN LA RATA	226
V.3.5 EXPRESSIÓ DE P311 EN LA DIABETIS I L'OBESITAT HUMANA	227
V.3.5.1 Estudi de l'expressió de P311 en pacients diabètics de tipus 2 no obesos	229
V.3.5.2 Expressió de P311 en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos	231
V.3.5.3 Estudi de l'expressió de P311 en pacients diabètics de tipus 1.	233
V.4 ESTUDIS SOBRE DOR	235
V.4.1 EXPRESSIÓ DE DOR EN DIABETIS DE TIPUS 2 EN LA RATA	235
V.4.2 DISTRIBUCIÓ TISSULAR DE DOR EN LA RATA	236
V.4.3 EXPRESSIÓ DE DOR EN DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS	237
V.4.4 DISTRIBUCIÓ TISSULAR DE DOR EN HUMANS	239
V.4.5 EXPRESSIÓ DE DOR EN LA DIABETIS I L'OBESITAT HUMANA	241
V.4.5.1 Estudi de l'expressió de DOR en pacients diabètics de tipus 2 no obesos	242
V.4.5.2 Expressió de P311 en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos	244
V.4.5.3 Estudi de l'expressió de DOR en pacients diabètics de tipus 1.	246

VI DISCUSSIÓ **249**

VI.1 PAPER DE MITOFUSINA-2 EN LA FISIOPATOLOGIA DE L'OBESITAT 251

VI.2 EXPRESSIÓ DE P311/PTZ-17 EN ENVELLIMENT, OBESITAT I DIABETIS 261

VI.3 EXPRESSIÓ DE DOR EN OBESITAT, DIABETIS I RESPOSTA A INSULINA 266

VII CONCLUSIONS **269**

VIII ABREVIATURES **273**

IX REFERÈNCIES **279**

II Introducció

II.1 L'OBESITAT I LA DIABETIS

Aquesta tesi és el compendi de quatre anys i mig de recerca en el camp de l'obesitat i la diabetis. Aquestes són dues malalties amb alguns trets comuns, però ben diferenciades. La seva fisiopatologia és complexa i avarca un amplí ventall de processos. Òbviament els treballs a que aquesta tesi fan referència se centren en una petita àrea del coneixement relatiu a aquestes dues malalties. Però cal aportar petites peces de coneixement per construir tot el trencaclosques que ens permeti entendre el funcionament dels processos biològics. En aquesta introducció tractarem de fer una ullada al mapa del coneixement que actualment tenim sobre aquestes dues malalties, per entendre on s'insereix i què aporta de nou, la feina que en aquesta tesi es presentarà.

L'obesitat es defineix mèdicament com un estat de pes corporal excessiu, més específicament de teixit adipós, de suficient magnitud com per causar problemes de salut. L'indicador més universalment acceptat per definir el grau d'obesitat és el BMI ("Body Mass Index") o índex de massa corporal. Aquest té en compte l'alçada i el pes i es defineix com a $BMI=w/h^2$ on w és el pes en quilograms i h és l'alçada en metres. Un BMI entre 20-25 es considera normal. Un BMI entre 25-30 es considera sobreprès. D'un BMI entre 30-35, en diem obesitat, i davant un BMI > 35 parlem d'obesitat mòrbida.

En els últims temps ha hagut un increment alarmant en el nombre d'individus obesos a les societats occidentals (Kuczmarski *et al.*, 1994). Prop d'un 30% de la població als Estats Units, és obesa. I la prevalença d'obesitat entre els nens està incrementant notablement, el que fa presagiar un problema mèdic de primera magnitud en les properes dècades (Troiano and Flegal, 1999).

La diabetis, d'altra banda, es defineix com un estat en el qual el metabolisme de lípids i carbohidrats no està ben ajustat per part de la insulina. Aquest fet condueix a uns nivells

II. Introducció

anormalment elevats de glucosa en sèrum durant el dejuni, que en condicions normals es mouen en una estreta franja al voltant d'una concentració de 105 mg/dl. Quan la concentració de glucosa se situa entre 110-140 mg/dl parlem de IGT ("Impaired Glucose Tolerance") o intolerància a la glucosa. Però quan les concentracions de glucosa en sèrum en dejuni estan per sobre de 140 mg/dl, parlem de diabetis. De diabetis n'hi ha fonamentalment de dos tipus. El tipus 1 és dependent d'insulina exògena per sobreviure, i representa entre un 5% i un 10% dels casos totals de diabetis. El tipus 2 té com a principal característica la resistència a la insulina, i representa la gran majoria de casos de diabetis. Existeixen altres tipus de diabetis, com la tipus MODY ("Maturity-Onset Diabetes of the Youth"), més minoritaris.

S'estima que 143 milions de persones pateixen diabetis en el món, i que aquest nombre probablement es duplicarà en trenta anys (Harris *et al.*, 1998). Evidentment estem parlant d'una malaltia amb dimensions d'epidèmia. Només als Estats Units es calcula que hi han 16 milions de persones amb diabetis (prop d'un 5% de la població). Un terç de les quals no estarien diagnosticades. Tot i que la diabetis és una malaltia més prevalent entre les societats industrialitzades, cada cop està més clar que els països en desenvolupament suportaran el gruix de l'epidèmia en el futur. En pacients amb diabetis el risc de patir infart es multiplica per un factor que oscil·la entre 2 i 4, dependent d'altres factors de risc, com ara l'obesitat. La diabetis és la primera causa d'enfermetat renal, ceguesa i amputació d'extremitats. El cost mèdic total atribuït a la diabetis anualment, només als Estats Units, es calcula en 100.000 milions de dòlars. Aquesta dada i la magnitud humana de la tragèdia, posen la diabetis com una prioritat inexcusable en l'esforç de la societat per entendre i tractar la malaltia.

La relació entre obesitat i diabetis de tipus 2 està molt establerta, i sovint els dos grups se solapen, de manera que un 70% dels diabètics de tipus II són obesos. Hi ha una sòlida correlació entre la quantitat de greix intrabdominal i la sensibilitat a insulina (Banerji *et al.*, 1995) i importants evidències que suporten la idea de que l'acumulació de greix, especialment abdominal, predisposa a la diabetis. L'alliberament excessiu d'àcids grassos no esterificats (NEFA) a la sang provoca

resistència a la insulina en teixits perifèrics i impedeix la correcta secreció d'insulina al pàncreas. Igualment altres molècules secretades pel teixit adipós podrien jugar un paper important en el desenvolupament de la diabetis. Les dues malalties presenten en comú la resistència a la insulina, i una sèrie de factors de riscos associats, com hipertensió, dislipidèmia, microalbuminúria... etc. Segons la OMS es defineix com a síndrome metabòlica (o síndrome de resistència a la insulina), la conjunció de resistència a la insulina, unida a dos d'aquests quatre factors de risc: hipertensió, obesitat, dislipidèmia o microalbuminúria. D'acord amb aquesta definició, un 10 % de la població amb tolerància normal a la glucosa pateix síndrome metabòlica. Aquesta franja de població té 3 vegades més risc de patir malaltia coronària o infart de miocardi, que la població normal.

II.2 FISIOPATOLOGIA

Tot i la clara interrelació entre obesitat i diabetis de tipus 2, en aquesta secció les tractarem per separat per fer més aclaridora l'exposició. D'una banda repassarem els mecanismes coneguts implicats en el manteniment del pes corporal, i per tant lligats directament a l'obesitat. D'altra banda repassarem els mecanismes implicats en l'homeostasi de la glucosa, i per tant més directament implicats en diabetis.

II.2.1 Obesitat

Per entendre l'obesitat hem d'entendre el concepte de balanç energètic. Assumint que un individu no té problema amb l'absorció de nutrients, s'acumularà energia en forma de greix, només quan l'entrada d'energia (ingesta) superi la despesa energètica total. La ingesta depèn de la

II. Introducció

facilitat a la que l'individu té accés a l'aliment i de les senyals cerebrals que l'indueixen a menjar o a deixar de fer-ho. La despesa metabòlica serà la suma de l'activitat física, del metabolisme basal i de la termogènesi adaptativa. Com a activitat física entenem tots els moviments voluntaris; com a metabolisme basal, tots els processos necessaris per sustentar la vida, en estat de repòs; termogènesi adaptativa és el conjunt de processos que dissipen energia en forma de calor en resposta a canvis en l'entorn (temperatura, dieta...). No es fàcil separar clarament els processos que contribueixen al manteniment de la vida, d'aquells processos conduents a la dissipació d'energia en forma de calor, i sovint caldrà considerar-los alhora. L'accessibilitat de l'individu a l'aliment, i els nivells d'activitat física són variables que entren dins l'àmbit d'estudi de la sociologia, i que no tractarem aquí. Repassarem el que sabem sobre el control de la ingesta per part del sistema nerviós central (SNC), i sobre el control de la taxa metabòlica basal i la termogènesi adaptativa.

II.2.1.1 Control de la ingesta

El sistema nerviós central actua en el control del pes corporal a diferents nivells. És el responsable del comportament, pel que fa a la ingesta i a l'activitat física. A més, és el controlador de l'activitat del sistema nerviós autònom, simpàtic i parasimpàtic, que regulen la despesa energètica. Per últim, el sistema nerviós central és també un òrgan endocrí, que allibera hormones al torrent sanguini, que actuen de senyals en els teixits perifèrics, per controlar múltiples aspectes del metabolisme, en molts casos activant o inhibint la secreció d'altres hormones. L'hormona del creixement, la insulina, hormones tiroïdals, corticoesteroides...etc. estan sota el control directe o indirecte del SNC.

Molts factors psicològics i socials influeixen el comportament alimentari dels individus. Molts d'ells són difícils d'entendre i no entren en absolut en el camp de les ciències biomèdiques. Tot i així, cada vegada entenem millor quines són les bases moleculars del control de la ingesta a curt i llarg termini. A curt termini, dues sensacions determinen la quantitat de menjar que ingerim en cada àpat. La gana, que dóna la senyal d'iniciació, i la sacietat, que dóna la senyal de terminació. La sacietat ve immediatament regulada per la quantitat de menjar ingerit, com a resposta del SNC a factors endocrins. Per exemple la secreció de colecistoquinina per part de l'intestí que ocorre durant la ingestió de menjar (Moran, 2000). Però no és aquest l'únic punt de control de la sacietat, ja que controla la quantitat d'ingestió a cada àpat, però no la quantitat d'àpats. Existeixen senyals a llarg termini, per controlar la ingesta, que tenen a veure amb la quantitat de reserves d'energia de que disposa l'organisme. Com la coneguda leptina, de la que parlarem àmpliament. Secretada pel teixit adipós, reflexa la quantitat de reserves de greix de que disposa l'individu.

El descobriment de la leptina representà probablement el tret de sortida de la carrera per entendre els processos que controlen el manteniment del pes corporal. Als anys setanta la generació dels models monogènics d'obesitat *ob/ob* i *db/db* en ratolins i l'homòleg d'aquest darrer en la rata Zucker *fa/fa* van donar eines per avançar en aquesta direcció. Aquests ratolins esdevenen obesos quan s'els permet menjar *ad libitum* una dieta rica en greixos. Històrics experiments de parabiosi en que un ratolí obès i un normal eren connectats pel seu sistema circulatori, permeteren intuir que al ratolí *ob/ob* li mancava una molècula circulant que donava sensació de sacietat. El ratolí *ob/ob* quan era "connectat" al ratolí normal, rebia d'aquest una senyal que el feia menjar menys de la dieta rica en greixos, i per tant mantenir un pes normal. Tot seguit es va intuir que al ratolí *db/db* li mancava probablement el receptor d'aquesta molècula. Als anys noranta s'identificaren els gens de la leptina (Zhang *et al.*, 1994) i del seu receptor (Chen *et al.*, 1996). Es provava igualment que la leptina era una molècula secretada pel teixit adipós i que exercia la seva funció al SNC a través del seu receptor. Era la primera vegada que es parlava de l'existència d'un "diàleg" entre el sistema nerviós i els dipòsits de reserves energètiques, per tal de mantenir aquests constantment ajustats. Ara sabem que l'absència de senyal de leptina, per la raó

II. Introducció

que sigui, en presència de suficients quantitats de greix, condueix a obesitat, tant en rosegadors com en humans, provocant en el SNC la percepció permanent de dejuni i de gana. També sabem que a part de la seva acció en el SNC la leptina té altres efectes en teixits perifèrics, que encara estan poc estudiats.

És a l'hipotàlam, on la leptina fa la seva acció de "missatgera de sacietat". Ací actua a través del seu receptor, sobre dues poblacions diferents de neurones: una població expressa dos pèptids orexigènics (inductors de la gana) que són NPY ("neuropeptide Y"), i AgRP ("agouti related peptide"); la segona població expressa dos pèptids anorexigènics (inhibidors de la gana) que són CART ("cocaine and amphetamine related transcript"), i α -MSH ("melanocyte stimulating hormone"), aquest últim derivat de la POMC (pro-opiomelanocortina). La leptina inhibeix l'expressió dels pèptids orexigènics de la primera població i indueix l'expressió dels pèptids anorexigènics de la segona població. (Elias *et al.*, 1999; Elmquist *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). AgRP i α -MSH són lligands del mateix receptor en una tercera població neuronal: el receptor de melanocortina MC4R. α -MSH activa la senyal d'aquest receptor, mentre que AgRP la inhibeix. L'activació de la senyal de MC4R condueix a sacietat.

Com acostuma a passar, l'avanç en el coneixement va desvetllant noves preguntes, i ara queda oberta la qüestió de com aquestes senyals de la via de la melanocortina produeixen efectes en la sensació de gana, la despesa energètica o la funció neuroendocrina. Igualment hi han evidències de que no són aquests els únics efectes de la leptina sobre el SNC i de que la leptina no és l'únic efector que incideix en el SNC pel control de la gana. Probablement hi han un conjunt de mecanismes que operen en concert per controlar la ingesta. Per exemple, ha estat descrita la participació d'altres neurotransmissors com són CRH, GHRH, i galanina en la regulació d'aquests processos. Igualment altres hormones, com la ghrelina, secretada per l'estómac i pel cervell, que s'ha vist que provoca hiperfagia i obesitat a través d'accions en el cervell (Tschop *et al.*, 2000). Fins i tot metabòlits del metabolisme lipídic podrien actuar com a sensors metabòlics. Així ho suggereix la recent observació de que inhibidors de la sintasa d'àcids grassos inhibeixen poderosament la

ingesta a través d'accions en el cervell (Loftus *et al.*, 2000). La insulina per part seva, a part de regular l'expressió de la leptina en el teixit adipós, juga també un paper en el control del manteniment del pes corporal en el SNC. Així, el "knock-out" específic de cervell del seu receptor, provoca també obesitat (Bruning *et al.*, 2000).

Tot i el paper central de la leptina en la regulació de la quantitat de reserves energètiques, no és la manca d'aquesta proteïna la causa d'obesitat en la majoria dels casos. Ans al contrari, els subjectes obesos no estan normalment mancats d'ella, sinó que en disposen a nivells anormalment elevats. Sembla, doncs que es dona una situació de "resistència a la leptina", que podria ser deguda, entre d'altres, a la dificultat de la proteïna per travessar la barrera hematoencefàlica. Així ho suggereixen diversos experiments que demostren que la leptina injectada directament al cervell té un efecte inhibitor de la ingesta molt més potent que la leptina administrada per altres vies (El-Haschimi *et al.*, 2000). Igualment, la resistència a la senyal de leptina causada per problemes més enllà del seu receptor, és perfectament plausible.

II.2.1.2 Control de la taxa metabòlica basal i de la termogènesi

El treball en aquesta àrea s'ha centrat sobretot en dos aspectes. El control del circuit neural sobre la termogènesi i el metabolisme basal, i la regulació de la termogènesi en teixits perifèrics, que al final són els que oxiden els substrats.

D'entrada cal dir que els processos que permeten el control del SNC sobre la despesa energètica i sobre la ingesta estan íntimament relacionats. Per exemple l'administració exògena de leptina a ratolins deficients en leptina, redueix la ingesta d'aquests ratolins, però també incrementa la seva despesa energètica, en relació al que esperaríem per la seva ingesta (Friedman and Halaas, 1998). L'increment de la termogènesi en teixit adipós marró i en múscul esquelètic derivat

II. Introducció

de senyals cerebrals és exercit mitjançant el sistema nerviós simpàtic, a través de receptors β adrenèrgics β -AR's i cAMP (AMP cíclic) (Corbett *et al.*, 1983, Savontaus *et al.*, 1998). La infusió de catecolamines al múscul provoca un increment de la despesa energètica sense la generació de treball (Simonsen *et al.*, 1992).

Quan parlem de despesa metabòlica i termogènesi, en teixits perifèrics, hem de pensar sobretot en aquells teixits que per activitat intrínseca i per volum, suportin més pes en la regulació global del metabolisme. Així, en humans, el teixit muscular s'erigeix com el principal protagonista. Malgrat tot, els estudis en rosegadors s'han centrat molt en el teixit adipós marró, ja que en rata i ratolí és el principal responsable de la termogènesi adaptativa. Tant si parlem de múscul, com de teixit adipós marró, són les mitocòndries, molt abundants en aquests dos teixits, les responsables últimes de l'oxidació de substrats, i per tant de la despesa energètica i de la termogènesi. La mitocòndria és el compartiment cel·lular on els substrats (derivats d'àcids grassos i de glucosa) són oxidats, i l'energia resultant és canalitzada cap a la síntesi d'ATP, o alliberada en forma de calor. Com indica la figura, a mesura que els electrons alliberats de l'oxidació dels substrats van passant a través de la cadena respiratòria, es van bombejant protons de dins a fora de la mitocòndria. D'aquesta manera es va generant un gradient electroquímic de protons a través de la membrana mitocondrial interna. Aquests protons acumulats a l'exterior de la mitocòndria tenen dos destins possibles. Un d'ells és que tornin a entrar a la mitocòndria a través de la ATP sintasa, forçant la síntesi d'ATP. D'aquesta manera la síntesi d'ATP està acoblada al trànsit d'electrons per la cadena respiratòria, i en últim terme al consum d'oxigen. És la "respiració acoblada". L'altra possibilitat és que els protons concentrats a l'exterior, tornin a travessar la membrana mitocondrial externa per vies alternatives a l'ATP sintasa, d'aquesta manera es perd el gradient de protons sense produir energia. D'això en diem "proton leak", (o pèrdua de protons). En aquest cas, l'activitat de la cadena respiratòria, i per tant el consum d'oxigen, no estan acoblats a la síntesi d'ATP i en diem "respiració desacoblada". L'oxidació de substrats i el trànsit d'electrons per la cadena respiratòria produeixen calor, però en el cas de la respiració desacoblada aquesta generació de calor serà independent de la producció de treball. És per això que la regulació de la termogènesi vindrà donada per la

capacitat d'incrementar o disminuir a conveniència aquest "proton leak". Es calcula que el "proton leak" és el responsable de prop del 20% del consum d'oxigen total en cèl·lules, teixits i organismes sencers (Brand *et al.*,2000; Rolfe *et al.*, 1996,1999). Una certa pèrdua de gradient de protons és inherent a totes les biomembranes, que no són absolutament impermeables als protons. Però aquesta permeabilitat pot ser accentuada per les proteïnes desacobladores UCP's, o per altres mecanismes no descrits encara.

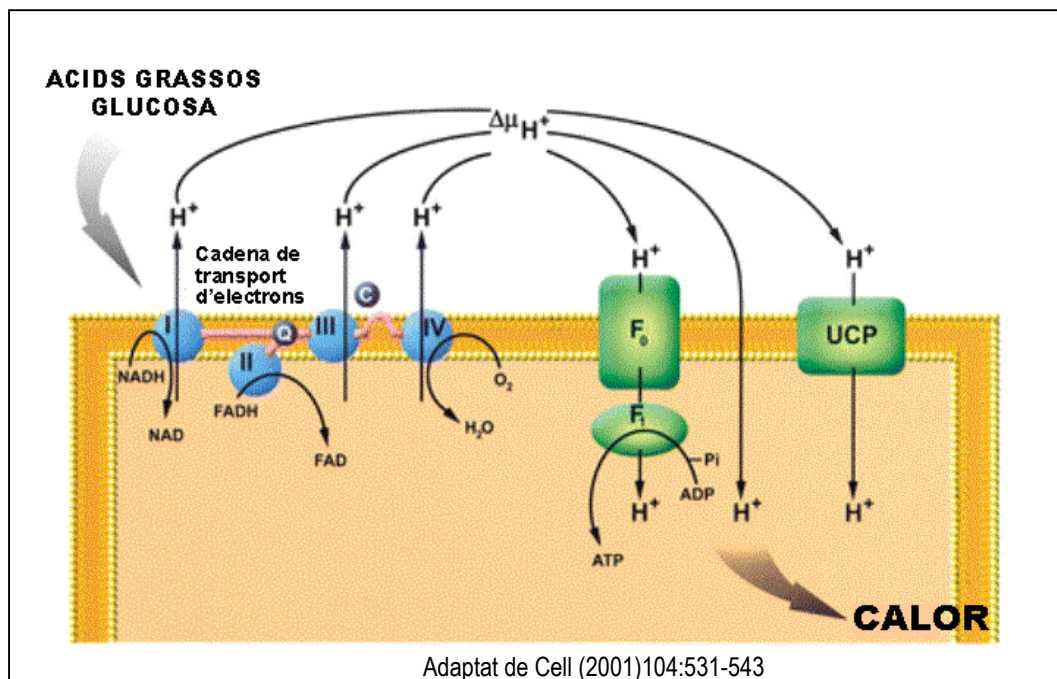


Figura 1. Síntesi d'ATP i termogènesi a partir del transport de protons. Els substrats són oxidats per generar NADH i FADH₂, els quals donen electrons a la cadena de transport d'electrons, que acaben reduïnt l'oxigen molecular (O₂). Durant el transport d'electrons els protons es van bombejant cap a l'exterior de la mitocondria creant un gradient electroquímico de protons. Els electrons poden reentrar a la mitocondria a través de la F₀F₁-ATPasa, de manera que l'energia alliberada per la dissipació de gradient s'empri en sintetitzar ATP; o bé poden reentrar a través de les proteïnes desacobladores (UCP), o de la mateixa membrana, de manera que l'energia s'allibera en forma de calor.

De fet, l'activitat desacobladora de les UCP's és objecte de polèmica i els resultats obtinguts fins ara són molt controvertits. UCP-1 fou la primera proteïna d'aquesta família en ser descoberta. Expressada fonamentalment a teixit adipós marró s'ha postulat que actua com a

II. Introducció

transportador de protons des del citosol cap a l'interior de la matriu mitocondrial, permetent així la pèrdua de gradient, incrementant la respiració desacoblada, i generant calor. Així doncs, els ratolins deficients en UCP-1 són extremadament sensibles al fred. Pel contrari, mentre que l'ablació genètica del teixit adipós marró condueix al ratolí a l'obesitat, els ratolins deficients en UCP-1 no tendeixen a guanyar pes (Lowell and Flier, 1997). Per tant, altres mecanismes actuen en el control de la taxa metabòlica en el propi teixit adipós marró.

En els últims anys s'han identificat dos altres membres de la família: UCP-2 expressada en molt teixits i UCP-3, expressada sobretot a múscul i teixit adipós marró. Aquest fet ha aixecat moltes esperances de que aquestes dos proteïnes podrien explicar la regulació de la despesa energètica corporal en altres teixits, a part del teixit adipós marró. Recordem que per a mamífers grans, com l'home, el teixit adipós marró representa una part insignificant de la taxa metabòlica total. Ambdues són capaces d'incrementar la taxa de respiració desacoblada quan són sobreexpressades en cultius cel·lular, i la sobreexpressió en ratolins d'UCP-3 en múscul esquelètic és capaç de protegir contra l'obesitat (Clapham *et al.*, 2000). En rates exposades al fred, situació en la que es dona un increment en la termogènesi, l'expressió del mRNA d'UCP-3 incrementa, tant en múscul esquelètic com en teixit adipós marró. Sorprenentment, però, el dejuni, que és un estat metabòlic típicament associat a una reducció en la despesa energètica total, provoca un increment en les quantitats d'mRNA d'UCP-2 i també d'UCP-3 (Boss *et al.*, 2000). Per acabar-ho de complicar, en rates tractades amb agonistes dels receptors β -adrenèrgics, que incrementen la taxa metabòlica, l'expressió d'UCP-3 incrementa en múscul i disminueix en teixit adipós marró (Emilsson *et al.*, 1998, Boss *et al.*, 1999). Recentment s'han generat ratolins deficients en UCP-2 i UCP-3 i cap dels dos models ha presentat tendència a l'obesitat, baixa despesa energètica basal, o sensibilitat al fred (Arsenijevic *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2000; Vidal-Puig *et al.*, 2000). De totes aquestes dades es conclou que cap de les UCP en solitari pot ser l'única responsable dels efectes anti-obesitat que se li suposen a la família.

La immensa majoria d'aquests estudis s'han fet en rosegadors, que són mamífers petits, amb una gran relació superfície-volum, i per tant molt exposats a canvis en la temperatura exterior. Per mantenir l'homeotèrmia disposen de mecanismes específics, com ara una gran porció de teixit adipós marró, que no són compartits per mamífers de mida més gran. Així, per exemple la importància cabdal que té el teixit adipós marró en el metabolisme de la rata i el ratolí, es converteix en insignificant quan parlem de l'organisme humà. De la mateixa manera pot ser que en organismes grans, com l'home, amb una petita relació superfície-volum, mecanismes específics de termogènesi com les UCP's no siguin tan importants. Per contra podria ser que fossin capaços de treure profit de les inherents propietats de les membranes biològiques per regular la producció de calor i la termogènesi. És possible que la termogènesi adaptativa sigui controlada, en gran manera, per la regulació de la biogènesi mitocondrial o per la regulació de les taxes de transport d'electrons a través de la cadena respiratòria. Un transport d'electrons incrementat conduiria a un major potencial de membrana mitocondrial, ja que més protons serien bombejats enfora. És ben conegut que un increment en el potencial de membrana, per si sol, ja provoca un increment en el "proton leak" i en la respiració desacoblada, també en absència de proteïnes desacoblants, UCP's (Brand *et al.*, 1999). Serà doncs, de gran interès, en el futur, estudiar com es regula la taxa de transport d'electrons a través de la cadena respiratòria.

D'altra banda és conegut que la membrana mitocondrial interna, per si sola, independentment d'UCP's, ja presenta un cert "proton leak". Les taxes d'aquest "proton leak" "basal" depenen de la superfície de la membrana mitocondrial interna i de la composició d'àcids grassos dels seus fosfolípids (Brand *et al.*, 1994, 1991; Porter *et al.*, 1996). L'estudi de la regulació de la biogènesi i la morfologia mitocondrial aportarà més llum sobre com aquests processos regulen la despesa energètica i la termogènesi adaptativa.

II. Introducció

II.2.2 Diabetis tipus 2

L'estrict control de la glucèmia és fonamental pel bon funcionament dels teixits. Un dèficit de glucosa és incompatible amb la vida, i un estat de hiperglucèmia provoca danys greus en l'organisme. El balanç entre la producció i la despesa de glucosa és manté en equilibri per l'acció oposada i combinada de dues hormones fonamentalment: insulina i glucagó. En resposta a una elevació dels nivells de glucosa en sang, la insulina és secretada per les cèl·lules beta del pàncreas. La glucosa és transportada a l'interior de la cèl·lula beta via el transportador de glucosa GLUT2, de baixa afinitat, la qual cosa permet que la quantitat de glucosa que entra a la cèl·lula sigui dependent, i un fidel reflex, de la quantitat de glucosa al medi extracel·lular. La cèl·lula β conté una glucoquinasa específica de baixa afinitat, no inhibible per producte, que ajusta la seva activitat a una àmplia gamma de concentracions de glucosa entrants. Després de fosforilar-se la glucosa s'oxida i es genera ATP. Un increment a la relació ATP/ADP provoca el tancament de canals de potassi a la cèl·lula β i per tant la cèl·lula es despolaritza. La despolarització provoca l'obertura de canals de calci sensibles a voltatge, i d'aquí l'increment de la concentració de calci en el citosol. Aquesta és la senyal que provoca la fusió de les vesícules que contenen la insulina amb la membrana plasmàtica i l'alliberament de la insulina al medi. Per contra a tots aquests processos, quan la concentració de glucosa en plasma decau, les cèl·lules α del pàncreas alliberen glucagó. El glucagó, actuant sobre els teixits perifèrics provoca l'alliberament de glucosa emmagatzemada en forma de glucògen i la producció de glucosa *de novo*, la gluconeogènesi.

Els principals teixits diana de la insulina són el múscul esquelètic i cardíac, el fetge, i el teixit adipós. Es calcula que el múscul és responsable d'un 70 % del consum de glucosa en condicions absorptives. El pas limitant d'aquest consum, és la captació del substrat, que té lloc per un procés que requereix d'unes proteïnes anomenades transportadors de glucosa. La insulina promou el transport de glucosa en múscul i en adipòcits incrementant la concentració del transportador de glucosa GLUT4 en la superfície de la cèl·lula. Quan la glucosa entra a la cèl·lula

és fosforilada i a continuació pot ser emmagatzemada en forma de glucògen, o bé oxidada per a la generació d'ATP. En adipòcits la glucosa pot ser emmagatzemada en forma de lípids. La insulina també inhibeix la lipòlisi en adipòcits, i la gluconeogènesi al fetge. La insulina modifica l'activitat de múltiples enzims per dur a terme aquests efectes., i ho fa a curt termini, gairebé sempre per canvis en l'estat de fosforilació dels enzims, i a llarg termini, per canvis en els nivells d'expressió d'aquests enzims. Per la seva part el glucagó reverteix molts dels efectes de la insulina utilitzant mecanismes similars.

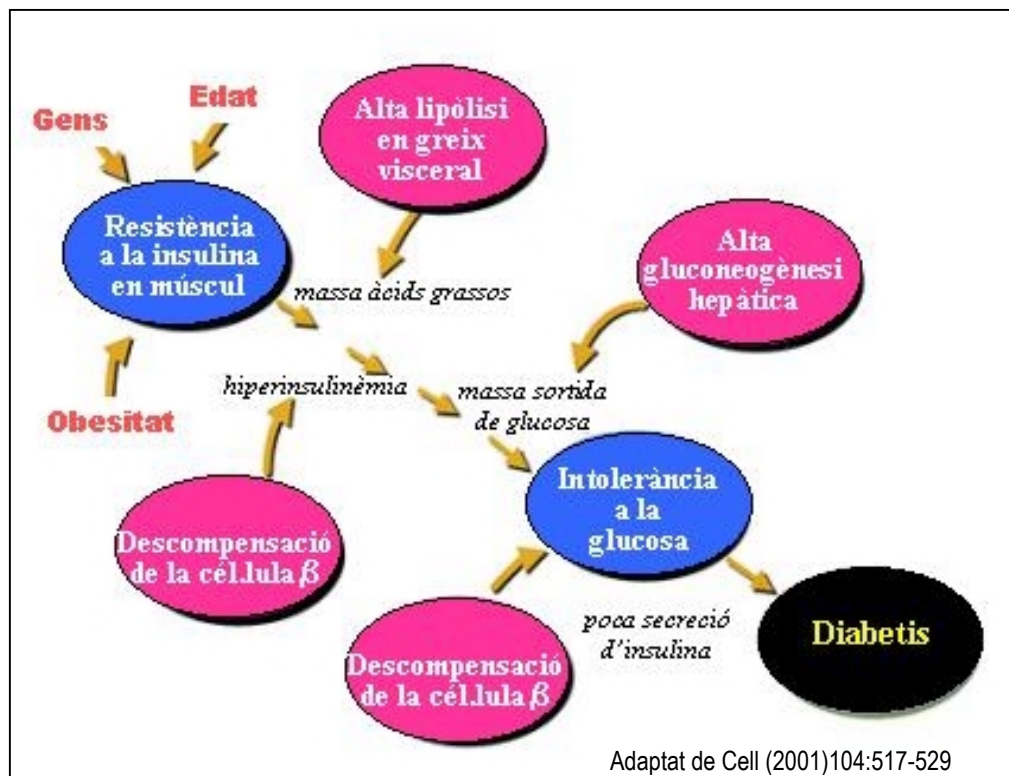


Figura 2. Evolució metabòlica de la diabetes de tipus 2. La diabetes de tipus 2 es caracteritza per una caiguda progressiva en l'acció de la insulina, seguida d'una incapacitat de la cèl.lula β per compensar la resistència a la insulina. La resistència a la insulina és la primera lesió, produïda per interaccions entre diversos gens, l'edat, i els canvis metabòlics produïts per l'obesitat. La resistència a la insulina en el greix visceral provoca un increment en l'alliberament d'àcids grassos, el qual incrementa la resistència a insulina en fetge i múscul. La cèl.lula β compensa la resistència a la insulina incrementant la secreció d'insulina, fins que al final, es mostra incapaç, conduint a una disminució de la tolerància a la glucosa, i diabetes.

II. Introducció

Un gran volum d'estudis fent servir tècniques de mesura de sensibilitat a insulina, com el "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic i altres, han definit clarament que la progressió d'un estat de tolerància normal a la glucosa, cap a un d'intolerància a la glucosa, va sempre acompanyat del desenvolupament de resistència a la insulina, mentre que la secreció d'insulina en resposta a glucosa es veu incrementada, indicant que la resistència a la insulina en teixits perifèrics, especialment múscul, és un fet primerenc en la fisiopatologia de la diabetis de tipus 2 (revisat en De Fronzo, 1997). La resistència a la insulina es manifesta en diferents teixits. En individus amb diabetis de tipus 2 amb hiperglucèmia en dejuni, el factor més important en el manteniment de l'elevada concentració de glucosa en dejuni és una excessiva taxa de gluconeogènesi hepàtica (De Fronzo, 1997). També en certs dipòsits de greix, especialment en el greix abdominal la resistència als efectes antilipolítics de la insulina provoca un increment en la lipòlisi i un excessiu alliberament d'àcids grassos. Aquests àcids grassos atenuen encara més la capacitat de la insulina d'inhibir la gluconeogènesi hepàtica. Durant un clamp euglucèmic hiperinsulinèmic, on la gluconeogènesi hepàtica resta totalment inhibida, tant en individus control com en individus diabètics, el múscul és el responsable d'un 75 % de la incorporació total de glucosa en resposta a insulina en individus control. Aquesta incorporació de glucosa en resposta a insulina en múscul esquelètic està reduïda un 50 % en individus amb diabetis de tipus 2 (De Fronzo, 1997).

En els estadis inicials de la malaltia la cèl·lula β normalment és capaç de compensar l'estat de resistència a la insulina incrementant la secreció d'insulina basal i postprandial. De manera que l'individu és resistent a la insulina però manté una glucèmia normal en dejuni. Molts individus en aquest estat es mantenen no diagnosticats. En algun moment la cèl·lula β no és capaç de mantenir les altes taxes de secreció d'insulina necessàries. En aquest punt es trenca l'homeostasi de la glucosa i del metabolisme lipídic i es desenvolupa intolerància a la glucosa (hiperglucèmia lleu). El 5-10 % dels pacients intolerants a la glucosa entren cada any en franca diabetis. En aquestes condicions la gluconeogènesi hepàtica no es regula adequadament, la glucèmia incrementa molt i el teixit adipós i el fetge alliberen grans quantitats d'àcids grassos. La hiperglucèmia *per se* accentua la resistència a la insulina en teixits perifèrics, i la incapacitat d'incorporar glucosa. Mentre

que la hiperlipidèmia disminueix encara més la capacitat de resposta de la cèl·lula β als alts nivells de glucosa. S'entra en les últimes fases de la malaltia i es fa necessària l'administració d'insulina exògena a part de fàrmacs sensibilitzadors a l'acció de la insulina (sulfonilurees, biguanides, tiazolidinadiones...).

Per entendre la resistència a la insulina cal entendre com funciona la insulina en els teixits perifèrics. Quan la insulina es lliga al seu receptor, aquest es fosforila en residus de tirosina, incrementant la seva pròpia activitat quinasa cap a molècules unides a la part citosòlica del receptor. Aquest és l'inici d'una cascada de fosforilacions en altres molècules com la família de substrats del receptor d'insulina (IRS1/2/3/4), la proteïna adaptadora Shc, Gab-1 i Cbl. La fosforilació en aquestes molècules crea llocs de reconeixement per altres proteïnes efectores secundàries que s'uneixen a motius SH2. A IRS-1 s'unirà la subunitat p85 de PI-3-quinasa. Aquesta, una vegada activada genera fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfat PIP₃. Aquest lípid activa la proteïna quinasa PDK, que fosforila i activa les proteïnes quinasa Akt (PKB) i les isoformes PKC ζ i PKC λ . L'activació de PI-3-quinasa és necessària per activar el transport de glucosa en resposta a insulina, però no suficient. Una via independent de PI-3-quinasa sembla que implica a Cbl (Ribon and Saltiel, 1997) i a la proteïna adaptadora CAP que se li uneix (Baumann *et al.*, 2000). S'ha suggerit que aquesta via funciona en paral·lel amb la via dependent de PI-3-quinasa per activar la translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica (Chiang *et al.*, 2001).

La translocació de GLUT4 a la membrana plasmàtica des de les seves vesícules intracel·lulars, és un pas clau en l'activació del transport de glucosa en resposta a insulina, i sabem que aquest transport està disminuït en situacions de resistència a la insulina (Shulman, 2000), però no estan clars encara quins són els mecanismes que condueixen a la translocació de les vesícules que contenen GLUT4, cap a la membrana plasmàtica. Sabem que la insulina incrementa la exocitosi i disminueix la endocitosi de GLUT4, que va contínuament reciclant entre la membrana plasmàtica i vesícules intracel·lulars. La interacció entre proteïnes v-SNARE a les vesícules (VAMP2) i proteïnes t-SNARE a la membrana (Syntaxina4), és important pel contacte i fusió entre

II. Introducció

la vesícula que conté GLUT4 i la membrana plasmàtica (Pessin *et al.*, 1999), però no està clar si cap d'aquestes proteïnes està sota control directe de la cascada de senyalització de la insulina.

A part del defecte primari en el transport de glucosa, l'acumulació de glucògen està disminuïda en diabetis de tipus 2 i en els seus familiars de primer grau normoglicèmics i és un dels primers efectes observables en la fisiopatologia de la malaltia (De Fronzo, 1997). En condicions normals la insulina activa la glucògen sintasa promovent la seva desfosforilació, inhibint les quinases PKA i GSK3 (Cross *et al.*, 1995) i activant la fosfatasa PP1 (Brady *et al.*, 1997).

Com ja hem apuntat abans, en la fisiopatologia de la diabetis de tipus 2, té un paper rellevant l'estat d'obesitat. Sabem que el teixit adipós no és només un dipòsit de greix, sinó que actua com a òrgan endocrí secretant un nombre important de factors circulants com la leptina, $TNF\alpha$, angiotensina, PAI-1, a part d'una gran quantitat d'àcids grassos no esterificats (NEFA) (Kahn and Flier, 2000). Sabem que la leptina millora la sensibilitat a insulina, independentment de la ingesta (Halaas *et al.*, 1995; Shimomura *et al.*, 1999b). El $TNF\alpha$ provoca resistència a la insulina, inhibint la fosforilació d'IRS-1 i l'activació de PI-3-quinasa (Hostamisigil *et al.*, 1993, 1995, 1996, 1999). Els àcids grassos circulants disminueixen la utilització de glucosa (Roden *et al.*, 1996), i ho fan interferint la senyal de la insulina per inhibició de la fosforilació del seu receptor i de la unió d'IRS-1 (Dresner *et al.*, 1999) i disminuint la síntesi de glucògen i l'oxidació de glucosa (Petersen *et al.*, 1998). Al fetge els NEFA poden estimular la gluconeogènesi incrementant l'expressió de subunitats del sistema de glucosa-6-fosfatasa (Rebrin *et al.*, 1996). Hi ha, per tant, múltiples mecanismes pels quals el fenotip obès condueix a un agreujament de la resistència a la insulina i la progressió cap a diabetis. Recentment s'ha identificat la proteïna resistina, secretada pel teixit adipós, i que sembla actuar com un regulador negatiu de l'acció de la insulina. La seva expressió s'inhibeix després de l'activació de PPAR γ , diana dels fàrmacs sensibilitzadors a insulina tiazolidinadiones (Steppan *et al.*, 2001). També molt recent ha estat la identificació de la proteïna Acrp30, que també és una proteïna circulant sintetitzada pel teixit adipós, i que en alts nivells és

capaç d'abolir la hiperglucèmia en diferents models de ratolins diabètics. Aquesta proteïna sembla que actua incrementant la sensibilitat a la insulina en hepatòcits (Berg *et al.*, 2001).

Malgrat tot, la diabetis no es desencadena obertament fins que la cèl·lula β falla en la seva capacitat a compensar la resistència a la insulina. En la rata Zucker, model monogènic d'obesitat, la hiperinsulinèmia permanent provocada per la cèl·lula β és capaç de compensar la resistència a la insulina sense desenvolupar mai hiperglucèmia (Tokuyama *et al.*, 1995). En canvi en la línia derivada ZDF ("Zucker Diabetic Fatty") això no passa. Aquesta rata és igualment obesa pel mateix defecte que l'anterior: una mutació en el receptor de la leptina, i també és resistent a la insulina però progressa a diabetis per una elevada taxa d'apoptosi en la cèl·lula β (Pick *et al.*, 1998). De fet, recentment, s'ha posat de manifest com la resistència de la pròpia cèl·lula β a la insulina és determinant en la incapacitació d'aquest teixit per secretar insulina adequadament en resposta a nivells de glucosa en plasma. Així, el knock-out d'IRS-2, proteïna clau en la senyalització d'insulina en la cèl·lula β , desenvolupa diabetis de tipus 2 (Withers *et al.*, 1998). D'altra banda, la exposició prolongada de la cèl·lula β a l'acció d'àcids grassos no esterificats redueix la secreció d'insulina i evita la compensació de la resistència a la insulina a la rata Zucker (Carpentier *et al.* 1999). S'ha proposat que l'acumulació de triglicèrids a la cèl·lula β causa estrès oxidatiu i apoptosi via increment en els nivells d'òxid nítric, (Shimabukuro *et al.*, 1997; Unger *et al.* 1999).

II.3 GENÈTICA

El pes corporal i l'emmagatzematge d'energia al teixit adipós en forma de triglicèrids estan determinats per la interacció entre genètica i entorn. En aquest darrer terme inclourem no només la facilitat de disposar d'aliments i el tipus d'aliments, sinó també fenòmens psicosocials que determinen els hàbits alimentaris i l'activitat física dels individus. De fet, canvis en aquests diferents

II. Introducció

aspectes de l'entorn són els responsables de l'increment espectacular en la prevalència d'obesitat i diabetis en el món, particularment en les societats més industrialitzades. Pel que fa al pes corporal és molt probable que la capacitat d'emmagatzemar greix en períodes d'abundància nutricional, per poder-ne disposar en temps llargs de dejuni, fóra un tret avantatjós que s'ha seleccionat positivament durant molts anys d'evolució humana. D'això s'en diu hipòtesi dels "thrifty genes" (o "gens estalviadors" (Neel, 1999). Quan el genotip de "gens estalviadors" resultat d'anys d'evolució en un entorn de incertesa nutricional, ha estat exposat a l'abundància alimentària de les societats industrialitzades actuals, ha deixat de ser avantatjós, i ha començat a donar problemes. Aquests gens són els que predisposen, en condicions en que l'entorn ho permet, al guany de pes corporal, i en últim terme a l'obesitat. Aquests gens esperaríem que fossin importants en el control de la lipòlisi, l'oxidació de substrats, i el metabolisme de glucosa en múscul, entre altres processos.

Tant si parlem d'obesitat, com de diabetis tipus 2, com de síndrome metabòlica, hi trobarem un fort component heretable. En el cas de l'obesitat, per exemple, prop d'un 40% de la variació de pes corporal s'atribueix a factors genètics (Bouchard *et al.*, 1988, 1996). En estudis sobre bessons univitelins, amb dieta controlada, es veié com havien grans diferències en la quantitat de calories que eren emmagatzemades com a greix entre diferents parelles de bessons, però la tendència a acumular greix entre germans bessons era molt similar (Bouchard *et al.*, 1990). Pel que fa a la relació entre obesitat i diabetis es constata que els familiars de primer grau de pacients diabètics tenen una relació cintura-cadera molt més elevada que les seves parelles sense història familiar de diabetis (Groop *et al.*, 1996). La heretabilitat és també elevada quan només ens fixem en el fenotip diabètic. Per exemple, el 45 % de familiars de primer grau de pacients amb diabetis de tipus 2 són resistents a insulina, en contrast amb el 20 % de la població sense història familiar de diabetis (Beck-Nielsen and Groop, 1994, Groop *et al.*, 1996, Groop and Tuomi, 1997). També un gran nombre d'estudis en bessons univitelins demostren un alt component genètic de la diabetis. En el cas de la resistència a la insulina, aquest component heretable oscil·la entre el 50% i el 75% segons els estudis.

Donat el gran nombre de gens que tenen a veure amb el manteniment del pes corporal i amb el manteniment de la homeostasi de la glucosa, i donat el coneixement que mica en mica anem adquirint sobre aquests processos, molts grups de recerca s'han llençat a estudiar possibles gens candidats. El denominador comú d'aquests estudis ha estat intentar associar característiques del fenotip metabòlic amb algunes mutacions o polimorfismes en aquests gens.

II.3.1 Estudi de gens candidats

II.3.1.1 Leptina i receptor de leptina

Ja hem parlat abans de la importància que va tenir la generació dels models monogènics d'obesitat *ob/ob* i *db/db* per entendre una mica millor la malaltia. Aquests models van conduir a la identificació de la leptina i del seu receptor, respectivament, i van fer entendre el paper rellevant d'aquestes molècules en la regulació del pes corporal. Evidentment, de seguida es va mirar quin grau de responsabilitat tenien en la fisiopatologia de l'obesitat en humans. A diferència dels ratolins *ob/ob* els humans obesos disposen de leptina funcional circulant, fins i tot a nivells superiors als subjectes control (Considine *et al.*, 1995). De fet, els nivells de leptina circulant en humans també mostren una correlació positiva amb la quantitat de teixit adipós (Maffei *et al.*, 1995). En aquest sentit, els humans obesos s'assemblen més al model *db/db*, en el qual els ratolins a més de ser obesos, desenvolupen diabetis. Tot i així es coneix una excepció: dos germans amb obesitat mòrbida, fills de parents consanguinis, presenten manca de leptina per causa d'una deleció d'un sol nucleòtid en el codó 133 del gen que provoca un trencament de la pauta de lectura

II. Introducció

(Montague *et al.*, 1997). Mostraren obesitat severa des dels primers anys, però amb una glucèmia normal. A part d'aquest cas, el tractament de l'obesitat amb administració de leptina exògena no ha reeixit.

Llavors es va postular que una mutació en el receptor de la leptina podria ser una causa d'obesitat més habitual en humans. Es va clonar i mapar el gen en el braç curt del cromosoma 1 (Tartaglia *et al.*, 1996). Fins avui, només en una família s'ha descrit la segregació d'obesitat, acompanyada d'hipogonadisme, amb una mutació en el gen del receptor de la leptina, (Clément *et al.*, 1998). Les pacients presentaven obesitat severa però una glucèmia i una insulínemia normals. Altres estudis del gen de receptor de leptina, en pacients obesos, han donat resultats negatius. Per tant, no sembla que mutacions en els gens de la leptina i del seu receptor siguin causants de l'obesitat humana, malgrat la importància central d'aquestes molècules en el control del pes.

II.3.1.2 POMC, FAT, receptors de melanocortina.

En vista del patró de resistència a la leptina que presenten els individus obesos, però no havent detectat mutacions en el receptor de la leptina, es va postular que algun defecte en les molècules importants de la cascada de senyalització de la leptina en l'hipotàlam podria ser important en la gènesi de l'obesitat en humans. Així s'ha vist que, mutacions en el receptor de melanocortina 4 (MC4R) són responsables d'entre el 4%-5% de tots els casos d'obesitat severa (Farooki *et al.*, 2000).

La proteïna α -MSH, el lligand de MC4R, junt amb altres proteïnes són producte del processament de POMC (pro-opiomelanocortina) per part de diferents peptidases. POMC és un element central en la regulació de la gana, de manera que la seva expressió és disminuïda pel neuropeptid NP-Y (orexigènic) i augmentada per la leptina (anorexigènica). És per tant un bon

candidat, també, en la patogènesi de l'obesitat. Efectivament s'ha descrit lligament entre la regió cromosòmica de POMC en 2q21, i nivells de leptina o despesa energètica basal (Chagnon *et al.*, 1997; Comuzzi *et al.*, 1997). En una família s'ha descrit la cosegregació de mutacions en el gen i la progressió cap a obesitat (Krude *et al.*, 1998).

El ratolí FAT representa una forma monogènica d'obesitat associada a hiperinsulinèmia. La mutació es va descriure en el cromosoma 8 de ratolí, en un regió sintènica al cromosoma 4 humà, a prop del locus de la carboxipeptidasa CpE (Naggert *et al.*, 1995). CpE codifica per una proteïna que processa prohormones com proinsulina i POMC. Mutacions en aquest gen podrien conduir a un processament de prohormones deficient, i en conseqüència a defectes en els nivells d'activació dels receptors de melanocortina a l'hipotàlam i obesitat. En 1997 es va reportar un cas d'una dona amb obesitat i hipogonadisme amb elevats nivells de proinsulina, POMC i cortisol (Jackson *et al.*, 1997).

II.3.1.3 Receptors adrenèrgics β_2 i β_3

S'ha descrit una mutació en el primer "loop" intracel·lular del receptor β_3 -AR. Els portadors d'aquesta mutació pateixen d'obesitat abdominal, hiperinsulinèmia, resistència a la insulina, elevada pressió arterial, i una disminuïda taxa metabòlica (Clément *et al.*, 1995; Walston *et al.*, 1995; Widèn *et al.*, 1995; Sipiläinen *et al.*, 1997). Per contra, molts altres estudis poblacionals han donat resultats negatius en analitzar l'associació d'aquesta mutació amb la malaltia (Gagnon *et al.*, 1996; Fujisawa *et al.*, 1998). En estudis amb població mexicana, però, la regió del gen β_3 -AR, en el cromosoma 8p12-11.1 ha mostrat lligament amb un elevat BMI (Mitchell *et al.*, 1999).

II. Introducció

Una mutació en el codó 27 del β_2 -AR ha estat associada amb obesitat i hipertensió (Large *et al.*, 1997). Igualment un polimorfisme en la zona promotora del gen s'associa amb obesitat i diabetis de tipus 2 en població japonesa (Yamada *et al.*, 1999)

II.3.1.4 UCP's

Com hem vist la termogènesi en teixit adipós marró en rosegadors ve determinada majorment, per l'activitat mitocondrial de les proteïnes desacobladores UCP's. En humans, un polimorfisme en la zona promotora del gen d'UCP-1 en el cromosoma 4 s'associa a guany de pes, que és més accentuat si el polimorfisme es presenta en paral·lel amb la mutació del primer "loop" intracel·lular del β_3 -AR, que hem comentat abans, (Clément *et al.*, 1996). Fins avui no s'ha demostrat que mutacions en la zona codificant o en el promotor dels gens UCP-2 i UCP-3 estiguin associats amb obesitat en humans (Klannemark *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999).

II.3.1.5 TNF- α

TNF- α és una citoquina secretada pel teixit adipós que pot produir resistència a la insulina inhibint la fosforilació d'IRS-1. Diverses evidències, algunes ja comentades més a dalt, suggereixen que TNF- α pot ser un important mediador de la resistència a la insulina induïda per obesitat i així tenir un paper clau en la fisiopatologia de la diabetis de tipus 2. Dos polimorfismes han estat identificats en la regió no traduïda 5'-UTR, del mRNA, G308A i G238A. Fins ara s'han obtingut resultats discrepants sobre una possible associació amb obesitat humana i resistència a la insulina (Fernández-Real *et al.*, 1997, Watson *et al.*, 1999).

II.3.1.6 PPAR- γ

Les tres formes existents de receptors PPAR (α , β i γ) heterodimeritzen amb el receptor X retinoide RXR, per induir la transcripció de múltiples gens, que en conjunt condueixen a la diferenciació del teixit adipós. Els lligands naturals dels receptors PPAR són derivats d'àcids grassos, però el més interessant és que PPAR γ és la diana de les tiazolidinadiones (TZD). Aquests són els fàrmacs antidiabètics que posseeixen una acció sensibilitzadora a la insulina més potent. Això el fa un candidat obvi per ser protagonista en la patogènesi de la resistència a la insulina. El gen de PPAR γ mapa en el cromosoma 3p24. Aquesta regió ha estat descrita com a possiblement implicada en resistència a la insulina en diversos estudis de "genome-wide scan". Una rara mutació P115Q en el domini N-terminal de PPAR γ fou descrita en quatre pacients amb obesitat mòrbida (Ristow *et al.*, 1998). Mutacions dominants negatives en el gen de PPAR γ s'han associat a resistència a la insulina severa, diabetis i hipertensió (Barroso *et al.*, 1999). La variant P12A ha estat associada a un baix BMI, una sensibilitat a insulina anormalment elevada, i un disminuït risc de patir diabetis de tipus 2 (Deeb *et al.*, 1998, Altshuler *et al.*, 2000). En canvi, en altres estudis aquesta mateixa variant ha estat associada amb un alt BMI (Ek *et al.*, 1999).

II.3.1.7 Glucoproteïna PC-1

La proteïna de membrana PC-1 va ser identificada en un pacient amb resistència a la insulina extrema i es va trobar que inhibia l'activitat quinasa del receptor de la insulina (Maddux *et al.*, 1995). Una variant A121C en l'exó 4 del gen ha estat associada amb resistència a la insulina (Pizzuti *et al.*, 1999).

II. Introducció

II.3.1.8 IRS-1

IRS-1 ha estat la proteïna més estudiada de les que s'uneixen al receptor d'insulina, i forma part essencial del mecanisme de transducció de senyal de la insulina cap a l'interior cel·lular. És per tant un candidat ferm per la resistència a la insulina de base genètica. Dos polimorfismes han estat descrits com a interessants en el gen d'IRS-1 (Almind *et al.*, 1993). Ambdós són més freqüents en la població diabètica de tipus 2 que en els individus control. En els danesos no diabètics un d'aquests polimorfismes s'associa a resistència a la insulina (Chausen *et al.*, 1995). Es coneixen altres substrats del receptor d'insulina (IRS-2/3/4), però fins ara no s'han trobat resultats consistents de mutacions o polimorfismes en ells.

II.3.1.9 Glucògen sintasa

Ja hem comentat abans que el defecte en l'estimulació de la síntesi de glucògen és un fet primerenc en l'aparició de diabetis de tipus 2 i d'intolerància a la glucosa. L'enzim clau d'aquesta via, doncs, la glucògen sintasa, és un bon candidat per un defecte genètic causant de resistència a la insulina. El gen es va mapar en la regió cromosòmica 19q21 (Letho *et al.*, 1993; Orho *et al.*, 1995). Un polimorfisme del gen de la glucògen sintasa s'ha associat a diabetis de tipus 2 i a resistència a la insulina (Groop *et al.*, 1993; Majer *et al.*, 1996).

II.3.1.10 NeuroD1

NeuroD1 és un factor regulador del desenvolupament del pàncreas, i regula l'expressió de la insulina unint-se al seu promotor, després d'heterodimeritzar amb la proteïna E47. NeuroD1, com qualsevol altre proteïna reguladora del desenvolupament del pàncreas, és un bon candidat a ser un gen important en la fisiopatologia de la diabetis de tipus 2. S'ha descrit associació de dos mutacions de NeuroD1 en heterozigosi amb el desenvolupament d'aquesta malaltia. Una d'elles afecta la capacitat de la proteïna d'unir-se amb el DNA i l'altre la capacitat d'unir proteïnes coactivadores (Malecki *et al.*, 1999).

Hi ha molts altres gens que són bons candidats i que han estat objecte d'estudi. Hem intentat assenyalar aquí els resultats més rellevants, però l'estudi de gens candidats ha deixat més clar, encara, que en humans, ni l'obesitat ni la diabetis de tipus 2 són malalties d'una fisiopatologia senzilla ni atribuïble a un sol gen. Gens que codifiquen per proteïnes implicades en la transducció de senyal d'insulina, el transport de glucosa, la síntesi de glucògen, la incorporació i la síntesi d'àcids grassos i la diferenciació de l'adipòcit han donat en diferents estudis associació amb diabetis, però en conjunt, només en un 2%-5% dels pacients. Això suggereix que les síndromes degudes a deficiències en aquests gens són relativament rares. És per això que es continuen cercant nous gens implicats en la fisiopatologia d'aquestes malalties, possiblement encara desconeguts, i que en qualsevol cas ens ajudaran a entendre millor els processos biològics que regulen el metabolisme.

II.3.2 Cerca a genoma complet

L'alternativa a l'estudi de gens candidats és la cerca en tot el genoma de nous gens que mostrin associació amb certs trets de la malaltia. Mitjançant estudis de lligament i mètodes de clonatge posicional es pretén acotar regions cromosòmiques que continguin gens implicats en la fisiopatologia de la diabetis i de l'obesitat, que potser encara romanen desconeguts, o de funció incerta. Aquestes tècniques el que fan és estudiar polimorfismes distribuïts a l'atzar en el genoma, per determinar el "mapa" de variants al·lèliques en cada individu d'una població. El que es pretén és veure quines variants al·lèliques i de quina zona del genoma cosegreguen amb diferents trets fenotípics, (obesitat, diabetis tipus 2, alt BMI, resistència a la insulina, concentracions de leptina...etc.). La fiabilitat estadística serà més gran quan més gran sigui la població, quan més gran sigui el nombre de famílies de que disposem i quan més gran sigui la mida d'aquestes famílies. Aquesta metodologia presenta l'avantatge de que no assumeix cap coneixement previ dels mecanismes fisiopatològics que poden conduir a la malaltia, el que permet fer descobriment de nous gens que encetaran noves vies d'estudi sobre nous mecanismes, però requereix disposar d'un gran nombre d'individus i de famílies, i tot i així sempre existeix un risc alt d'obtenir falsos positius.

Amb aquesta metodologia es van identificar els gens responsables de les diabetis de tipus MODY ("Maturity-Onset Diabetes of the Youth"). Aquests pacients presenten des de l'adolescència una disminuïda secreció d'insulina en resposta a glucosa. Són formes monogèniques de diabetis, i per tant més senzilles d'estudiar per anàlisi de lligament. En tots casos s'ha tractat de mutacions que afecten a la funció de la cèl·lula β : glucoquinasa, els factors nuclears hepàtics HNF1 α i β , HNF4 α i el factor del promotor d'insulina IPF1. En conjunt representen un 5 % de tots els pacients amb diabetis.

S'han trobat mutacions en el gen d'IPF-1 associades a diabetis de tipus 2 no MODY (Hani *et al.*, 1999; Macfarlane *et al.*, 1999; Stoffers *et al.*, 1998), però en general per les formes poligèniques de la malaltia els resultats no han estat definitius. En un estudi sobre 170 famílies mexicanes a Texas es van identificar les regions Ch 2p37 i Ch 15 com a bones candidates a contenir gens importants (Hanis *et al.*, 1996). Recentment s'ha clonat el gen de la regió del cromosoma 15, calpaïna 10 (CAPN10) (Horikawa *et al.*, 2000). Un parell de polimorfismes s'associen amb resistència a la insulina en indis Pima, junt a una reducció dels nivells d'mRNA (Baier *et al.*, 2000). Poc se sap de la funció de la calpaïna 10 i res del seu paper en el metabolisme de la glucosa i caldrà esperar a més estudis per determinar la importància real d'aquesta proteïna en la fisiopatologia de la malaltia. També s'ha reportat lligament de diabetis de tipus 2 amb altres regions cromosòmiques. Entre elles, 2q (NIDDM1; Hanis *et al.*, 1996), 12q (NIDDM2; Mathani *et al.*, 1996) i 20q (Zouali *et al.*, 1997; Ghosh *et al.*, 1999) són les més prometedores.

En el cas de l'obesitat també s'han trobat els gens responsables d'algunes formes monogèniques rares mitjançant la cerca a genoma complet. És el cas dels gens de la síndrome de lipodistròfia congènita de Berardinelli-Seip, BSCL1 i BSCL2 (Magre *et al.*, 2001), o dels gens de la síndrome Bardet-Biedl, BBS1-6, (Mykytyn *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2001; Katsanis *et al.*, 2000; Slavotinek *et al.*, 2000).

Però com en el cas de la diabetis de tipus 2, per les formes poligèniques de l'obesitat, molt més comuns, els resultats no són tant definitius. En pacients obesos s'ha trobat lligament entre massa grassa i concentracions de leptina, i una regió en el cromosoma 2p (Comuzzie *et al.*, 1997). En aquesta regió hi ha la proteïna POMC de la que ja hem parlat. També s'ha trobat un fort lligament entre percentatge de greix corporal i una regió en 20q. (Borecki *et al.*, 1994) i entre taxa metabòlica i una regió en el cromosoma 11 que inclou els gens d'UCP2 i UCP3 (Bouchard *et al.*, 1997). Una altra regió en el cromosoma 11 també presenta fort lligament amb percentatge de greix (Norman *et al.*, 1996). Relacionades amb obesitat mateixa o amb algun tret de la malaltia també

II. Introducció

destaquen les regions 7q (Borecki *et al.*, 1994), 8p (en la zona on hi ha el β_3 AR; Mitchell *et al.*, 1999), 10p (Hager *et al.*, 1998), 16q (Walder *et al.*, 2000) i 18q (Perusse *et al.*, 2001), com les de més solidesa estadística.

Com passava amb l'estudi de gens candidats, tampoc la cerca a genoma complet ha permès identificar un gen responsable de la major part dels casos de diabetis i obesitat. Però no hem d'oblidar que estem al davant d'una malaltia poligènica, i que ve també molt determinada per l'entorn del pacient, per tant, tret d'un petit percentatge de malalts, no podem esperar que una mutació en un sol gen ens determini l'aparició de la malaltia en la major part dels pacients. Sovint els gens trobats per cerca a genoma complet són de funció desconeguda, i cal estudiar la biologia de la proteïna que codifiquen, per poder entendre quina pot ser la seva relació amb la fisiopatologia de la diabetis o de l'obesitat.

En resum, molt és l'esforç fet fins ara per entendre els processos que condueixen a l'aparició d'aquestes malalties, però aquestes són complexes, impliquen moltes vies metabòliques diferents, diversos teixits, secrecions endocrines, cascades de transducció de senyal, etc. i encara queda molt camí per recórrer. El que és segur, és que quant més avancem en el coneixement d'aquests processos, més sabrem sobre com funciona el nostre cos.

III Objectius

Com hem vist anteriorment tant l'estudi de gens candidats com els anàlisis del genoma complet, revelen que molts gens diferents poden ser importants en el desenvolupament de la diabetis de tipus 2 o de l'obesitat. Molts d'ells conferiran susceptibilitat a la malaltia, que afegida a certes variables de l'entorn o a certes variants d'altres gens, conduiran a la seva aparició. Estem parlant, doncs, de malalties poligèniques, de les quals encara no en coneixem tots els gens implicats. Per això, l'objectiu prioritari d'aquesta tesi va ser:

- Identificar nous gens expressats de manera diferencial en el múscul esquelètic en situacions de resistència a la insulina.

Un tercer grup d'estratègies de recerca intenta recollir les avantatges de l'estudi de gens candidats i de la cerca de genoma complet. Són estratègies de "caça" de gens com el "Differential Display PCR" i la hibridació sostractiva, ambdues emprades en aquesta tesi. Aquestes tècniques tenen en compte la fisiopatologia de la malaltia i alhora la possibilitat d'un anàlisi massiu que permeti trobar nous gens desconeguts, possiblement importants. Sabem d'entrada que la resistència a la insulina és un fet comú a l'obesitat i a la diabetis de tipus 2, i que és un fet primerenc i causal de la darrera. També sabem que el múscul esquelètic és, per volum i per característiques metabòliques, el lloc on aquesta resistència a la insulina és més rellevant i té efectes determinants per tot l'organisme. És per això que vam escollir el múscul en condicions de resistència a la insulina per identificar nous gens implicats en la fisiopatologia de l'obesitat i la diabetis de tipus 2. En aquesta tesi es van fer servir rates d'avançada edat, rates obeses i rates diabètiques, condicions que s'associen amb resistència a la insulina, i mitjançant mètodes de "Differential Display PCR" i d'hibridació sostractiva, s'ha pretès aïllar mRNA's que fossin expressats de manera diferent en el múscul resistent a la insulina respecte el múscul control. Un cop identificats aquests gens el següent objectiu era:

III. Objectius

- **Descriure la funció d'alguns d'aquests gens i la seva possible implicació en la fisiopatologia de l'obesitat i/o de la diabetis de tipus 2.**

Per fer-ho disposàvem d'eines per estudiar l'expressió d'aquests gens en diferents models d'obesitat i diabetis de tipus 2 i en diferents poblacions d'individus, així com la regulació d'aquesta expressió en resposta a insulina. Igualment disposàvem de tècniques de biologia molecular i cel·lular per estudiar la localització de la proteïna en la cèl·lula i els efectes de la regulació de la seva expressió, i així estudiar la funció de la proteïna en la maquinaria cel·lular. En concret vam aïllar tres gens : Mitofusina-2, P311/PTZ-17 i DOR i vam aprofundir especialment en l'estudi de la funció del primer.

IV Materials i mètodes

IV.1 ANIMALS - EXTRACCIÓ DE TEIXITS

Tots els animals utilitzats en aquesta tesi han estat mantinguts en condicions estàndard d'estabulari en el Servei d'Estabulari de la UB, en la Facultat de Biologia, segons les normatives d'aquest departament, i seguint tota la normativa legal al respecte. Les administracions d'anestèsia, el sacrifici i les extraccions de teixits s'han fet igualment segons els protocols estàndards d'actuació del Servei d'Estabulari de la UB.

S'han fet servir els següents animals, depenent de l'experiment:

- Rates Wistar normals.
- Rates Zucker *fa/fa*.
- Rates Diabètiques Zucker ZDF *fa/fa*

I típicament se les ha anestesiats amb pentobarbital, i abans de sacrificar-les se les ha extret :

- Múscul gastrocnemius
- Múscul sòleus
- Teixit adipós blanc epididimal
- Fetge
- Cor

El teixit, llevat que el protocol subsegüent ho desaconsellés, s'ha congelat immediatament en nitrogen líquid i a continuació s'ha conservat a -80°C .

IV. Materials i mètodes

En ocasions s'han fet servir altres teixits, també d'altres espècies, com ratolí o *Drosophila melanogaster* que han estat amablement cedits per col·legues d'altres grups de recerca del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular o d'altres departaments.

IV.2 INDIVIDUS

En aquesta tesi s'ha treballat amb múscul esquelètic humà (*vastus lateralis*) congelat, o bé amb RNA total prèviament aïllat d'aquest mateix múscul. Els subjectes dels que provenen les mostres utilitzades es divideixen en dos grups.

El primer grup, del que ens van enviar múscul congelat, eren 17 individus. Tots homes, 9 individus control, i 8 individus diabètics de tipus 2. Les biòpsies de múscul van ser realitzades al Department of Clinical Physiology del Karolinska Institute (Stockholm, Suècia), complint la normativa vigent al respecte a Suècia i van ser enviades a Barcelona en neu carbònica.

Del segon grup de pacients es va utilitzar RNA total que havia estat extret de múscul *vastus lateralis* al Centre de Recherche en Nutrition Humaine de la Faculté de Médecine R.T.H. Laennec (Lyon, França). Les biòpsies i l'extracció d'RNA les van realitzar el personal de l'INSERM U.449, segons la metodologia del seu laboratori i complint la legislació vigent a França en quant a protocols d'experimentació amb humans. Els pacients que nosaltres vam estudiar eren un primer grup de 7 voluntaris sans i prims (6 dones i 1 home), sis voluntaris obesos (5 dones i 1 home), i 18 voluntaris diabètics de tipus 2 (10 dones i 8 homes); i un segon grup de 11 voluntaris sans i prims (7 dones i 4 homes) i 8 voluntaris diabètics de tipus 1 (5 dones i 3 homes).

IV.3 TÈCNIQUES D'OBTENCIÓ D'RNA

Aquestes tècniques permeten l'aïllament d'RNA total i d'mRNA poli-A a partir de qualsevol tipus de teixit o cultiu cel·lular. La manipulació de les mostres ha d'estar dirigida a la prevenció de contaminacions per RNAses que puguin provenir del medi ambient o de les mans del manipulador, ja que són ubiqües; és obligatori l'ús de guants i de solucions lliures d'RNAses. Totes les solucions han de ser preparades amb aigua tractada amb DEPC, s'han d'utilitzar reactius d'ús específic lliures d'RNAses i material de vidre sotmès a esterilització a 200°C durant almenys 4 hores. El material de plàstic esterilitzat ha d'estar reservat per aquest ús exclusiu. El pH de les solucions ha de ser mesurat amb tires de pH agafant mostres de la solució i afegint-les sobre la tira.

IV.3.1 Obtenció d'RNA total

IV.3.1.1 Extracció amb kit de Quiagen

Per extracció a partir de cèl·lules s'ha utilitzat l'equip comercial d'extracció d'RNA total de la casa Quiagen. Aquest equip té l'avantatge d'ésser més ràpid (menys de 30 minuts) que altres protocols i, a més, s'hi treballa sense la utilització de substàncies tòxiques, com són el fenol i el cloroform. El mètode permet obtenir preparacions d'RNA total superiors a 100 µg a partir de cèl·lules animals i teixits, bacteris i llevats (a partir del RNeasy Mini kit) o de cèl·lules i teixits de plantes o de fongs filamentosos (RNeasy Plant Mini kit).

IV. Materials i mètodes

El protocol consisteix bàsicament en una lisi i homogeneïtzació de les mostres en presència d'un agent altament desnaturalitzant com és l'isotiocianat de guanidina, el qual immediatament inactiva les RNAases per tal d'assegurar un aïllament de l'RNA intacte. S'hi afegeix posteriorment etanol per proporcionar unes condicions d'unió bones, i posteriorment les mostres ja són passades per la columna *RNeasy mini spin column*, on l'RNA total (de llargada superior a 200 bases) s'unirà a la membrana de sílica-gel i els contaminants podran ser rentats eficientment. El pas final consisteix en una elució de l'RNA amb un rendiment molt bo i amb molt bona qualitat.

Aquest equip permet l'obtenció de molècules d'RNA amb una llargada superior a 200 bases. Molècules petites d'RNA, com són els RNA 5,8S, 5S i l'RNA de transferència (160, 120 i 70-90 nucleòtids respectivament), no s'uneixen quantitativament a les condicions en les quals es treballa (es tracta també d'un enriquiment de la mostra, ja que representen el 15-20 % de l'RNA total). Aquest fet ocorre també quan s'utilitza la metodologia del coixí de clorur de cesi.

MATERIALS , SOLUCIONS, REACTIUS:

Tampó de lisi (RLT) (amb el kit) al qual s'hi afegeix β -mercaptoetanol a l'1 % just abans de ser utilitzat.

Etanol al 70 %

Tampó de rentat 1: RW1 (amb el kit)

Tampó de rentat 2: RPE (amb el kit) on s'afegeix etanol (80 %)

Aigua lliure d'RNAases

RNeasy mini spin column

Tub recol·lector de 2 ml

Xeringa

Agulla de xeringa de 20 G

PROCEDIMENT:

1. Treiem el medi de la placa "multiwell" de 6 pous. Es renten els pous dues vegades amb 1 ml de PBS estèril.
2. Les cèl·lules es trenquen afegint-hi tampó RLT, al qual s'ha afegit β -mercaptoetanol just al moment abans de ser utilitzat. S'hi afegixen 250 μ l d'aquest tampó en un pouet, s'ajuda a trencar les cèl·lules amb un "scraper" estèril i aquest mateix tampó es traspasa al pouet del costat i es fa la mateixa operació, i se segueix després amb un tercer pouet. Finalment s'afegixen aquests 250 μ l a un "eppendorf" estèril. Tornem a realitzar la mateixa operació amb 250 μ l més en els mateixos pous per acabar de trencar totalment les cèl·lules i recollir tot l'extracte. Aquests 250 μ l més s'afegixen en el mateix tub "eppendorf" anterior.
3. Homogeneïtzació de la mostra: en el nostre cas vam passar el lisat 5 vegades per una xeringa amb una agulla de 20G (diàmetre de 0,9mm).
4. S'addiciona un volum igual d'etanol al 70 %: 500 μ l per tub "eppendorf". És recomanable barrejar molt bé la solució diverses vegades pipetejant i no es recomana centrifugar.
5. Es procedeix a introduir la mostra dins de la columna per tal que l'RNA sigui retingut. La mostra és introduïda diverses vegades en volums de 700 μ l (volum màxim que es pot introduir cada vegada a la columna). La columna es posa en un tub col·lector de 2 ml, se n'introdueix un volum de 700 μ l i se centrifuga 15 segons a 8.000 g (aprox.10.000 rpm), i l'eluit és descartat; posteriorment se n'hi pot afegir més volum, i així es reutilitza la mateixa columna. La capacitat màxima d'unió de les columnes és de 100 μ g.

IV. Materials i mètodes

6. Aplicació en la columna de 700 µl de tampó RW1, centrifugació durant 15 segons a 8.000 g i es descarta l'eluit.
7. Es pipetegen 500 µl de tampó RPE i s'introdueixen en la columna; es torna a centrifugar durant 15 segons a 8.000 g per rentar i es descarta l'eluit.
8. Se centrifuga a màxima velocitat durant 1 minut perquè la columna no contingui restes d'etanol.
9. Es transfereix la columna a un "ependorf" net d'1,5 ml i s'elueix l'RNA amb aigua lliure d'RNAases. En el nostre cas esperem més de 30 µg per columna, i per això es recomana que l'elució es faci en dues etapes: primer afegim uns 30 µl d'aigua a la columna, se centrifuga durant 1 minut a 8.000 g i es repeteix el mateix amb 30 µl més.

IV.3.1.2 Aïllament per CsCl

Per l'aïllament d'RNA total a partir de teixits, fem servir el mètode de ultracentrifugació en CsCl. Aquest mètode està descrit com el millor per l'extracció d'RNA. Separa perfectament l'RNA de la fracció de proteïnes i del DNA. És per això que també el fem servir per l'aïllament d'RNA sempre que vulguem fer després purificació d'RNA poli-A i/o síntesi de cDNA.

Com sempre que treballem amb RNA fem tot el procés en gel, amb guants i amb les precaucions típiques del treball amb RNA per tal d'evitar contaminació amb RNAases. Totes les solucions, excepte que es digui el contrari, han de ser autoclavades.

MATERIALS , SOLUCIONS, REACTIUS:

Ultracentrifuga i rotor basculant.

Solució de GTC

Guanidina Thiocyanate 4 M

Acetat de Sodi 3M

pH 5,5

Sarcosil 10%

β -mercaptoetanol 14 M

CsCl (s)

Solució de CsCl 5,7 M

Aigua DEPC

Agitar 1l d'aigua estèril amb 1 ml Diethylpyrocarbonate

Autoclavar

PROCEDIMENT:

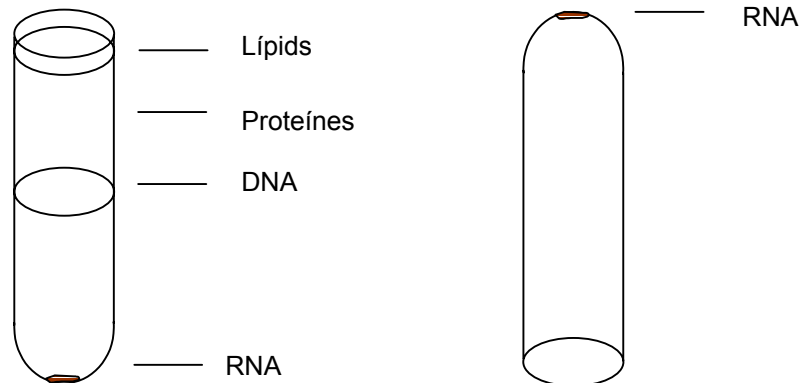
1. En un Falcon 50 afegir 3.2 ml de solució de Guanidina (GTC) sense sarcosil ni DTT + 25 μ l β -mercaptoetanol
2. Afegir el teixit al Falcon abans de que es descongeli. Homogeneïtzar amb "Politró" a velocitat 6-7 durant 15"
3. Afegir 1 g de CsCl , dissoldre'l i després afegir 150 μ l de sarcosil 10%; millor en aquest ordre per agitar sense fer escuma
4. Afegir 1.5 ml de solució de CsCl en tubs Sorvall d' ultracentrífuga
5. Ficar amb molt de compte la mostra sobre el CsCl, amb pipeta Pasteur autoclavada. Es formen dos fases ben diferenciades
6. Posar els tubs a ses camises, equilibrar els pesos amb solució de GCT.
7. Ultracentrifugació. En el cas de la centrífuga Beckman s'usa 40000 rpm, 20°C y 16 h, amb acceleració 4 y desacceleració 0.

IV. Materials i mètodes

8. Es formen varies fases (dibuix). Descartar tots els sobrenedants amb pipeta Pasteur autoclavada, amb molt de compte de no tocar el fons.

Nota: els últims μl s'extreuen amb el tub cap per avall, sense tornar-lo a posar dret mai més.

Deixar el tub cap per avall fins que s'assequi.



9. Segons la mida del precipitat afegir entre 20-40 μl d' H_2O DEPC en el punt 13.
10. Afegir 300 μl d' H_2O DEPC i deixar 10' perquè es redissolgui.
11. Recollir els 300 μl d'RNA i passar a un tub "eppendorf". Rentar el tub amb 50 μl més d' H_2O DEPC para recollir l'RNA.
12. Precipitar l'RNA amb etanol 100% i acetat de sodi.
13. Rentar amb EtOH 70%.
14. Eliminar l'etanol i deixar assecar. Redissoldre en H_2O DEPC segons el precipitat obtingut al punt 8. Ressuspendre bé i guardar a -80°C .

IV.3.2 Aïllament d'RNA poli-A

IV.3.2.1 Mètode de partícules magnètiques

Fem servir per aquest mètode el kit de partícules magnètiques de Roche. Aquest kit es basa en forta afinitat que presenten l'estreptavidina i la biotina. D'aquesta manera, s'incuba la mostra amb oligo-dT lligat a biotina. S'espera que els oligonucleòtids s'anellin a les molècules d'mRNA poli-A, i després es recuperen aquestes incubant la barreja amb partícules magnètiques lligades a estreptavidina. En un últim pas se separa el complex amb un imant. Després de rentar s'elueix l'mRNA poli-A.

MATERIALS , SOLUCIONS, REACTIUS:

Mostra de teixit o d'RNA total.

Boletes magnètiques lligades a estreptavidina (amb el kit)

Oligo-dT lligat a biotina (amb el kit)

Separador magnètic (amb el kit)

Tampó de lisi (amb el kit)

Tampó de rentat (amb el kit)

Aigua estèril

PROCEDIMENT:

1. Si partim d'RNA total el diluïm en tampó de lisi 1,5 ml en "ependorfs" blancs autoclavats, fins a 250 µg , incubem 2 min a 65°C i passem al punt 6.

IV. Materials i mètodes

2. Si partim de teixit (50-100mg) el polvoritzem en un morter refredat amb nitrogen líquid evitant que es descongeli.
3. L'aboquem en 1,5 ml de tampó de lisi en "eppendorf" autoclavat.
4. Homogeneitzem passant-ho quatre o cinc vegades per una agulla de 21 G.
5. Centrifuguem 30" a 11.000 g
6. Conservem el SN en gel fins el punt 11
7. Ressuspenem el pot comercial de partícules magnètiques agitant-ho vigorosament.
8. Pipetegem 150 µl en tubs "eppendorf""RNAsa-free".
9. Separem el tampó d'emmagatzematge en el que estan les partícules en el separador magnètic.
10. Rentem 1 vegada amb tampó de lisi (250µl), evitant en tot moment que s'assequin les partícules.
11. Afegim 1,5 µl (150 pmols) d'oligo-dT-biotina a la mostra que ve del punt 6.
12. Afegim la mostra amb l'oligo-dT-biotina sobre les partícules magnètiques recent rentades, del punt 10.
13. Ressuspenem les partícules en la mostra i incubem 5 min a 37°C si partíem d'RNA total o en gel si partíem d'un homogenat de teixit.
14. Apliquem el separador magnètic 3 min.
15. Rentem 3 vegades amb "washing buffer" 250 µl i ens assegurem d'eliminar-lo bé en l'últim rentat, sempre evitant que s'assequin les partícules.
16. Eluïm l'mRNA amb aigua estèril 25 µl incubant 2 min a 65°C
17. Separem les partícules amb el separador i recuperem el SN en un tub "RNAsa-free".
18. Determinem la quantitat i la qualitat del mRNA espectrofotomètricament.

IV.3.2.2 Mètode per columna d'oligo-dT-cel·lulosa

MATERIAL, REACTIU, I SOLUCIONS:

Binding Buffer (BB)

Tris-HCl 0,01 M

NaCl 0,5 M

EDTA 1 mM

SDS 0,1 %

pH 7,5

Elution Buffer (EB)

Tris-HCl 0,01 M

EDTA 1 mM

SDS 0,1 %

pH 7,5

NaOH 0,1 M

NaN₃ azida sòdica.

Cotó de vidre

Xeringues d'1 ml.

PROCEDIMENT:

1. Preparam la columna en una xeringa d'1 ml al fons de la qual posem cotó de vidre autoclavat.
2. Dissolem 75 mg d'oligo-dT-cel·lulosa en Elution Buffer (EB), i els apliquem a la columna.

IV. Materials i mètodes

3. Deixem que s'empaqueti per gravetat. Queda un volum de 250-300 μ l. Excepte el pas d'empaquetament, la resta es pot aplicar pressió amb l'ajuda de l'èmbol de la xeringa, per accelerar el pas dels líquids per la columna.
4. Equilibrem la columna passant 10 vegades aquest volum de Binding Buffer (BB)
5. Preescalfem la mostra d'RNA total (fins a 750 μ g) a 65°C 5 min.
6. Deixem que es refredi a T ambient i la diluïm en 500 μ l de BB
7. Passem la mostra per la comuna i recollim l'eluíit.
8. Escalfem de nou a 65°C i ho tornem a passar per la columna.
9. Des d'aquest moment anem recollint fraccions de 100 μ l per control espectrofotomètric.
10. Rentem amb 5-10 volums de BB.
11. Eluïm amb 3-5 volums d'EB preescalfat a 65°C i recuperem l'eluíit.
12. Precipitem l'mRNA eluíit amb etanol, i el ressuspensem en 10 μ l d'aigua estèril.
13. Podem regenerar la columna passant, per aquest ordre:
 - a. 10 volums EB
 - b. 5 volums NaOH 0,1 M
 - c. 10 volums EB
 - d. 10 volums BB
14. En aquest punt la podem reutilitzar o passar-li 2 volums de BB+NaN₃ 0,2% i conservar-la a 4°C tapada pels extrems amb "parafilm".

IV.4 TÈCNiques BÀSIQUES DE MANIPULACIÓ DEL DNA

El treball amb DNA recombinant ha estat bàsic en la realització d'aquesta tesi, i per dur-lo a terme s'han aplicat multitud de tècniques de manipulació del DNA, que són més o menys comuns en tots els laboratoris de Biologia Molecular. Tota aquesta metodologia es pot trobar perfectament

detallada en qualsevol manual de laboratori de Biologia Molecular. En concret, les tècniques de manipulació del DNA que s'han fet servir durant aquesta tesi estan basades en els protocols que apareixen en els manuals "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Sambrook *et al.*, 1989) i "Current Protocols in Molecular Biology" (Coligan *et al.*, 2001). A continuació apareix una llista d'algunes de les tècniques usades habitualment durant el dia a dia del laboratori, a mode d'exemple.

Generació i manipulació de bacteris competents

Transformació

Recuperació del DNA de cultius bacterians

Anàlisi del DNA per restricció

Electroforesi en gel d'agarosa

Purificació del DNA del gel d'agarosa

Lligació

Mutagènesi dirigida

PCR ("Polymerase Chain Reaction")

Seqüenciació

IV.5 DIFFERENTIAL DISPLAY PCR

Aquesta tècnica té com a objectiu detectar i aïllar fragments de cDNA amplificats, que siguin representatius de gens expressats de manera diferent en dues condicions diferents. Va ser dissenyada per Liang P. and Pardee A.B. (1992). El primer que fem és extreure RNA total dels teixits per passar-lo tot seguit a cDNA. Aquest cDNA s'amplifica posteriorment amb un "primer" oligo-dT i un altre "primer" heptanucleòtid que trobarà molts llocs d'anellament al cDNA, de manera que la PCR rendirà un munt de fragments de diferents mides. Aquests productes de PCR

IV. Materials i mètodes

s'analitzen per electroforesi en un gel d'acrilamida d'alta resolució, capaç de separar fragments de només 1 nucleòtid de diferència.

Tot i que no ha estat l'eix central de la realització d'aquesta tesi, reportem aquí el protocol, ja que un dels gens presentats ha estat identificat mitjançant aquesta tècnica, i considerem que és una tècnica prou interessant com per deixar-ne constància.

IV.5.1 "Primers"

Es van utilitzar tres "primers" (o encebadors) diferents 5' i tres "primers" diferents 3', i es van provar diferents combinacions dos a dos. Sempre un 5' i un 3' (oligo-dT). Els "primers" 3' (oligo-dT) incorporen la seqüència oligo-dT per anellar-se a la cua poli-A i porten un nucleòtid afegit a 3' per reduir la població de cDNA's amplificats a 1/3 del total en cada cas i així facilitar l'anàlisi dels productes de PCR. Els tres "primers" 5' són heptanucleòtids a l'atzar. Donades les mides dels cDNA's i les probabilitats de que un heptanucleòtid a l'atzar trobi una seqüència idèntica al llarg d'una seqüència de cDNA, es considera que amb totes les combinacions dos a dos possibles d'aquests "primers" s'aconsegueix amplificar tota la població d'mRNA's de la cèl·lula. Tots els "primers" porten incorporada a 5' la diana BamHI per facilitar la clonació dels fragments de PCR resultants.

```
"primer" 5' -1  AAGCTTGATTGCC  
"primer" 5' -2  AAGCTTCGACTGT  
"primer" 5' -3  AAGCTTTGGTCAG  
"primer" 3' -1  AAGCTTTTTTTTTTTTG  
"primer" 3' -2  AAGCTTTTTTTTTTTTC  
"primer" 3' -3  AAGCTTTTTTTTTTTTA
```

IV.5.2 Amplificació PCR

Quan preparem les mostres de cDNA que amplifiquem per PCR convé introduir junt amb cada mostra un control idèntic però sense enzim RT. Aquest l'amplifiquem en paral·lel junt amb la mostra. Si l'RNA està lliure de DNA no obtindrem cap producte d'amplificació.

Les condicions de PCR a partir de cDNA aquí descrites són el producte de moltes proves per trobar les condicions òptimes d'amplificació. Aquestes proves inclouen, per aquest ordre d'importància: variacions de la temperatura d'"annealing", temps d'"annealing" i extensió, variació de les concentracions de magnesi, concentració del DNA mostra, concentracions d'altres reactius, i incorporació d'additius (DMSO, formamida...etc.).

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Termociclador

cDNA de cada tipus de teixit. (0,1 µg/µl)

Taq polimerasa (Roche) i el seu tampó d'amplificació 10x (Roche)

Barreja dNTP 2mM cadascun

Barreja dNTP 33 µM cadascun

"primers" 5' i 3' 10µM

MgCl₂ 50mM

γ³²P-dATP (400 Ci/mmol; 10 mCi/ml) (Amersham Pharmacia Biotech)

IV. Materials i mètodes

PROCEDIMENT:

1. Agafem 1 μl de la dilució de cDNA de cada teixit i fem la PCR com s'explica a continuació. Afegirem un tub pel blanc i per cada mostra prepararem dos tubs. Un marcat radioactivament i l'altre no. Això ens permetrà monitoritzar en un petit gel com ha anat la PCR no radioactiva, abans de fer l'electroforesi radioactiva en el gel d'alta resolució.

	No radioactiva (μl)	Radiactiva (μl)
Aigua estèril	9,38	8,08
Tampó d'amplificació 10x	2	2
MgCl ₂ 50 mM	0,8	0,8
Primer 5' 10 μM	2,5	2,5
Primer 3' 10 μM	2	2
dNTP's 2mM de cada	2	-
dNTP's 33 μM de cada	-	3
32P-dATP 33 μM	-	0,3
cDNA	1	1
Taq polimerasa (ROCHE)	0,32	0,32

2. Afegim un parell de gotes d'oli mineral i posem els tubs al termociclador:

94 °C 3 min

(94 °C 30 seg; 40 °C 2 min; 72 °C 1 min) 40 cicles

72 °C 5 min

3. Conservem a 4°C durant un curt temps o a -20°C.

IV.5.3 Electroforesi en gel d'alta resolució DD-PAGE

Prèviament comprovarem la qualitat de la PCR en un gel de poliacrilamida petit, al 10 %. El que cal observar és un patró complex de bandes discretes, que a simple vista serà idèntic entre les dues mostres problema. Tant el blanc de PCR, com el control negatiu de RT (monitor de presència de DNA en les mostres d'RNA), no han de donar productes d'amplificació. Si tot és correcte seguim amb l'electroforesi en gel d'alta resolució.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Mostres de DD-PCR

Aigua estèril

TBE x20

Acrilamida/Bis (38:2)

Urea

PSA 10%

TEMED

Sistema d'electroforesi de seqüenciació.

Repel·lent Repel-Silane™.

Tampó de càrrega.

PROCEDIMENT:

1. Preparem el muntatge pel gel. El típic d'un gel de seqüenciació. Tenint cura de la netedat dels vidres per minimitzar el risc de la formació de bombolles. En un dels vidres aplicarem Repel-Silane™, per evitar que el gel s'hi enganxi.

IV. Materials i mètodes

2. Preparem el gel d'alta resolució, al 6% de poliacrilamida. Per això afegim en un got de precipitats de 100 ml

Aigua estèril	38,2 ml
TBE x20	3,75 ml
Acrilamida/Bis (38:2)	11,5 ml
Urea	31,5 gr

Agitem bé i afegim, just abans d'aplicar:

PSA 10%	375µl
TEMED	30 µl

3. Apliquem amb xeringa de 50 ml el gel entre els vidres.
4. Un cop el gel assecat el col·loquem en el sistema d'electroforesi i afegim el TBE en les cubetes de dalt i de baix. Assegurant-nos que no hi ha fugues de la cubeta de dalt a la de baix.
5. Treiem les pintes i carreguem una mica de blau de bromofenol a cada pou per comprovar que tot és correcte, i que no hi ha comunicacions entre els pous.
6. Connectem la corrent per assegurar-nos que el blau corre bé en el gel.
7. Afegim a cada mostra 10 µl de tampó de càrrega, i les col·loquem al termociclador 10 min a 95°C per desnaturalitzar-les.
8. Connectem el voltatge 20-30 min abans de carregar.
9. Carreguem 7 µl de cada mostra. Correm durant unes 3 hores
10. Un cop acabada l'electroforesi, treiem els vidres i recolzats en horitzontal sobre la taula separem un de l'altre. El gel quedarà enganxat a aquell vidre que no porti Repel-Silane™.
11. Apliquem el gel amb el vidre, sobre un paper Wattmann™ pressionant fort. A continuació girem el conjunt deixant-lo reposar sobre el vidre. Tibem amb cura del paper Wattmann™ i ens hi endurem el gel enganxat.
12. Cobrim el gel amb una fulla de plàstic transparent de cuina.
13. Assequem el gel a l'assecador de gels a 75°C durant una hora.

14. Col·loquem el gel en un cassette d'autoradiografia amb un film i deixem exposant durant la nit a -80°C . El revelem.

IV.5.4 Recuperació de la banda

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Fragment de gel PAGE en paper de Whatmann

Aigua destil·lada

PROCEDIMENT:

1. Un cop revelat el film, ens fixarem en aquelles bandes que siguin de diferent intensitat entre els dos teixits d'interès. Un cop localitzades apliquem el film sobre el conjunt de plàstic gel i paper, de la mateixa manera en que ho vam deixar a exposar i retallem la banda d'interès, en el gel, guiant-nos per la imatge del film.
2. El tros de paper retallat, el posem en un tub "eppendorf" amb 100 μl d'aigua destil·lada i eluïm el DNA incubant a 95°C durant 10 min.
3. A continuació procedim a concentrar el DNA per precipitació salina amb etanol, i després clonar-ho en un vector del tipus T/A (pGEM-T de PROMEGA, per exemple), específics per clonar productes de PCR. O bé podem mirar de reamplificar-ho fent servir el mateix parell de "primers" que s'han fet servir en aquella DD-PCR.
4. En últim terme seqüenciem el fragment, i el fem servir com a sonda per comprovar per Northern Blot les diferències d'expressió.

IV.6 HIBRIDACIÓ SOSTRACTIVA

Seguim el manual de l'usuari del kit de Clontech PCR-Select cDNA Substraction. Però resumim aquí el protocol per considerar-ho de gran interès i prou informatiu com per reproduir-lo amb els recursos propis de cada laboratori.

La hibridació sostractiva és una tècnica que ens permet comparar dues poblacions d'mRNA i obtenir clons que estan expressats diferencialment en una població respecte a l'altra. Primerament ambdues poblacions d'mRNA són convertides a cDNA i ens referirem al cDNA que conté els transcrits específics (expressats de manera diferencial) com a "test" (cDNA control, per exemple), i el cDNA de referència com a "driver" (cDNA obés, per exemple). El cDNA "test" i el "driver" seran hibridats, i les seqüències híbrides seran apartades. Com a conseqüència els cDNA's que quedin sense hibridar en el cDNA "test" representaran gens que estan expressats en el mRNA "test" però no en el "driver". Als últims passos amplificarem per PCR selectivament aquestes seqüències.

IV.6.1 Bases moleculars de PCR-Select cDNA Subtraction™

La figura 3 ens dóna detalls dels esdeveniments moleculars que tenen lloc durant la sostracció de cDNA per la metodologia PCR-Select.

Primer, el cDNA és sintetitzat a partir de 0,5-2 µg d'RNA poli-A dels dos tipus de teixits a comparar. El cDNA "test" i "driver" són digerits amb RsaI, que rendeix extrems roms, i talla amb bastant freqüència. El "test" és llavors subdividit ens dos porcions i a cadascuna se li lliga un adaptador diferent en els seus extrems. Els extrems dels adaptadors no tenen grup fosfat, així que

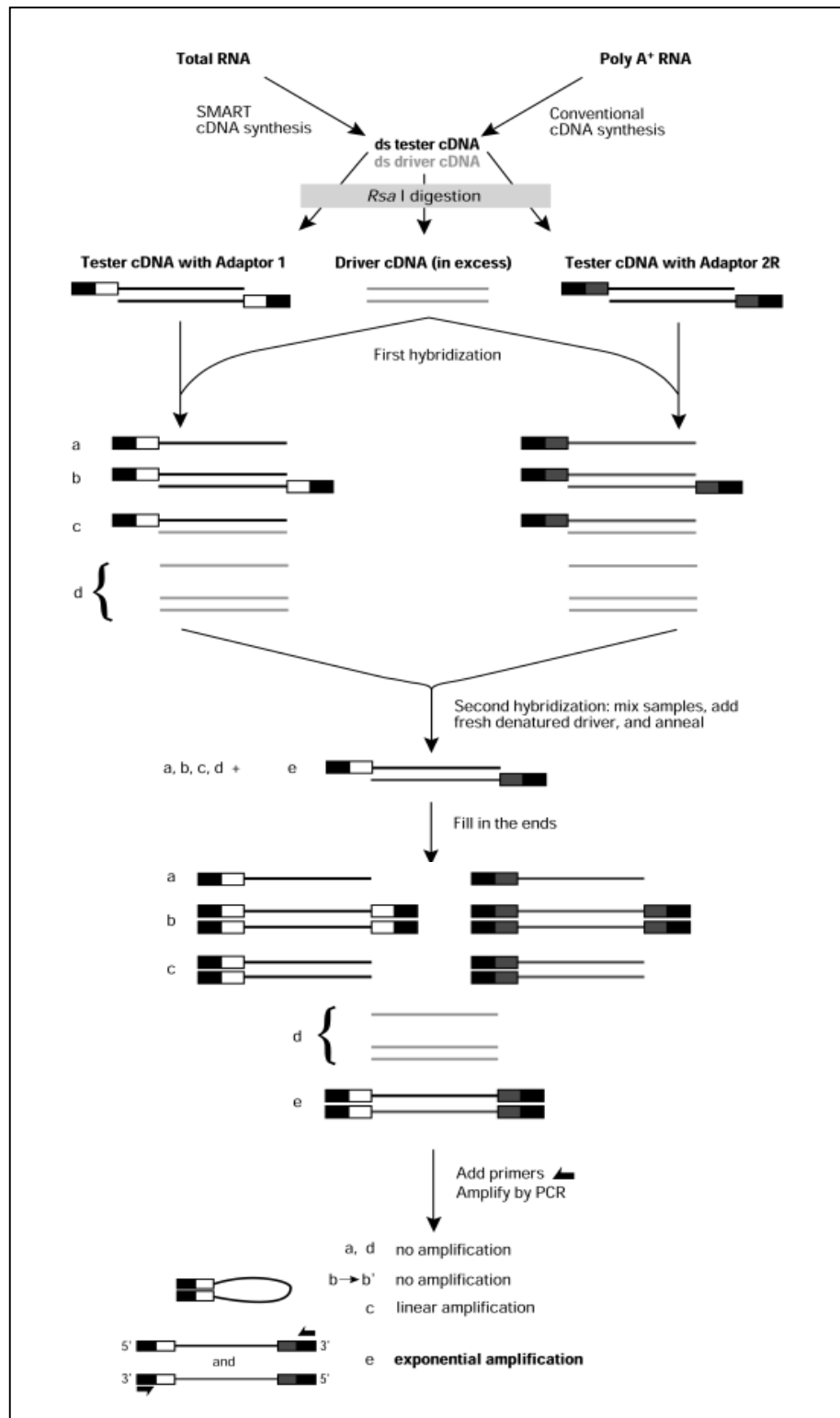


Figura 3. Esquema de la hibridació sostractiva PCR-Select cDNA Substraction (Clontech), extret del manual de l'usuari. Es mostren els esdeveniments moleculars que tenen lloc a cada pas. Per ordre: síntesi de cDNA, digestió per RsaI i lligació d'adaptadors, primera i segona hibridació, i amplificació per PCR. Les línies representen cDNA's, les caixes adaptadors 1 (blanc i negre) i 2 (gris i negre). El color negre en ambdòs adaptadors significa idèntica seqüència en aquella part. Color gris i blanc corresponen a seqüències diferents. Les fletxes representen "primers" per l'amplificació per PCR.

IV. Materials i mètodes

només una cadena de cada adaptador es lliga a l'extrem 5' de cada cDNA. Els dos adaptadors tenen la part externa amb idèntica seqüència, que permetran l'anellament del "primer" de la primera PCR.

Dos hibridacions es duen llavors a terme. A la primera un excés de "driver" és afegit a cada mostra de "test". Les mostres són llavors desnaturalitzades i després es permet el seu anellament, generant-se les molècules de tipus **a**, **b**, **c** i **d** en cada mostra. (veure figura 3). La concentració de molècules molt i poc abundants tendeix llavors a igualar-se entre les molècules de tipus **a** perquè el seu reanellament (que du a la formació de molècules **b**) és més ràpid per les molècules molt abundants degut a la cinètica d'hibridació de segon ordre. Al mateix temps les molècules de tipus **a** monocadena són significativament enriquides en seqüències diferencialment expressades, ja que els cDNA's que no són diferentment expressats formen molècules de tipus **c** amb el cDNA "driver".

Durant la segona hibridació, les dues mostres que venen de la primera hibridació són barrejades, sense desnaturalitzar. Ara només els cDNA sostrets monocadena que quedaven a la primera hibridació poden reassociar-se per formar nous híbrids de tipus **e**. Aquests nous híbrids són molècules bicatenàries amb diferents extrems, que corresponen a les seqüències de l'adaptador 1 i 2 . cDNA "driver" fresc desnaturalitzat, és afegit, (de nou, sense desnaturalitzar la barreja de sostracció), per enriquir encara més la fracció **e** en molècules diferencialment expressades. Després de reomplir els extrems recessius dels adaptadors amb DNA polimerasa, les molècules de tipus **e** (les seqüències "test" diferencialment expressades) tenen diferents llocs pels "nested" "primers" a l'interior dels seus extrems 5' i 3'.

La població sencera de molècules és llavors sotmesa a PCR per amplificar les seqüències diferencialment expressades d'interès. Durant la PCR, a les molècules de tipus **a** i **d** no tenen lloc d'anellament pels "primers", i per tant no es poden amplificar. La major part de molècules de tipus **b** formaran estructures de "llaç" que impediran la seva amplificació exponencial. Això és degut a la presència de llargues seqüències complementàries a l'extrem de la monocadena de DNA. Durant

cada pas d'anellament de "primers", la cinètica d'hibridació juga molt a favor de la formació d'aquestes estructures de "llaç", en que els extrems de la monocadena s'anellen sobre si mateixos, impedit l'anellament dels "primers". Les molècules de tipus **c** tenen un sol lloc per l'anellament del "primer" i només poden amplificar-se de manera lineal. Només les molècules de tipus **e** que tenen adaptadors diferents a cada extrem, podem amplificar-se de manera exponencial. Aquestes són les seqüències diferencialment expressades.

A continuació es fa una segona PCR usant "nested" "primers" per reduir encara més qualsevol "background" de productes secundaris de PCR i enriquir les seqüències diferencialment expressades. Els cDNA's amplificats poden ser aleshores inserits directament en un vector tipus T/A o en qualsevol altre vector fent servir les dianes que contenen els adaptadors, i seqüenciats o sotmesos a posteriors anàlisis de cerca. Igualment la barreja producte de PCR pot ser utilitzada com a sonda d'hibridació per analitzar llibreries de cDNA, o altres. Fins aquí tenim els cDNA's sobreexpressats en un dels dos tipus de cDNA: el "test". Serà d'interès repetir l'experiment intercanviant els cDNA's "test" i "driver" per obtenir aquelles seqüències sobreexpressades en l'altre tipus de cDNA. A la primera sostracció li direm "directa" o "forward", i a la darrera "reversa"

Després de que la llibreria de sostracció ha estat obtinguda és important confirmar que els clons individuals representen realment gens diferencialment expressats. En últim terme serà confirmat per Northern Blot, però degut a la enorme quantitat de clons, és molt més eficient aplicar una estratègia prèvia d'anàlisi diferencial o "differential screening", cosa que ajudarà a eliminar falsos positius. El mètode que vam escollir consisteix en la hibridació de la llibreria de sostracció amb els productes de PCR de la sostracció directa i reversa, com a sondes. Els clons que representin mRNA's que estan veritablement sobreexpressats en el "test" hibridaran només amb els productes de PCR de la sostracció "directa" però no amb els productes de PCR de la sostracció "reversa". Aquest mètode requereix que prèviament a ser usats com a sonda, els productes de PCR han de ser digerits amb RsaI, i hem de separar els adaptadors, ja que la presència d'aquests motivaria molt soroll de fons en la hibridació.

IV.6.2 Generalitats

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Els reactius d'ús generals que es van fer servir en diferents parts del procés van ser:

mRNA poli-A control de múscul esquelètic humà (1µg/µl)

DNA control (de bacteriòfag φX174 digerit amb HaeIII)

"primers" específics per G3PDH (10 µM de cada)

dNTP mix (10 mM de cada, dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

20x EDTA/glucògen (0.2 M EDTA; 1 mg/ml glucògen)

NH₄OAc (4M)

Aigua estèril

PROCEDIMENT:

En resum consta dels següents passos que s'expliquen en més detall a continuació.

Síntesi de cDNA

Digestió amb RsaI

Lligació d'adaptadors

Hibridacions

Amplificacions PCR

Differential Screening

IV.6.3 Síntesi de cDNA

En aquest primer pas va ser fonamental partir d'un mRNA d'altíssima qualitat. La qualitat d'mRNA poli-A es pot comprovar corrent 2µg d'RNA en un gel d'agarosa/BrEt, i es pot comparar amb un RNA poli-A comercial del mateix teixit. Per un mRNA de múscul esquelètic de rata esperem un "smear" que oscil·li entre 500 pb i 10 kb, i que no presenti bandes d'RNA ribosòmic. Si l'mRNA presenta aquests dos requisits podem continuar endavant.

Com es veurà en el protocol, al final es reserva una part de la mostra per analitzar-la per electroforesi en gel d'agarosa. Tot el procés es fa en paral·lel amb les mostres d'interès i l'mRNA poli-A control de múscul esquelètic humà comercial, de manera que en l'anàlisi per electroforesi en gel d'agarosa la mida del cDNA provinent del mRNA control i la mida dels cDNA mostra ha de ser similar. Típicament s'ha d'observar, després de la síntesi de cDNA un "smear" entre 500 pb i 10 kb, quan treballem amb múscul esquelètic, de rata o humà. És bo, en afegit, observar la presència de bandes discretes en l'"smear", corresponents a mRNA's molt abundants típics de múscul esquelètic.

A part del rang de mida és important que la intensitat de la tinció de bromur d'etidi en el gel d'agarosa no estigui desplaçada en les mostres respecte al cDNA control. Un rang de mides més baix o una intensitat màxima de la tinció de bromur d'etidi en l'"smear" desplaçada avall, significa degradació del mRNA de partida. En aquest cas no s'ha de continuar endavant. Aquest ha estat un punt de control important en el nostre cas, i hem comprovat que és el pas més crític i que la qualitat de la hibridació depèn, en gran mesura de la qualitat del cDNA en aquest punt.

IV. Materials i mètodes

Una variable crítica que determina la qualitat del cDNA al final del procés és la retrotranscriptasa usada per fer la reacció. A les nostres mans la que millor resultat ens ha donat ha estat la retrotranscriptasa d'MMLV SuperScript II (Life Technologies).

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

mRNA Poli-A (2µg)

Transcriptasa reversa MMLV SuperScript II (200 U/µl) (Life Technologies)

"primer" de síntesi de cDNA poli-dT (10 µM)

5x tampó de primera cadena

250 mM Tris-HCl (pH 8.3)

30 mM MgCl₂

375 mM KCl

20x mix enzimàtic de la segona cadena

DNA polimerasa, (6 U/µl)

RNAse H, (0.2 U/µl)

DNA lligasa (1.2 U/µl)

5x tampó de segona cadena

500 mM KCl

50 mM Sulfat d'amoni

25 mM MgCl₂

0.75 mM β-NAD

100 mM Tris-HCl (pH 7.5)

0.25 mg/ml BSA

T4 DNA polimerasa (3 U/µl)

PROCEDIMENT:

1. Per cada cDNA, combinem 2µg d'RNA poli-A, amb 1µl de "primer" de síntesi de cDNA (10µM) i afegim aigua estèril fins a 5 µl. Barregem i centrifuguem els tubs breument a la centrifuga.
2. Incubem a 70°C en un termociclador durant 2 minuts.
3. Refredem els tubs en gel 2 minuts i centrifuguem breument.
4. Afegim 2 µl del 5x tampó de primera cadena
 - 1 µl dNTP mix (10mM de cada)
 - 1 µl Aigua estèril
 - 1 µl Transcriptasa reversa MMLV SuperScript II (200 U/µl)
5. Incubem a 42°C 1.5 h a l'estufa. Per evitar evaporació del volum de reacció.
6. Posem els tubs a 4°C i afegim
 - 48.4 µl Aigua estèril
 - 16.0 µl 5x tampó de segona cadena
 - 1.6 µl dNTP mix (10mM)
 - 4.0 µl 20x mix enzimàtic de la segona cadena.
7. Barregem i centrifuguem un pols. Incubem a 16°C 2 hores.
8. Afegim 2 µl (6 unitats) de T4 DNA polimerasa i barregem bé.
9. Incubem a 16°C durant 30 minuts.
10. Afegim 4 µl de 20x EDTA/glucògen per acabar la reacció.
11. Purifiquem el DNA amb el mètode clàssic de fenol/cloroform, i precipitem amb etanol (Sambrook *et al.*, 1989).
12. Dissolem el precipitat en 50 µl d'aigua estèril.
13. Transferim 6 µl a un altre tub i el conservem a -20°C com a control posterior de cDNA no digerit, en gel d'agarosa.
14. Continuem amb la digestió amb RsaI

IV.6.4 Digestió amb RsaI

Ja hem comentat en l'apartat anterior com és d'interessant l'anàlisi de la mida dels cDNA's amb els que estem treballant. També analitzarem, doncs, les mostres després de digerir i hem d'observar un "smear" entre 300 pb i 7 kb, si treballem amb múscul esquelètic de rata o humà. És bo, en afegit, observar la presència de bandes discretes en l'"smear", corresponents a mRNA's molt abundants típics de múscul esquelètic. Fem aquest control cada vegada després de la digestió, per estar-ne segurs, però el pas de digestió amb RsaI no és delicat i si hi han problemes i el cDNA no és de la qualitat adequada és normalment perquè ja s'arrossega de mala qualitat des del pas anterior.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

10x RsaI tampó de restricció
100 mM Bis Tris Propan-HCl (pH 7.0)
100 mM MgCl₂
1 mM DTT
RsaI (10 U/μl)

PROCEDIMENT:

1. Afegim els següents reactius al tub que ve de la síntesi de cDNA
43.5 μl de ds cDNA que ve del pas anterior
5.0 μl 10x RsaI tampó de restricció
1.5 μl RsaI (10 U/μl)

2. Barregem, centrifuguem i incubem a 37°C durant 1.5 hores.
3. Usem 5 µl de la digestió per analitzar la eficiència de la digestió i fem servir com a control la fracció no digerida que conservem del punt 13 de la "Síntesi de cDNA". Això ens serveix també per comprovar la qualitat del cDNA abans i després de digerir.
4. Afegim 2.5 µl de EDTA/glucògen per terminar la reacció.
5. Purifiquem el DNA amb el mètode de fenol/cloroform, i precipitem amb etanol (Sambrook *et al.*, 1989).
6. Dissolem el precipitat en 5.5 ml d'aigua estèril i conservem a -20°C.

IV.6.5 Lligació d'adaptadors

Aquest també és un pas molt important de tot el procés, perquè les molècules que no incorporin adaptadors no podran ser amplificades al final. Junt amb la síntesi de cDNA són els dos passos crítics que cal tenir molt ben controlats. Al final del procés de lligació dels adaptadors es pot fer una PCR semiquantitativa (a 15, 20, 25 i 30 cicles) per comprovar quin ha estat el percentatge aproximat de molècules que han incorporat adaptador. Per fer aquest control podem utilitzar els "primers" de G3PDH i el "primer" 1 del kit d'hibridació sostractiva que anella sobre els adaptadors (veure 6.7 "Amplificacions PCR"). Amplificarem 1 µl de cada mostra (Test 1-1 i Test 1-2) amb els dos "primers" G3PDH o amb les combinacions: "primer" 5'-G3PDH i "primer"1; "primer" 3'-G3PDH i "primer" 1. A l'analitzar els productes de PCR en gel d'agarosa amb bromur d'etidi, la intensitat de la tinció d'aquestes dos darreres combinacions respecte la tinció de l'amplificació amb els dos "primers" de G3PDH, ens donarà una idea del percentatge de molècules que han incorporat adaptador a un i altre extrem del cDNA. Nosaltres no hem continuat endavant si la intensitat d'aquestes dues amplificacions no era com a mínim 1/3 de la intensitat de l'amplificació amb els dos "primers" de G3PDH, a condicions de PCR no saturants (25 cicles).

IV. Materials i mètodes

En el punt 2 d'aquest apartat incorporem el que serà control de sostracció. Fragments del fag ϕ X174 digerit amb Hae III que seran barrejats amb el cDNA de múscul esquelètic control d'humà i se li lligaran els adaptadors per constituir el cDNA "test" control de múscul esquelètic.

Fixar-se que també reservem a part (punt 8), una alíquota de cada mostra, que porta els dos adaptadors, que no serà sotmesa a la hibridació sostractiva i que ens servirà de control de sostracció per a cada mostra experimental quan fem les amplificacions per PCR. En diem "test" no sostret.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

T4 DNA lligasa (400 U/ μ l, amb 3 mM ATP)

5x tampó de lligació DNA

250 mM Tris-HCl (pH 7.8)

50 mM MgCl₂

10 mM DTT

0.25 mg/ml BSA

Adaptador 1 (10 μ M)

5 - CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT - 3

3 - GGCCCGTCCA - 5

Adaptador 2 (10 μ M)

5 - CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT - 3

3 - GCCGGCTCCA - 5

PROCEDIMENT:

1. Diluïm 1 μ l de cada cDNA experimental digerit amb RsaI amb 5 μ l d'aigua estèril.

2. Preparem el DNA "test" control de múscul esquelètic de la següent manera: diluïm 2 µl de DNA de φX174 digerit amb Hae III amb 38 µl d'aigua estèril. Barregem 5 µl del DNA de φX174 digerit amb Hae III recent diluït amb 1 µl de múscul esquelètic control. Aquest serà el cDNA "test" control de múscul esquelètic que conté 0,2 % de DNA de φX174 digerit amb Hae III.
3. Preparem una Master Mix combinant els següents reactius en un tub de 500 µl

per rxn

Aigua estèril	3 µl
5x tampó de lligació	2 µl
T4 DNA lligasa	1 µl

4. Per cada cDNA "test" experimental i pel cDNA "test" control de múscul esquelètic, combinem els reactius de la taula en el ordre establert en tubs de 500 µl

Tub	1	2
Component	Test 1-1 (µl)	Test 1-2 (µl)
cDNA test diluït	2	2
Adaptador 1	2	-
Adaptador 2	-	2
Master Mix	6	6
Final	10	10

5. Barregem en un tub nou 2 µl de Test 1-1 i 2 µl de Test 1-2. Aquest serà el "test" no sostret 1-c. Fem el mateix per cada mostra i pel cDNA "test" control de múscul esquelètic. Després de la lligació aproximadament 1/3 de les molècules de cDNA en cada "test" no sostret portaran els dos adaptadors diferents
6. Centrifuguem breument i incubem a 16°C durant la nit.
7. Parem la reacció afegint 1 µl d'EDTA/glucògen, i escalfem a 72°C durant 5 minuts per inactivar la lligasa. Ara ja tenim els cDNA "test" amb els adaptadors lligats.

IV. Materials i mètodes

8. De cada "test" no sostret treiem 1 μ l i el diluïm en 1 ml d'aigua. Aquestes mostres les farem servir per PCR més endavant. (Veure "Amplificacions PCR")
9. Guardem les mostres a -20°C

IV.6.6 Hibridacions

Aquesta part no és crítica per la seva senzillesa. És el pas fonamental de la tècnica però no hi han variables subjectes a error, per la qual cosa la seva fiabilitat és alta. Si s'han superat tots els controls fins aquí, no hi haurà problema en aquesta part. Tot i així s'incorporen controls, que són els següents. Del punt 8 de l'apartat anterior s'en conserven els "test" no sostrets que no seran sotmesos a hibridació sostractiva, i que per tant, conserven tots els cDNA's de la mostra "test". Després en la PCR es compararan amb els "test" que si són sotmesos a sostracció. Són els controls negatius de sostracció i n'hi ha un per cada mostra. El control positiu de sostracció és el "test" control de cDNA de múscul esquelètic humà que incorpora un 0,2 % de DNA de ϕ X174 digerit amb Hae III, i que serà sostret amb cDNA de múscul esquelètic humà, de manera que després de la sostracció, en l'amplificació per PCR només es recuperaran els fragments de DNA de ϕ X174 digerit amb Hae III.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

4x tampó d'hibridació

Tampó de dilució

20 mM HEPES-HCl (pH 8.3)

50 mM NaCl

0.2 mM EDTA (pH 8.0)

PROCEDIMENT:

1. Per cadascuna de les mostres experimentals i pel control de sostracció de múscul esquelètic combinem els següents reactius com s'explica en la taula:

Component	Tub	HS1 Hibridization sample 1 (µl)	HS2 Hibridization sample 2 (µl)
cDNA conductor digerit amb Rsa I		1,5	1,5
cDNA test 1-1 lligat a l'adaptador 1		1,5	-
cDNA test 1-2 lligat a l'adaptador 2		-	1,5
4x tampó d'hibridació		1,0	1,0
Final		4,0	4,0

2. Cobrim les mostres amb una gota d'oli mineral, centrifuguem breument, i incubem al termociclador a 98°C 1,5 min.
3. Incubem les mostres a 68°C durant 8 hores.
4. Afegim els següents reactius en un tub estèril:
 - 1 µl de cDNA "driver"
 - 1 µl de 4x tampó d'hibridació
 - 2 µl d'aigua estèril.
5. Posar 1 µl d'aquesta barreja en un tub de 0,5 ml i cobrir amb una gota d'oli mineral.
6. Incubar al termociclador a 98°C durant 1,5 min.
7. Agafem simultàniament en la mateixa punta de pipeta les dues mostres d'hibridació HS1 i HS2 deixant una bombolla d'aire entre les dues, amb l'objectiu de que només entrin en contacte entre elles en presència del cDNA "driver" que acabem de desnaturalitzar. Afegim el contingut de la punta de pipeta al tub amb el cDNA "driver" recentment desnaturalitzat i barregem pipetejant.

IV. Materials i mètodes

8. Incubem la reacció a 68°C durant la nit.
9. Afegim 200 ml del tampó de dilució al tub i barregem pipetejant.
10. Escalfem al termociclador a 68°C durant la nit.
11. Guardar les mostres a -20°C.

IV.6.7 Amplificacions per PCR

Mitjançant les amplificacions per PCR es recuperen els cDNA's presents en el "test" però no en el "driver". Aquí entren diversos controls. Per una banda s'amplifiquen els controls negatius ("test" no sostrets) de sostracció, que donaran típicament un "smear" d'ampli rang de mides que pot tenir alguna banda discreta (d'algun gen molt abundant en la mostra). És important assenyalar que l'amplificació del "test" no sostret no és més que una representació del cDNA total de la mostra. També amplifiquem el control positiu de sostracció, ("test" control de cDNA de múscul esquelètic humà que incorpora un 0,2 % de DNA de ϕ X174 digerit amb HaeIII, sostret amb cDNA de múscul esquelètic humà), que rendirà només les bandes corresponents al DNA de ϕ X174 digerit amb HaeIII.

L'amplificació de les sostraccions de cada mostra s'espera que donin un patró complex de bandes discretes, que pot tenir un "smear" de fons o no, que correspondran als cDNA's dels "test" diferencialment expressats respecte al "driver". En qualsevol cas el patró de productes d'amplificació ha de ser diferent al "test" no sostret de cada mostra.

A part dels controls de sostracció esmentats, s'incorporen un control negatiu (aigua) de PCR, i un control positiu que és el "DNA sostret control de PCR", que dona els mateixos fragments d'amplificació de PCR que esperem pel control positiu de sostracció, és a dir, les bandes corresponents al DNA de ϕ X174 digerit amb HaeIII.

Com s'explica en el protocol es pot realitzar un control de sostracció analitzant els productes de PCR per Southern Blot (Sambrook *et al.*, 1989), hibridant amb una sonda contra un gen abundant en les mostres sotmeses a hibridació sostractiva. En el nostre cas, en que treballàvem amb múscul esquelètic de rata, vam escollir la miogenina. En els productes de PCR de les mostres de sostracció no s'ha de veure senyal, mentre que sí s'ha de veure en els productes de PCR de les mostres "test" no sotretes.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

PCR "primer" 1 (10 µM) 5-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3

Nested PCR "primer" 1 (10 µM) 5-TCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT-3

Nested PCR "primer" 2 (10 µM) 5-AGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3

cDNA sostret control de PCR (Clontech)

10x PCR tampó de reacció

50x Expand High Fidelity Polymerase Mix (Roche)

PROCEDIMENT:

1. Preparem les mostres per la PCR.
 - a. Aliquotem 1µl de cada cDNA diluït (cada mostra sotreta del pas 11 d'“Hibridacions” i el corresponent "test" no-sotret del pas 8 de “Lligacions d'Adaptadors”) en un tub de PCR
 - b. Aliquotem també 1 µl del cDNA sostret control de PCR (Clontech) en un tub de PCR
2. Preparem una Master Mix per tots els tubs de la primera PCR mes un blanc, com segueix:

IV. Materials i mètodes

Component	Volum per reacció (µl)
Aigua estèril	19,5
10x PCR tampó de reacció	2,5
dNTP mix (10 mM)	0,5
PCR primer 1 (10 µM)	1,0
50x Expand High Fidelity Polymerase Mix	0,5
Final	24,0

3. Barregem bé i aliquotem 24 µl de Master Mix en cada tub de PCR preparats al pas 1 i cobrim amb una gota d'oli mineral.
4. Incubem al termociclador a 75°C durant 5 min per estendre els adaptadors.
5. Immediatament comencem la PCR durant 35 cicles (94°C 30"; 60°C 30"; 72°C 1.5 min)
6. Correm 5 µl de cada reacció en un gel d'agarosa al 2 %. Devem veure un "smear" tènue potser amb alguna banda discreta.
7. Diluïm les PCR anteriors 1/100 en aigua estèril i aliquotem 1 µl de cada en un tub de PCR .
8. Preparam un Master Mix per la segona PCR mes un blanc com segueix:

Component	Volum per reacció (µl)
Aigua estèril	18,5
10x PCR tampó de reacció	2,5
dNTP mix (10 mM)	0,5
Nested PCR primer 1 (10µM)	1,0
Nested PCR primer 2 (10µM)	1,0
50x Expand High Fidelity Polymerase Mix	0,5
Final	24,0

9. Barregem bé i aliquotem 24 µl de Master Mix en cada tub de PCR preparats al pas 7 i cobrim amb una gota d'oli mineral.
10. Immediatament comencem la PCR durant 20 cicles (94°C 30"; 68°C 30 " ; 72°C 1.5 min)
11. Analitzem 5 µl de cada mostra en un gel d'agarosa. Esperem veure bandes discretes i en el control positiu de sostracció de múscul esquelètic, cinc bandes de 1.3, 1.1, 0.9, 0.6, 0.2 kb, igual que en el cDNA sostret control de PCR proporcionat per Clontech. El gel es pot aprofitar per realitzar un anàlisi de Southern Blot (Sambrook *et al.*, 1989) amb una sonda contra un gen abundant en les mostres que treballem, i comprovar si ha desaparegut en les mostres, un cop sostretes.
12. Podem guardar els productes de PCR a -20°C

IV.6.8 Clonació dels productes de PCR

La clonació dels productes de PCR pel seu posterior anàlisi es du a terme utilitzant qualsevol dels mètodes bàsics de manipulació de DNA que no hem descrit en aquesta secció de "Materials i mètodes", però que es poden trobar en qualsevol manual (veure "Tècniques bàsiques de manipulació del DNA"). Nosaltres en concret, vam fer:

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

- 10x RsaI tampó de restricció
 - 100 mM Bis Tris Propan-HCl (pH 7.0)
 - 100 mM MgCl₂
 - 1 mM DTT
- RsaI (10 U/µl)
- T4 DNA lligasa (400 U/µl, amb 3 mM ATP)
- 5x tampó de lligació DNA

IV. Materials i mètodes

250 mM Tris-HCl (pH 7.8)

50 mM MgCl₂

10 mM DTT

0.25 mg/ml BSA

QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)

Material estàndard de treball amb cultius bacterians.

Electroporador.

PROCEDIMENT:

1. Barregem 20 µl de producte de PCR del pas anterior amb 23 µl d'aigua estèril, 5 µl de tampó de restricció i 2 µl de RsaI, serà el tub "Insert". En paral·lel i en un altre tub barregem 2 µl de plàsmid pBluescript II SK+ (1µg/µl) amb 15 µl d'aigua estèril, 2 µl de tampó de restricció i 1 µl de RsaI, serà el tub "Plàsmid". Incubem tots dos tubs a 37°C durant 4 hores. Parem la reacció a 75°C durant 10 min.
2. De la digestió "Plàsmid" aïllem i purifiquem la banda de plàsmid linealitzat d'un gel d'agarosa i el quantifiquem.
3. Amb el tub "Insert" seguim el procés de purificació de fragments de PCR amb el QIAquick PCR Purification Kit seguint les instruccions del fabricant, basat en columnes de centrifugació de membrana de sílica-gel. Així eliminem els "primers" de PCR i els adaptadors que acabem de tallar amb RsaI.
4. Precipitem el DNA "Insert" amb etanol, i el ressuspenem en 10 µl d'aigua estèril i afegim 5 µl de plàsmid linealitzat (100ng), 4 µl de 5x tampó de lligació DNA i 1 µl de T4 DNA lligasa. Incubem a 16°C durant la nit.
5. L'endemà electroporem bactèries competents amb 5 µl de la lligació. Aquest cultiu serà la nostra llibreria de sostracció de cDNA.

IV.6.9 "Differential Screening"

Com s'ha explicat en la introducció de la "Hibridació Sostractiva", per descartar falsos positius una de les tècniques possibles és fer "Differential Screening". Aquest mètode consisteix en la hibridació de la llibreria de sostracció amb els productes de PCR de la sostracció "directa" i "reversa", com a sondes ("reversa" serà repetint el mateix procés descrit fins aquí però usant com a "driver" el que abans havia estat "test" i a la inversa). Els clons que representin mRNA's que estan veritablement sobreexpressats en el "test" hibridaran només amb els productes de PCR de la sostracció "directa" però no amb els productes de PCR de la sostracció "reversa". Aquells clons que hibridin amb els productes de PCR de les dues, és perquè pertanyen a cDNA's presents a les dues poblacions i que per alguna raó (probablement la seva abundància), no han estat sostrets. Aquest mètode requereix que prèviament a ser usats com a sonda, els productes de PCR han de ser digerits amb RsaI, i hem de separar els adaptadors, ja que la presència d'aquests motivaria molt soroll de fons en la hibridació.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Necessitem la llibreria de sostracció "directa" en que el cDNA "test" es de condició 1 i el cDNA "driver" és el de condició 2, i la llibreria "reversa" en que és tot el contrari.

Material de treball amb bacteries.

Material de Southern Blot

Kit de marcatge de sonda de cDNA.

Membranes de niló Hybond N+ (Amersham Pharmacia)

α P³²-dCTP (3000 mCi/ml) (Amersham Pharmacia)

PROCEDIMENT:

1. Sembrem les bactèries de la llibreria de sostracció “directa” que és la que volem analitzar.
2. Piquem 300 colònies i les fem créixer en plaques de 96 pous durant la nit a 37°C.
3. Utilitzant un braç de robot capaç d’allotjar 96 puntes de 200 µl piquem les 300 colònies sobre membranes de niló que reposen sobre una capa d’agar, de cada membrana en fem 2 rèpliques i les incubem a 37°C durant la nit.
4. Sobre les membranes de niló amb les colònies a sobre apliquem la tècnica de “plaque lifting” (Sambrook *et al.*, 1989), per tal d’aïllar el DNA i deixar-lo absorbit sobre la membrana.
5. Utilitzem les dues rèpliques de cada membrana per fer Southern Blot (Sambrook *et al.*, 1989), hibridant una d’elles amb els productes de PCR de la sostracció “directa” una vegada separats els "primers" i els adaptadors amb una columna de Sephadex-25 i l’altre amb els productes de PCR de la sostracció “reversa” una vegada separats els "primers" i els adaptadors, igualment.
6. Escollirem per seqüenciar i per analitzar per Northern Blot aquelles colònies que hagin donat positiu a la hibridació amb els productes de la sostracció “directa” i negatiu amb la sostracció “reversa”.

IV.7 TÈCNiques DE DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ D'RNA

IV.7.1 Northern Blot

IV.7.1.1 Electroforesi en gel d'agarosa

Els gels d'RNA es realitzen en condicions desnaturalitzants (presència de formamida). Les condicions desnaturalitzants asseguren una migració electroforètica de l'RNA proporcional a la seva mida. S'afegeix bromur d'etidi a la mostra per poder visualitzar-la.

MATERIALS , SOLUCIONS, REACTIUS:

Tampó d'electroforesi d'RNA10x (veure Apèndix II)

MOPS 400 mM, pH 7,0

Acetat Sòdic 100 mM

EDTA 10 mM

Es manté a temperatura ambient protegit de la llum.

Formamida desionitzada

Tampó de desnaturalització d'RNA

48% (v/v) de formamida desionitzada

6.4% (2,1 M) de formaldehid

0,53% de blau de bromofenol

5,3% de glicerol

Es dissol en tampó d'electroforesi x1

Es guarda a -20°C

IV. Materials i mètodes

Gel d'agarosa/formaldehid

1% Agarosa

0,66 M Formaldehid

Es dissol en tampó d'electroforesi d'RNA 1x

Es prepara el mateix dia en que s'utilitza.

Bromur d'etidi 400 µg/ml

PROCEDIMENT:

1. Afegim en un tub de microcentrifuga la quantitat d'RNA que es vol analitzar (aproximadament 30 µg). Concentrem la mostra per precipitació en etanol o evaporació al buit (sistema Speed-Vac), si cal.
2. Ho ressuspenem en 19 µl de tampó de desnaturalització d'RNA i 1 µl de la solució de bromur d'etidi.
3. Desnaturalitzem les mostres a 65°C durant 5-10 minuts. Les deixem en gel fins el moment de carregar-les en el gel.
4. Preparam el gel d'agarosa/formaldehid (una concentració de l'1% d'agarosa permet una bona resolució dels pesos moleculars entre el rang de 0,4-6 kb) en tampó d'electroforesi 1x diluït en H₂O-DEPC: fonem l'agarosa en un microones i posteriorment afegim el formaldehid al gel en una campana extractora, barregem i l'afegim a la cubeta preparada amb una pinta per formar els pous. El deixem gelificar.
5. Treiem la pinta, posem el gel en el sistema d'electroforesi i hi afegim tampó d'electroforesi fins que quedi cobert.
6. Carreguem les mostres incloent-hi un carril amb marcadors de pes molecular (0,5 µg d'RNA Ladder, Life Technologies-BRL). Fem córrer el gel a 60 V durant 4-5 hores o a 20 V durant tota la nit.

IV.7.1.2 Transferència

Transferim per capilaritat l'RNA a una membrana de niló (Hybond-N i Hybond-N+, Amersham).

PROCEDIMENT :

1. Fem córrer el gel d'RNA en condicions desnaturalitzants.
2. Comprovem en un transil·luminador la migració i estat de les mostres. Fem una foto dels RNA's ribosòmics per un posterior control de càrrega.
3. Col·loquem un vidre de 15x20 cm en una cubeta amb 500 ml de tampó 10xSSC (solució de transferència) de forma que es mantingui sostingut pels cantons de la cubeta. Col·loquem sobre el vidre un "pont" de paper Whatmann de la mateixa amplada que el gel però molt més llarg de forma que els seus extrems quedin submergits en el tampó de transferència. Fent rodar una vareta de vidre eliminem les bombolles d'aire atrapades entre el paper i el vidre.
4. Eliminem els pous del gel i el col·loquem sobre el paper Whatmann de forma que la cara superior de gel quedi en contacte amb el paper (la base dels pous queden cap amunt). Mullem el gel amb tampó de transferència. Rodegem el gel amb "Parafilm" per assegurar que el tampó només passarà a través del gel.
5. Col·loquem la membrana Hybond-N+ de la mateixa mida del gel a sobre d'aquest procurant que no quedin bombolles d'aire entre ells. Traiem les bombolles que quedin atrapades rodant amb una vareta de vidre. Convé marcar la membrana per poder reconèixer fàcilment la seva orientació i l'ordre de les mostres.
6. Posem un paper Whatmann de les mateixes dimensions sobre la membrana. Eliminem les bombolles que hi puguin haver i hi col·loquem dos fulls més de paper Whatmann.

IV. Materials i mètodes

7. Posem una pila (fins uns 10 cm d'alçada) de paper de filtre sec de les mateixes dimensions de la membrana. Col·loquem en la part superior un vidre i a sobre un pes d'uns 500 g (un catàleg o una ampolla amb aigua).
8. Ho deixem transferir durant 20-24 hores.
9. Desmuntem la transferència, rentem breument la membrana en tampó 2x SSC per eliminar les restes d'agarosa de la membrana i la deixem assecar a temperatura ambient.
10. Exposem la membrana en el transil·luminador durant 6 minuts (una irradiació de raigs UV de més de 0,15 J/cm²). D'aquesta manera fixem l'RNA a la membrana en produir-se unions covalents produïdes per la irradiació.
11. Fem una foto de la membrana per tenir constància de l'eficiència de la transferència..
12. Guardem la membrana a 4°C dins d'una bossa segellada fins que es procedeixi a la hibridació.

IV.7.1.3 Síntesi de la sonda marcada

Les sondes utilitzades es van obtenir per marcatge de fragments de cDNA recuperats per digestió amb enzims de restricció i purificació de la banda d'interès. El marcatge es va dur a terme per encebament aleatori ("random priming").

El mètode d'encebament aleatori consisteix en l'elongació d'hexanucleòtids pel fragment Klenow de la DNA-polimerasa d'*E. coli*. S'inclou en la reacció un traçador radioactiu (γ^{32} -P-dCTP). El DNA motlle és el fragment de cDNA del gen d'interès. La barreja d'hexanucleòtids conté totes les combinacions possibles de les quatre bases agafades de sis en sis.

Hem utilitzat l'equip Random Primed DNA Labelling kit de Roche i n'hem seguit les instruccions. El traçador radioactiu prové de la casa comercial Amersham. La sonda marcada va ser separada dels nucleòtids no incorporats mitjançant columnes de cromatografia d'exclusió molecular (Nick columnTM, Amersham).

MATERIALS , SOLUCIONS, REACTIUS:

Barreja de reacció 10x. Conté els hexanucleòtids i el tampó de TE.

Barreja de nucleòtids sense dCTP. És una barreja equimolar de dATP, dGTP i dTTP a una concentració final de 5 mM. L'anomenem dNTP(-C).

Tampó STE (vegeu Apèndix).

Fragment Klenow de DNA polimerasa (proveït amb l'equip).

$\gamma^{32}\text{P}$ -dCTP Redivue (Amersham). 3.000 Ci/mmol, cat. AA005.

Sephadex G-50 NickTM columns (Pharmacia)

PROCEDIMENT:

1. Barregem en un tub de microcentrifuga:

25 ng de DNA motlle

2 μl de barreja de reacció 10x

3 μl de dNTP(-C)

50 μCi de $\gamma^{32}\text{P}$ -P-dCTP Redivue (10 mCi/ml)

1 μl de Klenow (2U/ μl)

ddH₂O estèril fins a 20 μl finals.

2. Ho incubem a 37°C durant 1 hora.

IV. Materials i mètodes

3. Rentem la columna (NICK™ columns) traient els taps superior i inferior i afegint-hi 5 ml de tampó STE. Ho deixem eluir.
4. Preparem 6 tubs de microcentrifuga per recollir les fraccions eluïdes de la columna. Afegim 180 µl d'STE a la reacció de marcatge i introduïm els 200 µl resultants en la columna. Rentem la columna afegint-hi 200 µl d'STE. Recollim el volum eluït en el "primer" tub (fracció 1, 400 µl).
5. Afegim 5 alíquotes de 200 µl de STE en la columna i recollim les fraccions eluïdes (200 µl cada una). La sonda marcada s'elueix en les fraccions 2,3 i 4. Si l'eficiència de marcatge és alta es pot utilitzar la fracció 3, en cas contrari agrupem les 3 fraccions i les guardem a -20°C fins al moment d'utilitzar-les. Descartem les fraccions 1, 5 i 6.

IV.7.1.4 Hibridació i rentats

Determinem la temperatura d'hibridació i de rentat segons la temperatura de fusió (de desnaturalització) del complex DNA:RNA. Hem fet la hibridació en condicions permissives i els rentats s'han dut a terme en condicions més astringents. En general hem prehibridat i hibridat a 42°C i rentat a 55°C.

MATERIALS , SOLUCIONS, REACTIUS:

Solució de prehibridació

SSPE 5x

formamida desionitzada al 50%

solució de Denhardt 5x

SDS al 0,1%

esperma de salmó (200 µg/ml)

Solució d'hibridació

SSPE 5x

formamida desionitzada al 50%

solució de Denhardt 5x

SDS al 0,1%

sulfat de dextrà al 10%

esperma de salmó (200 µg/ml)

sonda marcada (10^6 cpm/ml; 2-10 ng/ml)

PROCEDIMENT:

1. Col·loquem la membrana en un tub d'hibridació. Hi afegim la solució de prehibridació (100 µl/cm² de membrana). L'incubem a 42°C amb agitació durant 3-6 hores.
2. Decantem la solució de prehibridació i hi afegim la solució d'hibridació. Ho incubem a 42°C i amb agitació durant 12-16 hores.
3. Decantem la solució d'hibridació i transferim la membrana a un contenidor amb SSC 2x. Ho rentem breument a temperatura ambient.
4. Ho rentem durant 20-30 minuts a 55°C amb una solució amb SSC 0,4x i SDS al 0,1%.
5. Ho rentem durant 20-30 minuts a temperatura ambient amb una solució amb SSC 0,1x i SDS al 0,1%.
6. Eixuguem la membrana per treure l'excés de líquid, la cobrim amb paper de plàstic i l'exposem a un film AGFA Curix RP2 en un expositor a -80°C.

IV. Materials i mètodes

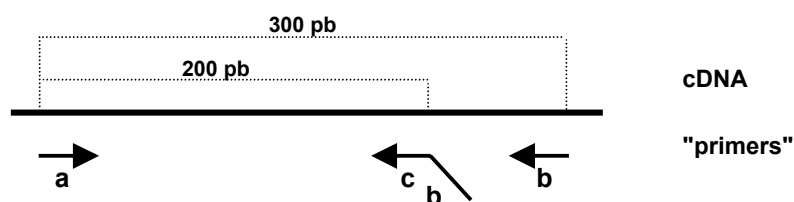
IV.7.2 PCR competitiva quantitativa

IV.7.2.1 Bases moleculars de la PCR competitiva quantitativa

La quantificació dels nivells d'mRNA o la detecció de canvis en aquests nivells utilitzant la tecnologia de PCR pot ser problemàtica deguda al caràcter exponencial de l'amplificació per PCR, on canvis molt petits en l'eficiència d'amplificació reneixen al final canvis dramàtics en la quantitat de producte amplificat. La PCR competitiva quantitativa usa un estàndard intern d'origen extern en una reacció de PCR competitiva, durant la qual, una sola parella de "primers" és usada per amplificar alhora el cDNA diana i l'estàndard intern afegit. L'estàndard intern és en essència un fragment homòleg al fragment que volem amplificar, que comprèn en gran part la mateixa seqüència, i que s'amplifica amb els mateixos "primers", dissenyat però, per donar un fragment amplificat de mida diferent a la del cDNA diana. D'aquesta manera l'eficiència d'amplificació és igual per l'estàndard intern que per la seqüència problema. Afegirem diferents concentracions d'estàndards a diferents tubs amb la mateixa quantitat de mostra i procedirem a l'amplificació. Aquell tub que després de la PCR doni la mateixa quantitat d'ambdós productes, és el que durà la mateixa concentració d'estàndard que de cDNA problema.

IV.7.2.2 Disseny de "primers"

Per amplificar i quantificar els tres gens en que parlem en aquesta tesi vam dissenyar "primers" que amplifiquessin productes específics d'aquests gens d'uns 300 pb i els "primers" adequats per sintetitzar uns estàndards de manera que aquests fossin amplificats amb el mateix joc de "primers" que el gen d'interès però donant un fragment de 200 pb's. Seguint l'esquema:



En que el "primer" **cb** s'anella al cDNA en el lloc de seqüència **c**, uns 100 pb a 5' del lloc de seqüència **b**, amb la particularitat de que el "primer" **cb** inclou la seqüència del "primer" **b** en el seu extrem 5'. El producte d'amplificació amb el joc de "primers" **a-cb** el clonarem en un vector. Aquest serà el nostre estàndard, que incorporarem en cada mostra a concentracions conegudes i serem capaços d'amplificar-lo amb el joc de "primers" **a-b**, al mateix temps que el gen endogen, ja que el "primer" **cb** conté al **b** en el seu extrem 5'. Així ho fem per cadascun dels tres gens que estudiem en aquesta tesi.

Mfn2 -a	5 - ATGCATCCCCACTTAAGCAC - 3
Mfn2 -b	5 - CCAGAGGGCAGAACTTTGTC - 3
Mfn2 -cb	5 - TAGAGTTGGGCCACATCACACCAGAGGGCAGAACTTTGTC - 3
DOR -a	5 - TGTACGTGCCTTTCACCTTG - 3
DOR -b	5 - CCAGCTTGAAGGAACCACTC - 3
DOR -cb	5 - CCCCTCACATAAAGCCACATCCAGCTTGAAGGAACCACTC - 3
P311 -a	5 - CTCGCCTGCCTGACTTAGAG - 3
P311 -b	5 - GTTGGGAGCAAGGACAAAAA - 3
P311 -cb	5 - CCTGCCCTGTCAAAAAGAAGAGTTGGGAGCAAGGACAAAAA - 3

Els "primers" **a** es van demanar marcats o no amb un fluorocrom en el seu extrem 5', perquè alguns experiments de PCR competitiva quantitativa es van realitzar al Centre de Recherche en Nutrition Humaine (Lyon, França), on existia la possibilitat de detectar i quantificar els diferents productes de PCR per fluorescència, un cop separats per electroforesi en un gel de seqüenciació de poliàcrilamida.

IV. Materials i mètodes

IV.7.2.3 Síntesi d'estàndards

L'estàndard intern, ha de ser una molècula de concentració coneguda que poguem afegir a cada reacció de PCR i que s'amplifiqui amb la mateixa eficiència que el gen l'expressió del qual vulguem quantificar. Per això interessa que sigui amplificable amb els mateixos "primers" que el gen endogen i que doni un fragment de mida diferent (per ser identificable), però no més que un 30% de diferència en longitud, per no tenir diferent eficiència en la síntesi de les molècules.

Ja hem explicat en l'apartat "Disseny de primers", de quina manera pensem els "primers" per tal de que al amplificar amb la parella **a-cb**, obtinguem un fragment de PCR que inclou en els extrems la seqüència **a** i la seqüència **b**. La distància entre la seqüència **a** i la seqüència **c** en el cDNA serà d'uns 200 pb. El primer **cb** s'anella sobre la seqüència **c**. però també pot anellar-se sobre la seqüència **b**; en aquest cas, però, no s'amplificaria perquè l'extrem 3' del "primer" (**c**) no faria de "motlle" per la DNA polimerasa al no anellar-se al DNA. Aquest fragment producte de l'amplificació **a-cb**, un cop clonat en un plàsmid, serà el nostre estàndard. S'amplificarà amb els primers **a-b**, però rendint un fragment de PCR d'uns 200 pb's, en lloc del fragment de 300 pb's que rendeix l'amplificació **a-b**, sobre el cDNA nadiu. Així podrem diferenciar en un gel d'agarosa el producte d'amplificació de l'estàndard respecte el gen endogen.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

cDNA de múscul esquelètic humà. (0,1 µg/µl)

"primers" **a** i **cb** de cada gen. (10 µM cada un)

dNTP mix (10 mM)

10x PCR tampó de reacció

50x Expand High Fidelity Polymerase Mix (Roche)

Termociclador.

pGEM-T Easy vector (PROMEGA)

T4 DNA Lligasa (3 U/ μ l) (PROMEGA) i el seu tampó de lligació 2x

Material estàndard de treball amb bacterïes.

Electroporador.

Kit de Miniprep (Quiagen)

PROCEDIMENT:

1. Sobre 1 μ l de cDNA de múscul esquelètic humà (0,1 μ g/ μ l) afegim 2,5 μ l de tampó de reacció de PCR, 1 μ l de cada "primer", 0,5 μ l de dNTP mix, i 0,25 μ l de Polymerase mix, i amplifiquem en 35 cicles (94°C 30"; 60°C 30"; 72°C 1min).
2. Correm els productes de PCR en gel d'agarosa, retallem i aïllem la banda de 200 pb.
3. Precipitem amb etanol i ressuspenem en 10 μ l, dels que prenem 3 μ l, que barregem amb 1 μ l de pGEM-T Easy vector, 5 μ l de 2x tampó de lligació, 1 μ l de T4 DNA Lligasa, i incubem a 16°C durant la nit.
4. Electroporem 5 μ l de la lligació en bacterïes competents.
5. A partir d'una colònia discreta seguim el protocol de Miniprep (Quiagen). Quantifiquem la preparació de plàsmid, i seqüenciem l'insert.
6. Aliquotem i rotulem l'estàndard com a M0 a 100 atomols/ μ l i ho conservem a -20°C.

IV.7.2.4 Síntesi de cDNA

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

mRNA poli-A (2 μ g)

Transcriptasa reversa MMLV (200 U/ μ l)

IV. Materials i mètodes

"primer" **b** de cada gen (10 μ M)

5x tampó de primera cadena

250 mM Tris-HCl (pH 8.3)

30 mM MgCl₂

375 mM KCl

PROCEDIMENT:

1. Per cada cDNA, combinem 2 μ g d'mRNA poli-A, amb 1 μ l de "primer" **b** (10 μ M) i afegim aigua estèril fins a 5 μ l. Barregem i centrifuguem els tubs breument a la centrifuga.
2. Incubem a 70°C en un termociclador durant 2 minuts.
3. Refredem els tubs en gel 2 minuts i centrifuguem breument.
4. Afegim 2 μ l del 5x tampó de primera cadena
 - 1 μ l dNTP mix (10mM de cada)
 - 1 μ l Aigua estèril
 - 1 μ l Transcriptasa reversa MMLV (200 U/ μ l)
6. Incubem a 42°C 1.5 h a l'estufa. Per evitar evaporació del volum de reacció.
7. Parem la reacció incubant a 75 °C 10 min. Diluïm les mostres 1/10 en aigua estèril.

IV.7.2.5 Amplificacions PCR competitives.

Alguns dels experiments es van dur a terme al Centre de Recherche en Nutrition Humaine (Lyon, França), on existia la possibilitat de detectar i mesurar les bandes de productes de PCR amplificats per fluorescència, un cop separats aquests per electroforesi en un gel de seqüenciació

de poliacrilamida. En aquest cas es feia servir el "primer" **a** marcat en el seu extrem 5' amb un fluorocrom.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

cDNA de cada mostra (0,02 µg/µl)

"primers" **a** i **b** de cada gen. (10 µM cada un)

dNTP mix (10 mM)

10x PCR tampó de reacció

50x Expand High Fidelity Polymerase Mix (Roche)

Termociclador

Prepararem, immediatament abans de cada PCR un Master Mix com segueix:

Component	Volum per reacció (µl)
Aigua estèril	37,6
10x PCR tampó de reacció	5,0
dNTP mix (10 mM)	1,0
Nested PCR primer 1 (10µM)	2,0
Nested PCR primer 2 (10µM)	2,0
50x Expand High Fidelity Polymerase Mix	1,0
Final	46,0

PROCEDIMENT:

1. Rotulem vuit tubs de PCR de M1 a M8 i afegim 9 µl d'aigua estèril a cadascun.
2. Preparem una sèrie de dilucions 1/10 entre M1 (10 amols/µl) i M8 (10^{-6} amols/µl), partint de la solució "stock" M0 (100 amols/µl), pipetejant 1 µl d'aquesta solució en el

IV. Materials i mètodes

tub M1, barreiant, agafant 1 μl amb una punta nova del tub M1 i afegint-lo a M2 ... i així successivament.

$$M1 = 10 \text{ amols}/\mu\text{l}$$

$$M2 = 1 \text{ amols}/\mu\text{l}$$

$$M3 = 10^{-1} \text{ amols}/\mu\text{l}$$

$$M4 = 10^{-2} \text{ amols}/\mu\text{l}$$

$$M5 = 10^{-3} \text{ amols}/\mu\text{l}$$

$$M6 = 10^{-4} \text{ amols}/\mu\text{l}$$

$$M7 = 10^{-5} \text{ amols}/\mu\text{l}$$

$$M8 = 10^{-6} \text{ amols}/\mu\text{l}$$

3. La sèrie de dilucions pot ser guardada a -20°C .
4. Preparem 8 nous tubs de PCR i afegim a un tub per cada solució M1-M8
 - 2 μl de cDNA (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
 - 2 μl de dilució d'estàndard (M1 a M8)
 - 46 μl de PCR Master Mix.
5. Fem PCR en el termociclador a 35 cicles (94°C 30"; 60°C 15"; 72°C 30"), i analitzem 5 μl dels productes de PCR en un gel d'agarosa com està descrit.
6. Determinem a quina concentració d'estàndard s'amplifiquen igual el gen específic (producte de 300 pb) que l'estàndard (producte de 200 pb). Llavors usem la dilució 10 vegades menys diluïda per fer el següent banc de dilucions 1/2.
7. Rotulem sis tubs de PCR de 2M1-2M6 i afegim 5 μl d'aigua estèril a cadascun.
8. Fem una sèrie de dilucions 1/2 de la mateixa manera que s'ha descrit en el punt 2 entre 2M1 i 2M6.

$$2M1 = M_x \text{ (essent } M_x \text{ un d'entre M1-M8)}$$

$$2M2 = M_x/2$$

$$2M3 = M_x/4$$

$$2M4 = M_x/8$$

$$2M5 = Mx/16$$

$$2M6 = Mx/32$$

9. Preparam 6 nou tubs de PCR i afegim a un tub per cada solució 2M1-2M6

2µl de cDNA (0,02 µg/µl)

2µl de dilució d'estàndard (M1 a M8)

46 µl de PCR Master Mix.

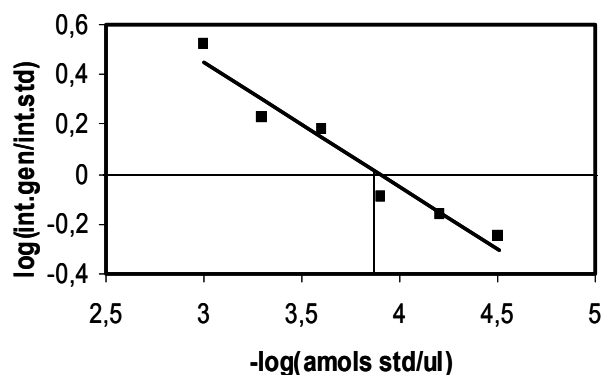
10. Fem PCR en el termociclador a 35 cicles (94°C 30"; 60°C 15"; 72°C 30"), i analitzem 5 µl dels productes de PCR per electroforesi.

11. En aquest punt, segons treballem amb tinció de bromur d'etidi o amb fluorescència, optem per una de les dues opcions: (1) Fem una fotografia no saturada del gel d'agarosa amb les bandes tenyides de bromur d'etidi, i mesurem la intensitat de les bandes per densitometria. (2) Separem els fragments amplificats en un gel de poliacrilamida amb un sistema d'excitació i lectura de fluorescència acoblat, i mesurem la intensitat de les bandes per fluorescència.

Independentment del mètode de detecció i mesura de la intensitat de les bandes dels productes de PCR projectem en una gràfica:

eix abscisses: $-\log(\text{concentració estàndard})$

eix ordenades: $\log(\text{intensitat bandes gen problema} / \text{intensitat bandes estàndard})$



S'espera una recta, que pot perdre linealitat en els seus extrems. El càlcul de la concentració del cDNA del gen d'interès s'obté extrapolant sobre l'eix d'abscisses el punt de la recta que talla l'horitzontal que passa sobre el zero en l'eix d'ordenades. Aquesta és la concentració teòrica d'estàndard a la qual l'amplificació és idèntica per l'estàndard que pel gen específic i per tant s'assumeix que estem parlant de la mateixa concentració.

IV.8 AMPLIFICACIÓ SMART™ RACE DE cDNA

Aquesta tècnica ens permet amplificar un cDNA específic del nostre interès assegurant-nos d'incorporar l'extrem 3' i el 5' del cDNA. En aquesta tesi es va fer servir per clonar i seqüenciar l'extrem 5' del mRNA de Mitofusina-2 i DOR, i constatar que coincidia amb el que s'havia publicat a les bases de dades. Es va seguir el manual d'usuari del kit de Clontech SMART™ RACE cDNA Amplification, i el reproduïm aquí, en la part que vam fer servir, per clonar l'extrem 5' del mRNA de Mitofusina-2 i DOR. Considerem que és d'interès i que és factible reproduir-ho amb els reactius d'ús corrent al laboratori.

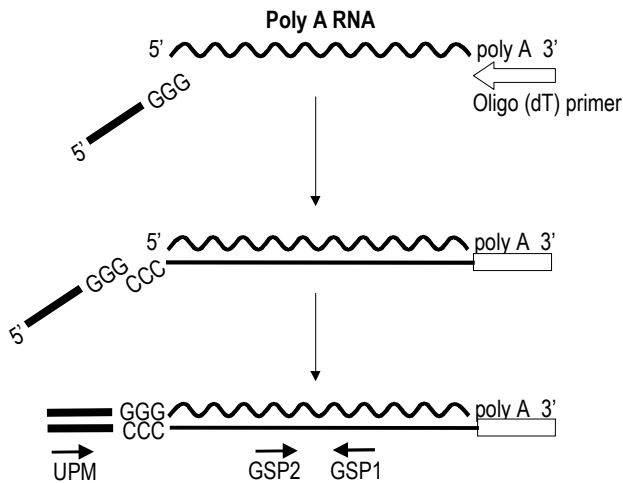
IV.8.1 Disseny de "primers"

Cal dissenyar i demanar "primers" específics del gen que volem amplificar, anomenats GSP1 i GSP2. Els "primers" els dissenyem seguint les consideracions generals de disseny de "primers" per PCR (Sambrook *et al.*, 1989). Però en concret procurem que la temperatura de fusió sigui la més alta possible.

En concret vam fer servir,

Mfn2-a (GSP1)	5-ATGCATCCCCACTTAAGCAC-3
Mfn2-b (GSP2)	5-CCAGAGGGCAGAACTTTGTC-3
DOR-GSP1	5-GCCATCCCAAGGCTGACAGCTCAGT-3
DOR-NGSP1	5-GGAGAAGGGGAGGGGGATCATAGGG-3

IV.8.2 Síntesi de la primera cadena de cDNA



La clau de la tècnica és la síntesi del cDNA que es fa amb l'OligoSMART. Aquest oligonucleòtid acaba amb 3 G (guanoses) al seu extrem 3' que permeten el seu anellament amb l'extrem del cDNA que la retrotranscriptasa va sintetitzant. La retrotranscriptasa, de manera general, afegeix unes quantes citosines al arribar al final del motlle

d'mRNA, que queden com a extrem 3' protuberant. Aquí és on s'anella l'OligoSMART de manera que continua fent de motlle per l'acabament de la reacció de retrotranscripció, i la seva seqüència queda incorporada en el cDNA recent sintetitzat.

IV. Materials i mètodes

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

SMART-Oligo (10 µM) 5 - AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG - 3

5'-RACE cDNA "primer" (5'CDS; 10 µM) 5' - (T)₂₅N-₁N-3'

5x Tampó de primera cadena

 250 mM Tris-HCl (pH 8.3)

 375 mM KCl

 30 mM MgCl₂

Ditiotreitol (DTT; 20mM)

Aigua estèril

Total RNA (2µg)

Transcriptasa reversa MMLV (200 U/µl)

Tricine-EDTA tampó

 10 mM Tricine-KOH (pH 8.5)

 10.0 mM EDTA

dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP cadascun a 10 mM)

PROCEDIMENT:

1. Combinem el següent en tubs de PCR

 1-3 µl RNA (2 µg)

 1 µl 5'CDS "primer"

 1 µl SMART-Oligo

2. Afegim fins a 5 µl d'aigua estèril, barregem i incubem a 70°C 2 min.
3. Refredem els tubs en gel 2 min.
4. Afegim a cada tub
 - 2 µl 5x tampó de primera cadena
 - 1 µl DTT (20 mM)
 - 1 µl dNTP Mix (10 mM)
 - 1 µl Transcriptasa reversa MMLV (200 U/µl)
5. Barregem per pipeteig i incubem a 42°C durant 1,5 hores a l'estufa.
6. Diluïm la reacció afegint 90 µl de Tricine-EDTA.
7. Escalfem a 72°C durant 7 min i els conservem a -20°C. Aquest és el nostre 5'RACE cDNA.

IV.8.3 Amplificacions d'extrems de cDNA

Sovint el que es pretén amplificar és un fragment de cDNA poc representat en el total de la població, com típicament passa amb els extrems 5' dels mRNA's, llavors recorrem a variacions de la PCR. És el cas de la PCR Touchdown i de la Nested PCR, que es van fer servir aquí per l'amplificació de DOR. En la PCR Touchdown comencem l'amplificació a una temperatura d'anellament molt alta per evitar anellaments inespecífics, tot i comprometre el rendiment de la reacció, a continuació l'anem baixant progressivament de manera que quan la reacció comença a ser molt ràpida ja l'hem enriquit en el nostre producte específic i no és tant fàcil tenir productes inespecífics. La Nested PCR és una PCR secundària sobre el producte d'amplificació de la primera en que es fan servir uns "primers" interns respecte els "primers" inicials, que troben anellament en

IV. Materials i mètodes

el producte de la primera PCR. Serveix per aplicar més cicles d'amplificació al mateix producte de PCR.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

5' RACE cDNA

10x Universal "primer" Mix (UPM)

Long (0,2 µM):

5 - CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT - 3

Short (1 µM):

5 - CTAATACGACTCACTATAGGGC - 3

Nested Universal "primer" (NUP; 10µM)

5 - AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT - 3

50x Expand High Fidelity Polymerase Mix (Roche)

10x Tampó de PCR High Fidelity (Roche)

50x dNTP Mix (10 mM de cada)

"primer" GSP1 (10 µM) (per MFN-2 i DOR)

"primer" GSP2 (10 µM) (per MFN-2)

"primer" NUP (10 µM) (per DOR)

"primer nested" NGSP1 (10 µM)

PROCEDIMENT:

1. Preparam una Master Mix per totes les reaccions de PCR mes una extra per assegurar el suficient volum, barrejant, per cada tub, els següents reactius:

34.5 µl aigua estèril

5 µl 10x Tampó de PCR High Fidelity (Roche)

1 µl dNTP Mix (10 mM)

1 µl 50x Expand High Fidelity Polymerase Mix (Roche)

2. Per la 5'RACE PCR preparem els següents tubs:

Component	1	2	3	4
	5'RACE Mostra (µl)	GSP 1-2 Ctrl + (µl)	UPM sol Ctrl - (µl)	GSP1 sol Ctrl - (µl)
5'RACE cDNA	2,5	2,5	2,5	2,5
UPM (10x)	5	-	5	-
GSP1 (10 µM)	1	1	-	1
GSP2 (10 µM)	-	1	-	-
Aigua estèril	-	4	1	5
Master Mix	41,5	41,5	41,5	41,5
Final				46,0

3. Cobrim els tubs amb una gota d'oli mineral i fem la reacció de PCR

Per Mitofusina-2 durant 35 cicles: 94°C 30"; 58°C 30"; 72° 2 min.

Va ser prou per obtenir bandes discretes quan analitzàrem 5 µl de reacció en un gel d'agarosa.

Per DOR fem PCR Touchdown (rebaixant progressivament la temperatura d'anellament, incrementa l'especificitat de l'amplificació):

5 cicles: 94°C 30"; 72°C 3 min.

5 cicles: 94°C 30"; 70°C 30"; 72°C 3 min

25 cicles: 94°C 30"; 65°C 30"; 72°C 3 min

Per DOR no disposàvem de "primer" GSP1. A més per les característiques de l'amplificació d'aquest fragment en particular ens vam veure obligats a fer servir el protocol de PCR Touchdown i posteriorment una 'Nested' PCR (PCR secundària utilitzant "primers" interns o també anomenats "nested"), com segueix.

4. Per DOR, vam diluir 5 µl del producte de PCR en 245 µl de tampó Tricine-EDTA.

IV. Materials i mètodes

5. Repetirem els passos de l'1 i 2 com a dalt, fent servir, 5 µl del producte de la primera PCR diluït en lloc del 5'RACE cDNA i 1 µl de NUP i de NGSP1 com a "primers".
6. Amplifiquem durant 30 cicles: 94°C 5"; 68°C 10"; 72°C 3min, i correm 5 µl del producte de reacció en un gel d'agarosa.
7. Podem conservar els productes de reacció a -20°C. Igualment pot ser convenient comprovar l'especificitat de les bandes per Southern Blot abans de retallar-les, clonar-les i seqüenciar-les.

IV.8.4 Anàlisi per Southern Blot

En ocasions poden amplificar-se varies bandes amb les PCR, que poden significar diferents formes del mRNA o també amplificacions inespecífiques. Per obtenir més forta evidència de l'especificitat de les bandes amplificades pot ser convenient fer un anàlisi per Southern Blot dels productes de PCR correguts en el gel d'agarosa, (Sambrook *et al.*, 1989). Com a sonda fem servir un oligonucleòtid intern i específic del fragment amplificat. Típicament el "primer" GSP2. No ens estendrem aquí en explicar el protocol de Southern, però breument:

1. Examinem els productes de RACE en gel d'agarosa/bromur d'etidi
2. Fotografiem el gel i fem una transferència a membrana de niló seguint el protocol estàndard.
3. Preparem com a sonda el "primer" GSP2 per marcatge terminal.
4. Hibridem la sonda amb la membrana, rentem i exposem un film de raig-x.
5. Comparem el patró d'hibridació amb la fotografia del gel d'agarosa. Aïllem aquelles bandes que apareguin en ambdós.

IV.8.5 Clonatge i seqüenciació dels fragments

Ho fem seguint protocols estàndards de "Tècniques bàsiques de manipulació del DNA".

Però breument.

1. Purifiquem del gel d'agarosa les bandes d'interès.
2. Clonem directament en un plàsmid de tipus T/A com el pGEM-T Easy (PROMEGA).
3. Transformem la lligació i piquem unes quantes colònies.
4. Fem Miniprep (Quiagen) de plàsmid, i seqüenciem amb "primers" sobre el vector (T7 o T3, pel pGEM-T Easy vector).

IV.9 EINES BIOINFORMÀTIQUES

El material necessari per la feina computacional descrita en aquesta tesi és limita a un ordinador personal connectat a un servidor d'Internet (porthos.bio.ub.es). Per la connexió "on line" es va fer servir Netscape v.4.5 Navigator.

IV.9.1 Descripció de les bases de dades usades

IV.9.1.1 GeneBank

La base de dades de seqüències GeneBank del National Center of Biotechnology Information (NCBI) col·lecciona seqüències de DNA de totes les fonts públiques disponibles (Benson *et al.*, 1998). Les seqüències són enviades directament pels laboratoris o adquirides de les

IV. Materials i mètodes

bases de dades públiques internacionals, European Molecular Biology Laboratory (EMBL) i DNA Database of Japan (DDBJ). Cada seqüència de DNA és acompanyada de la seqüència de proteïna que s'en deriva i d'informació referent a la font de la seqüència, publicacions, localització cromosòmica i altres informacions rellevants proporcionades pel laboratori que l'envia. Un programa de cerca basat en paraules clau pot fer-se servir per trobar totes les seqüències disponibles d'interès (GeneBank Database Query Form: http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html). L'enviament de noves seqüències es fa "on line" amb el GeneBank a través de l'utilitat BankIt a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/index.html>.

IV.9.1.2 Expressed Sequence Tags Database (dbEST)

Els "afegits de seqüències expressades" (EST's; Expressed Sequence Tags) són seqüències curtes corresponents a gens expressats seleccionats a l'atzar de llibreries de cDNA de diferents teixits i organismes (Boguski *et al.*, 1999). Aquestes seqüències estan introduïdes a l'Expressed Sequence Tags Database (dbEST; una divisió del GeneBank), junt amb informació sobre la font de la llibreria de cDNA, la longitud del clon de cDNA, i la localització cromosòmica del gen. Aquesta informació està disponible a http://www.ncbi.nlm.nih.gov/irx/dbST/dbest_query.html. Humà i ratolí són les espècies més representades a la base de dades. La disponibilitat comercial dels clons de cDNA EST i la possibilitat d'una ràpida i fàcil anàlisi "on line" d'aquestes seqüències usant les eines bioinformàtiques (veure a sota) fan de dbEST una molt poderosa font per la identificació de cDNA's. Alguns punts han de ser considerats quan es treballa amb EST's: (1) com que els EST's són obtinguts a partir de la seqüenciació d'una sola de les cadenes de cDNA, algun d'ells pot contenir errors. (2) Els clons de cDNA EST són clons de cDNA parcial. En algun cas, especialment per cDNA's curts, pot ser que aparegui el cDNA sencer. (3) La majoria de llibreries de cDNA estan construïdes usant un "primer" poli-dT, per la síntesi de cDNA a partir de l'RNA. Per això la base de dades està enriquida en fragments de l'extrem 3' dels cDNA's, incloent en molts

casos les regions 3'UTR (no traduïdes) i essent menys representades les regions codificants. (4) Alguns cDNA's són representats per més d'un EST. Un clon de cDNA és identificat per un nombre d'identificació de clon de cDNA EST, tal com 345654, Els EST's també són identificats per un codi de lletres i nombres tal com AA256176. (5) Molts EST's estan mal classificats i no corresponen a la informació que es dóna en la base de dades. (6) Alguns cDNA's poden contenir introns. Al ser un procés molt automatitzat la generació de clons EST i la seva seqüenciació pot induir a errors. La seqüència de DNA i altres informacions sobre els clons d'EST's es poden obtenir a partir de la pàgina del GeneBank Database esmentada més a dalt. Altres importants informacions, com la seqüència oposada i la mida del clon es pot trobar utilitzant el LENS Clone Browser a <http://agave.humgen.upenn.edu/cgi-bin/lens/scripts/browse/browseClone.perl>.

IV.9.1.3 Unigene

La base de dades d'Unigene conté més de 50.000 "clusters" humans no redundants, cadascun d'ells representant el producte de transcripció d'un gen diferent. Això representa teòricament el 100% del nombre estimat actualment de gens humans. Els "clusters" són generats per comparació dels EST's entre si per esbrinar quins d'ells provenen de la transcripció del mateix gen, i exclou aquells que tot i ser similars, provenen d'un gen diferent. La base de dades ha estat creada inicialment per humà, ratolí, i rata, però a hores d'ara ja s'hi poden trobar "clusters" d'altres espècies com peix zebra, vaca, granota, arròs, blat.... A més de tots els EST's que formen un determinat "cluster", ordenats per mida, Unigene també proporciona informació com la localització cromosòmica i seqüències de cDNA sencers relacionats si hi són disponibles. Més encara, cada EST de la llista és mostrat junt a informació com similitud a proteïnes conegudes, o contingut de senyal de poliadenilació, o altres. Unigene es troba a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>

IV. Materials i mètodes

IV.9.1.4 Tentative Human Consensus (THC)

La base de dades de Tentative Human Consensus, al The Institute of Genome Research (TIGR), és similar a Unigene en la formació dels "clusters" corresponents al mateix gen. El principal avantatge sobre la base de dades d'Unigene és la representació gràfica de cada EST, el qual permet la ràpida identificació dels extrems oposats de cada clon, i la disponibilitat directa de la seqüència del "cluster" sencer. Aquesta base de dades pot ser analitzada directament des d'un programa BLAST per identificar altres "clusters" amb similitud de seqüència. L'eina de cerca BLAST que cerca al THC és a : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/THCBlast/nph-thcbblast>

IV.9.1.5 Tigem Net Sequence Database

Aquesta base de dades, alimentada de la base de dades dbEST (NCBI) està associada a la màquina d'ensamblatge d'EST. Aquest programa, com el descrit més amunt, també forma "clusters" a partir d'EST's per similitud de seqüència, però a diferència de les altres et mostra tots els EST's del "cluster" alineats entre ells per seqüència. Un enllaç directe a la pàgina web de la màquina d'ensamblatge d'EST's és a <http://gcg.tigem.it>

IV.9.2 Eines informàtiques per l'anàlisi de seqüències

IV.9.2.1 Basic Local Alignment Tools (BLAST)

Els programes BLAST es fan servir per cercar en les bases de dades de proteïnes i DNA per similitud de seqüència. Aquests programes comparen una seqüència de proteïna o DNA problema contra totes les seqüències de la base de dades, en qualsevol combinació possible, amb seqüències de DNA que sovint són traduïdes a proteïna abans de fer la comparació. Els programes BLAST combinen velocitat i sensibilitat. El temps requerit per obtenir els resultats és proporcional a la mida de la seqüència i de la base de dades utilitzada per la cerca. Els més recents programes Gapped BLAST són més sensibles que el BLAST original, ja que creen petits forats on la seqüència pot ser interrompuda, i d'aquesta manera poden trobar amb més facilitat similituds de seqüència allà on hi ha petites insercions, delecions o errors de seqüència. Els resultats dels programes de BLAST són presentats com una llista d'alineaments de més a menys qualitat entre les seqüències trobades a la base de dades i la seqüència problema enviada. Gapped BLAST el podem trobar a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/> . Diferents subprogrames poden ser usats contra diferents base de dades . Les següents base de dades varen ser utilitzades en aquest treball amb Gapped BLAST: (1) “**non-redundant**” (**o nr**), la qual compila seqüències de DNA no redundants (a part d'EST's), i seqüències de proteïnes (seqüències de DNA del GeneBank traduïdes mes SwissProt, EMBL, Spupdate i PRI); (2) base de dades de **genòmic**, que comprenen totes les seqüències conegudes, més o menys ordenades i localitzades, que fan referència al genoma de determinada espècie. En concret es van usar les de humà, rata, ratolí, i *S.cerevisiae*; (3) **dbEST**, descrites abans. Les possibilitats del programa BLAST són:

- BLASTn, compara seqüències problema de DNA contra base de dades de DNA.
- BLASTp, compara una seqüència de proteïna contra bases de dades de proteïnes.

IV. Materials i mètodes

- BLASTx, tradueix una seqüència problema de DNA a les sis possibles pautes de lectura i les compara contra bases de dades de proteïnes.
- tBLASTn, compara una seqüència peptídica problema contra les seqüències peptídiques obtingudes de la traducció de base de dades de DNA (com dbEST).
- tBLASTx, tradueix les dues, la seqüència problema de DNA i les seqüències de DNA de les bases de dades i compara totes les seqüències peptídiques resultants.

IV.9.2.2 CLUSTALW per alineament múltiple de seqüències

Aquest programa compara múltiples seqüències de DNA o de proteïnes i mostra el millor alineament possible. Dos diferents adreces d'Internet han estat usades en aquest estudi: al Baylor College of Medicine (BCM; <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>), la qual permet multialineaments de fins a trenta seqüències de DNA o de proteïna però no mostra els residus conservats; o al European Bioinformatic Institute (EBI; <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>), la qual indica els residus conservats o nucleòtids i descriu la identitat en percentatge entre les seqüències enviades. Aquesta última pàgina de web també permet la construcció d'arbres filogenètics.

IV.9.2.3 Eines per l'anàlisi de proteïnes

L'anàlisi de seqüències de proteïnes per determinar la seva estructura i funció és un conjunt de metodologies que encara necessita molt desenvolupament. Tot i així hi ha multitud de grups en el món desenvolupant eines informàtiques a tal efecte i molts programes estan a disposibilitat de l'usuari, gratuïtament, en Internet. A partir de la seqüència de proteïna, aquests programes permeten detectar motius de tall per proteases, senyals de localització intracel·lular,

motius de glucosidació, de fosforilació... etc. O fets més complexes, com dominis GTPasa, dominis d'unió a receptors o a àcids nucleics... O també permeten predir amb més o menys fidelitat com serà l'estructura secundària de la proteïna (hèlix α , làmines β , desestructurat). Més recentment i al límit de les possibilitats de la bioinformàtica, ara mateix, s'han desenvolupat els programes de predicció de plegament. Aquests programes pretenen predir l'estructura 3D de la proteïna a partir de la informació de la seva seqüència i hi ha de dos tipus. Els primers comparen la seqüència de la proteïna problema amb les seqüències de totes les proteïnes de les quals es coneix per mètodes experimentals (RMN o difracció de raigs X) la seva estructura. Agafant les proteïnes d'estructura coneguda que més s'assemblen s'intenta "forçar" la proteïna problema a adoptar la mateixa estructura terciària optimitzant-la, a posteriori, mitjançant petits canvis, tenint en compte impediments estèrics, relacions d'hidrofilia-hidrofobicitat, i altres interaccions no covalents entre els seus àtoms. Només es consideren fiables models fets a partir de seqüències amb una identitat major d'un 30%. El segon tipus de programes el que fa és calcular, a priori, l'estructura secundària de la proteïna a partir de la seqüència. És a dir, la successió d'hèlix α , làmines β , etc. Això està més desenvolupat i permet a continuació comparar el model resultant amb les estructures secundàries de les proteïnes de les que es coneix l'estructura 3D per mètodes experimentals. Aleshores s'aplica a la proteïna problema el mateix plegament d'aquella proteïna coneguda a nivell 3D que més s'assembla a nivell d'estructura secundària.

Hi ha infinitat de pàgines web on es poden trobar gratuïtament programes per analitzar seqüències de proteïna i unes es criden a les altres. Aquí voldria fer esment del que probablement siguin els llocs web més complets i alhora estructurats en aquesta matèria: <http://www.expasy.ch> de l'Expasy Molecular Biology Server a Suïssa i <http://mbcr.bcm.tmc.edu/services.html> del Baylor College of Medicine.

IV.9.3 Altres llocs web d'interès

- MEDLINE Entrez: base de dades de publicacions.

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbinost/Entrez/>

- Hydrofobicity Plots: útil per detectar segments transmembrana.

<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/plthydroph.html>

- Pedro's Molecular Biology Tools: un dels més complets enllaços a pàgines d'utilitats per Biologia Molecular.

http://www.publi.iastate.edu/~pedro/rt_all.html

- Weizmann Institute Genome and Bioinformatics.

<http://bioinfo.weizmann.ac.il>

- Sequence Interpretation Tools

<http://www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html>

- Radiation hybrid maps at the Stanford Human Genome Center (SHGC)

<http://www-shgc.stanford.edu/sitemap.html>

- The molecular biology database list (Burks *et al.*, 1999)

http://www.oup.co.uk/nar/Volume_27/issue_01/summary/gkc105_gml.html

IV.10 CULTIUS CEL·LULARS

IV.10.1 Condicions generals

La manipulació de les línies cel·lulars s'ha dut a terme seguint les condicions habituals d'esterilitat amb la finalitat de minimitzar qualsevol risc de contaminació. Aquesta manipulació s'ha realitzat en campanes de flux laminar equipades amb un encenedor Bunsen. La superfície de treball ha estat rentada amb etanol al 70% tant en començar el treball com en acabar-lo, a més de ser irradiada amb raigs UV quan la campana no era utilitzada. El material utilitzat (pipetes, tubs de centrífuga, plaques de cultiu, etc.), així com les solucions (medis, reactius, antibiòtics...), s'ha comprat estèril (qualitat per ús en cultius cel·lulars) o bé s'ha esterilitzat en un autoclau (120°C, 25 min) o per filtrat (filtres de 0,22 µm de diàmetre, Schleicher & Schuell).

IV.10.2 Medis i reactius

Com que les línies cel·lulars estudiades (fibroblasts i mioblasts) tenen uns requeriments semblants s'han emprat les mateixes tècniques i uns medis semblants en tots els casos.

Solucions d'estoc:

Medi DMEM (BioWhittaker), amb 4,5 g/l de glucosa, sense glutamina

FBS o sèrum boví fetal (BioWhittaker): prèviament a la seva utilització s'inactiva escalfant-lo a 56°C al durant de 30 minuts. A continuació s'aliqota en tubs estèrils de 50 ml i es guarda a -20°C o a 4°C quan s'ha d'utilitzar immediatament.

Glutamina (BioWhittaker) 200 mM.

Penicil·lina/estreptomicina (BioWhittaker) 10.000 U/ml:10.000 µg/ml.

HEPES 1,25 M pH 7,4, filtrat per 0,22 µm i guardat a 4°C.

IV. Materials i mètodes

Versene 1.000x: EDTA 20% (p/v) pH 8, filtrat per 0,22 µm i guardat a 4°C.

Pancreatina 4x (Gibco).

Geneticina (G-418 sulfat, Gibco). Es prepara una solució de 100mg/ml en aigua destil·lada i a continuació es filtra. Aquesta solució s'aliqota i es congela a -20°C protegida de la llum. També s'ha utilitzat darrerament una solució de geneticina ja llesta per ser usada de 50 mg/ml (Life Technologies). Aquesta es manté a 4°C protegida també de la llum.

Preparació de medis i reactius:

PBS-Versene: Versene 1.000x diluït 1/1.000 en PBS.

Pancreatina 1/5: Pancreatina diluïda 1/5 amb PBS-Versene. Es conserva en alíquotes a -20°C.

Medis complets: a un volum adequat de DMEM s'hi afegeix:

HEPES 25 mM (dilució 1/50 de l'estoc). Proporciona un sistema addicional de tamponament del medi a més de l'establert per l'incubador de CO₂ (CO₂/HCO₃⁻).

Penicil·lina 100 U/ml i estreptomycina 100 µg/ml (dilució 1/100 de l'estoc). Aquests antibiòtics prevenen l'aparició de contaminacions.

Glutamina 2 mM (dilució 1/100 de l'estoc). Aquest aminoàcid és molt inestable per això es compra el DMEM sense aquest i se suplementa en preparar el medi.

Sèrum inactivat. S'afegeix al 10% (v/v) en el medi de creixement.

Geneticina 0,5 mg/ml (en els medis que requereixen selecció per aquest antibiòtic).

Habitualment es prepara un volum de 500 ml de medi que es conserva a 4°C fins a un màxim de 4-6 setmanes. Els medis s'escalfen a 37°C abans d'afegir-los a les cèl·lules per evitar sotmetre-les a estrès tèrmic.

IV.10.3 Tècniques generals

El treball amb línies cel·lulars comporta el seu manteniment (descongelació i amplificació) i la seva conservació (congelació).

IV.10.3.1 Descongelació dels estocs

Els estocs cel·lulars es conserven en criotubs dins de tancs de nitrogen líquid durant anys. Per períodes més curts (setmanes o mesos) es poden conservar a -80°C . Per descongelar-los generalment hem seguit el següent protocol:

1. Es descongela ràpidament el vial (criotub) a 37°C .
2. Es posa el contingut del vial dins d'un tub de centrifuga de 15 ml amb 5-10 ml de medi complet o DMEM
3. Se centrifuga a 1.000 rpm durant 5 minuts.
4. S'elimina el sobrenedant. Aquests darrers 3 passos serveixen per eliminar les restes de DMSO (crioprotector) que hi ha al medi de congelació.
5. Es ressuspén el precipitat en un volum adient de medi complet.
6. Se sembra la ressuspensió en un flascó, o placa, de superfície escaient. Si el cultiu és recent i s'espera una alta viabilitat de les cèl·lules es pot sembrar en un flascó de 75 cm^2 , si, per contra, es tracta d'un cultiu congelat fa molt de temps és convenient sembrar-lo en una placa de $3,5\text{ cm}^2 \text{ Ø}$ o en un flascó de 25 cm^2 . Per aconseguir un repartiment homogeni de les cèl·lules s'agita la placa o flascó perpendicularment en direcció nord-sud i est-oest.
7. Esperem que les cèl·lules arribin a un 75-80% de confluència i procedim segons els protocols de manteniment de la línia cel·lular .

IV. Materials i mètodes

Alternativament, quan no es disposa de prou temps o de centrífuga, els cultius es poden descongelar seguint el següent protocol:

1. Es descongela ràpidament el vial (criotub) a 37°C.
2. Es posa el contingut del vial dins d'un tub de centrífuga de 15 ml amb el volum de medi complet en què es mantindrà el cultiu (15 ml si es sembra en un flascó de 75 cm², 10 ml si es sembra en una placa de 10 cm Ø o 2-3 ml si se sembra en una placa de 3,5 cm Ø).
3. Se sembra la dilució en un flascó, o placa, de superfície escaient. Si el cultiu és recent i s'espera una alta viabilitat de les cèl·lules es pot sembrar en un flascó de 75 cm²; si, per contra, es tracta d'un cultiu congelat fa molt de temps, és convenient sembrar-ho en una placa de 3,5 cm Ø o en un flascó de 25 cm². Es reparteixen les cèl·lules homogèniament agitant la placa o flascó en direcció nord-sud i est-oest.
4. A les 3-4 h es canvia el medi amb la finalitat d'eliminar el DMSO procedent del medi de congelació.

Aquest segon protocol es menys recomanable ja que exposa les cèl·lules a la presència de DMSO encara que aquest es trobi molt diluït.

IV.10.3.2 Manteniment del cultiu cel·lular

Una vegada que tenim el cultiu creixent, ens interessa mantenir-lo en divisió o bé amplificar-lo. Amb els tipus cel·lular que hem treballat, sobretot en el cas de les línies mioblàstiques, s'ha de prevenir un excés de confluència ja que aquestes cèl·lules poden alterar les seves característiques bioquímiques i funcionals pròpies, fins i tot perdre la capacitat de diferenciar-se si sobrepassen una confluència del 80%-85%. El procediment ha estat el següent:

1. Es treu el medi en que les cèl·lules estan creixent.
2. Es renten amb PBS-Versene (uns 5 ml). Es procura no llençar el contingut de la pipeta damunt les cèl·lules per no arrencar-les del flascó. L'EDTA present segresta els ions Ca^{2+} necessaris pel manteniment de l'adhesió cel·lular al substrat.
3. S'afegeix 1 ml de pancreatina diluïda (1/5). Quan s'han fet servir flascons o plaques amb una superfície diferent aquest volum s'ha variat proporcionalment.
4. S'agita suaument el flascó o placa per repartir la pancreatina (en direcció nord-sud i est-oest). Quan les cèl·lules es desenganxen, si hi ha un alt grau de confluència, és fàcil veure un "núvol" blanquinós surant al líquid; són les cèl·lules desenganxades.
5. S'afegeixen 5 ml de medi o DMEM (proporció 1:5 del volum de proteasa afegit) per diluir la pancreatina que digereix les proteïnes (integrines i proteïnes relacionades) que mantenen adherida la cèl·lula al substrat. Cal evitar una exposició excessiva ja que la pancreatina pot arribar a digerir les proteïnes de la superfície cel·lular (receptors, transportadors...) comprometent-ne la viabilitat.
6. Es passa aquest volum a un tub de centrifuga estèril i se centrifuga a 1.000 rpm (aprox. 700 x g) durant 3 minuts.
7. Es treu el sobrenedant i es ressuspenen les cèl·lules en un volum de 5-10 ml de medi procurant desfer els agregats cel·lulars i mantenir la suspensió com més homogènia sigui possible.
8. Es compta una alíquota en una càmera de Neubauer. Habitualment es recuperen entre $3-4 \times 10^6$ cèl·lules per flascó de 75 cm^2 (confluència d'un 80 %).
9. Es dilueixen les cèl·lules fins a una concentració adient segons les necessitats. Per exemple: si volem amplificar el cultiu, sembrarem de l'ordre de 500.000 cèl·lules per flascó i per tant ens convindrà tenir una concentració de 500.000 cèl·lules/ml o de 250.000 cèl·lules/ml per afegir al nou flascó 1 o 2 ml respectivament. Alternativament, es pot diluir la suspensió a la concentració final de sembra (500.000 cèl·lules/15 ml) i sembrar fraccions de 15 ml per flascó. D'aquesta manera s'aconsegueix una major homogeneïtat de la suspensió.

IV. Materials i mètodes

10. Se sembra el volum de cèl·lules corresponent en la placa o el flascó i es reparteixen segons s'ha explicat anteriorment.

IV.10.3.3 Congelació del cultiu

Els cultius cel·lulars es poden mantenir durant anys congelats en nitrogen líquid. És convenient mantenir estocs congelats amb un nombre baix de divisions atès que els cultius tendeixen a envellir i perdre les seves característiques bioquímiques i morfològiques amb les subdivisions. A més a més convé tenir cultius congelats, per poder continuar en cas de contaminació del cultiu amb el qual s'està treballant. El protocol seguit ha estat el següent:

1. Es recupera el cultiu en creixement per pancreatinització.
2. Es torna a centrifugar a 1.000 rpm (aprox. 700 x g) durant 3 minuts.
3. Es ressuspén en DMSO (Sigma, cat. D-2650) diluït al 10% en FBS a una concentració de 10^6 cèl·lules/ml. El DMSO actua de crioprotector; això no obstant, s'ha d'evitar una exposició perllongada de les cèl·lules a aquest producte a temperatura ambient ja que és tòxic.
4. S'aliqota en volums d'1 ml en criotubs NuncTM d'1.8 ml (aquests es troben en gel) indicant-hi el nombre de subdivisions que ha patit el cultiu, la quantitat de cèl·lules congelada, el tipus cel·lular i la data de congelació.
5. Es deixa immediatament a -80°C , o alternativament es pot congelar a -20°C i al cap d'unes hores posar-lo a -80°C .
6. Una vegada que el vial està congelat es pot conservar durant setmanes a -80°C o bé es conserva en un tanc de nitrogen líquid durant períodes més llargs.

IV.10.3.4 Detecció de micoplasma

La major part de les contaminacions del cultiu (bacteris, fongs...) són fàcilment detectables a simple vista. Solen aparèixer enterbolint el medi, fent virar l'indicador de pH (acidifiquen el medi en fermentar els nutrients) i desprenent una olor característica. A diferència d'aquestes, la contaminació per micoplasma sol passar desapercebuda en tractar-se d'un paràsit intracel·lular i sol provocar un augment en el temps de replicació de la línia. La detecció d'aquesta contaminació fa necessari l'ús periòdic d'un test específic. En el control de les nostres línies s'ha utilitzat l'equip de detecció de micoplasma de Gen-Probe (Gen-Probe Rapid Detection System. Mycoplasma T.C.). Aquest equip detecta la presència de micoplasma mitjançant hibridació d'una sonda específica de DNA. Les cèl·lules es van créixer fins arribar a confluència en un medi lliure d'antibiòtics per permetre la manifestació de qualsevol contaminació latent. El medi es va recollir i analitzar seguint les instruccions del fabricant.

Darrerament s'ha utilitzat una altre equip de detecció de micoplasma anomenat EZ-PCR Mycoplasma Test kit (Biological Industries Co.); aquest darrer equip és molt més pràctic perquè permet tenir el resultat en poques hores, ja que la presència de micoplasma contaminant pot ser detectat fàcilment visualitzant les bandes del DNA amplificat en un gel d'electroforesi.

IV.10.4 Línies cel·lulars

La línia de fibroblasts C3H10T1/2 i la línia de cèl·lules HeLa es van comprar a la ATCC (American Type Culture Collection). La línia mioblàstica L6E9 va ser cedida pel Dr.Nadal-Ginard (Universitat de Harvard, USA).

IV.11 ESTUDIS DE TRANSFECCIÓ CEL·LULAR

L'anàlisi de la funcionalitat d'una proteïna requereix de les tècniques de transfecció. En la realització d'aquesta tesi s'han utilitzat dos mètodes: transfecció pel mètode de fosfat càlcic (Wigler *et al.*, 1979; Sambrook *et al.*, 1989) i transfecció mitjançant el reactiu FuGENE™ de Roche.

IV.11.1 Mètode del fosfat càlcic

Aquest mètode es basa en la introducció d'un coprecipitat de fosfat càlcic i DNA exogen a la cèl·lula. El precipitat s'adhereix inicialment a la superfície de la cèl·lula i posteriorment és endocitat. Com i quins mecanismes intervenen en aquesta incorporació encara no són clars. El precipitat es forma en barrejar dues solucions, una de salina que conté clorur càlcic i l'altra tamponada que conté el fosfat (HBS), el DNA present queda incorporat al precipitat format.

El paràmetre més important en la formació correcta del precipitat és el pH de la solució HBS; petites variacions en el pH donen lloc a la formació d'un precipitat massa gruixut per permetre l'endocitosis del DNA o d'un precipitat massa petit que no sedimenta sobre les cèl·lules disminuint-se així l'eficiència de transfecció. En qualsevol cas es recomana provar l'eficiència de transfecció de solucions a diferents pH (dins del rang teòricament òptim de 6.9-7,2) amb plasmidis que expressin proteïnes fàcilment mesurables (com la GFP en el citòmetre de flux. Veure "Citometria de flux"). Un altre paràmetre important en la formació del precipitat és la quantitat de DNA. Es recomana l'ús de 35-40 µg de DNA total per cada placa de 10 cm Ø. Per assolir aquestes quantitats s'afegeix DNA "carrier" com ara el plasmidi pBluescript II KS⁻.

L'eficiència de transfecció entre diferents punts experimentals pot variar degut a problemes metodològics difícils de controlar. Per corregir aquestes variacions es cotransfecta cada punt amb

una mateixa quantitat d'un plasmidi que expressa constitutivament la Green Fluorescence Protein (GFP). Després es mesura al citòmetre el percentatge de cèl·lules transfectades.

MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS:

HBS 2x:

- 0,28 M de NaCl
- 50 mM d'HEPES
- 1,5 mM de Na₂HPO₄

S'ajusta al pH que dona un precipitat òptim (entre 6.9-7,2) amb NaOH. S'esterilitza per filtració, s'aliquota i es conserva a -20°C. Una vegada es descongela una alíquota es manté a 4°C. Aquesta solució es pot obtenir per dilució 1/10 d'una solució estoc 10 vegades més concentrada (HBS 20x) o posterior ajust del pH.

Solució de CaCl₂

- 2 M de CaCl₂
- 0,1 M Tris-bàsic

S'ajusta el pH a 7,2 amb HCl, es filtra i es conserva a 4°C. Les alíquotes que no s'utilitzen es poden conservar a -20°C.

DNA "carrier" (pBluescript II KS-)

plasmidis per transfectar

Medi DMEM

Medi complet (10%FBS)

ddH₂O esterilitzada per filtració, es conserva a 4°C. Les alíquotes que no estan en ús es poden guardar a -20°C.

IV. Materials i mètodes

PROCEDIMENT:

Totes les operacions es van dur a terme en la campana de flux laminar per mantenir les condicions d'esterilitat necessàries pel manteniment del cultiu cel·lular.

1. Se sembren suficients plaques de 10 cm Ø uns dies abans de la transfecció per tenir prou cèl·lules per l'experiment. És convenient que les cèl·lules es trobin per sota del 70% de confluència el dia de la transfecció.
2. Es temperen les solucions a temperatura ambient. Es prepara la barreja de DNA que es vol transfectar en tubs estèrils de 15 ml. Normalment 20 µg de DNA per placa de 10 cm.
3. S'afegeixen a la barreja de DNAs 186 µl (62 µl per placa a transfectar) de la solució de CaCl₂.
4. S'afegeix ddH₂O estèril fins a un volum final d'0,5 ml.
5. S'afegeix 0,5 ml d'HBS x2 a un nou tub de 15 ml estèril i transparent (Corning). S'afegeix la barreja de DNA-CaCl₂ gota a gota barrejant-ho fent bombolles amb el pipetejador automàtic; la solució ha de tornar-se tèrbola en formar-se el precipitat, si s'observen els agregats a simple vista el precipitat serà massa gran per ser incorporat per les cèl·lules i és d'esperar que l'eficiència de transfecció sigui molt baixa. Es deixa reposar la barreja durant almenys 30 minuts a temperatura ambient.
6. Afegim gota a gota i agitant les plaques de forma circular, sobre les plaques de 10 cm Ø necessàries per la transfecció. Deixem les plaques a l'incubador de cèl·lules durant 6-18 hores (normalment les deixem 16-18 hores, tota una nit).
7. Després de la incubació treiem per aspiració el medi amb el precipitat no incorporat i rentem les cèl·lules dues vegades amb 5 ml de medi DMEM o PBS x1 cada vegada. Una excessiva exposició de les cèl·lules al precipitat pot comprometre'n la viabilitat.

8. Afegim 10 ml de medi fresc (10 % FBS pels estudis de cèl·lules en creixement) i deixem les plaques a l'incubador durant 72 hores per permetre l'expressió dels plasmidis transfectats.

IV.11.2 Mètode de transfecció amb el reactiu comercial FuGENE™

Aquest mètode de transfecció comercialitzat per Roche consisteix en una barreja de lípids no liposomals que permet introduir eficientment DNA exogen dins de cèl·lules eucariotes. Aquest mètode permet reduir el nombre de cèl·lules i la quantitat del DNA i augmentar el nombre de punts experimentals per transfecció.

MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS:

Reactiu de transfecció FuGENE™ (Roche)

plasmidis per transfectar

Medi DMEM

Medi complet (10 % FBS)

ddH₂O esterilitzada per filtració, que es conserva a 4°C. Les al·lquotes que no s'utilitzen es poden guardar a -20°C.

PROCEDIMENT:

1. El dia anterior a la transfecció se sembren les cèl·lules en plaques "multiwell" de 35 mm Ø. Es recomana una confluència del 50 %-80 % el dia de la transfecció.
2. El dia de la transfecció diluïm el reactiu FuGENE™ amb medi DMEM en un tub de microcentrífuga fins a un volum final de 100 µl per pou que es vol transfectar (300 µl

IV. Materials i mètodes

per fer triplicats), i afegim el reactiu sobre el medi DMEM. El volum de FuGENE™ que hi afegim és 3 vegades la quantitat (en µg) de DNA total que transfectarem. S'incuba a temperatura ambient durant 5 minuts.

3. Preparem en un tub nou la barreja de DNA que volem transfectar. El volum final de DNA ha de trobar-se entre 0,5 i 10 µl
4. S'afegeix el reactiu FuGENE™ diluït al DNA, es tanca el tub i s'incuba durant 15 minuts a temperatura ambient.
5. Es reparteix la solució del complex DNA-FuGENE™ a cada pou amb cèl·lules (aproximadament 100 µl/pou) i es barreja per dispersar els complexos.
6. Es retornen les plaques a l'incubador durant 48-72 hores per permetre l'expressió dels plasmidis transfectats.

IV.11.3 Generació de clons estables “antisense”

La generació de línies estables que expressin constitutivament un fragment antisentit del gen d'interès ens permetrà disminuir l'expressió del gen d'interès de manera permanent durant la vida d'aquestes línies cel·lulars. Teòricament la sobreexpressió d'un fragment d'entre 300 i 500 pb amb la seqüència complementària al mRNA del gen a estudiar, conduirà a la formació d'heterodúplex entre l'mRNA endogen i el fragment antisentit que estem sobreexpressant. Aquests heterodúplex no permetran el correcte plegament del mRNA endogen, desestabilitzant la seva estructura, fent-lo sensible a la digestió per part de la RNAsa H endògena, dificultant el reconeixement i la unió per part del ribosoma, i en últim terme, disminuint els nivells de transcripció.

És una eina útil per estudiar la funció del gen d'interès perquè ens permet anular completa o parcialment la seva expressió, i disposar d'una línia cel·lular que serà un model estable i reproduïble per a posteriors estudis. Per fer-ho seleccionem positivament aquelles cèl·lules que

incorporin el DNA exogen en el seu genoma, i per tant el vagin traspasant de generació en generació.

Per fer-ho:

MATERIALS, REACTIUS I SOLUCIONS:

Material estàndard de cultius cel·lulars

Anells per picar clons de cèl·lules eucariotes.

Geneticina 50 mg/ml

Plàsmid a transfectar.

PROCEDIMENT:

1. Transfectem cèl·lules 10T1/2 com s'ha explicat en el paràgraf anterior amb un plàsmid que expressi un fragment antisentit (seqüència complementària) d'entre 300-500 pb del mRNA endogen, preferiblement cobrint la zona 5'UTR i el codó ATG d'inici de transcripció. Tot això sota control d'un promotor fort (promotor CMV en el nostre cas) i amb un gen de resistència a antibiòtic (kan^R , resistent a geneticina, en el nostre cas), en el plàsmid. Com a control transfectarem amb un plàsmid idèntic però que no expressa aquest fragment "antisense". Igualment s'incorporarà en el genoma a l'atzar, i donarà resistència permanent a la geneticina.
2. 48 hores després de la transfecció incubem les plaques amb geneticina 0,5 mg/ml (per cada tipus cel·lular s'ha d'ajustar prèviament la concentració mínima capaç de matar totes les cèl·lules d'una placa en 3 o 4 dies). Aquest fet provocarà la mort de totes les cèl·lules no transfectades i aquelles que hagin estat transfectades però que no incorporin el DNA exogen en el seu genoma. Les que incorporin el DNA exogen en el

IV. Materials i mètodes

seu genoma sobreviuran i faran colònies en la placa. Caldrà a partir d'ara mantenir aquesta concentració d'antibiòtic en cada canvi de medi.

3. Dos setmanes després de la transfecció ja es possible distingir les colònies a simple vista. Rentem les plaques amb PBS 2 vegades. Apliquem els cilindres de plàstic estèrils amb silicona en un dels extrems per donar estanquitat, sobre cada colònia a picar. Afegim 50 µl de tripsina 1x en PBS i esperem 2 min. Pipetegem amunt i avall per acabar d'arrencar les cèl·lules i les sembrem en pouets de plaques de 24 pous sobre 0,5 ml DMEM sempre mantenint la concentració de geneticina.
4. A mesura que les cèl·lules de cada clon van omplint els pous es van passant a pous més grans fins tenir prou quantitat com per congelar alíquotes i fer anàlisis de Northern Blot i Western Blot per confirmar la caiguda en l'expressió del gen d'interès.

IV.12 TÈCNiques DE DETECCIÓ DE PROTEÏNES

Com per les tècniques bàsiques de manipulació de DNA, no ens estendrem aquí en explicar detalladament les tècniques usades per la detecció de proteïnes. Per la realització d'aquesta tesi s'ha fet Western Blot i assajos d'immunocitoquímica. L'obtenció d'un homogenat total de proteïnes a partir de cultius cel·lulars, l'electroforesi en gel d'acrilamida, la transferència de Western i la immunodetecció de la banda són processos absolutament habituals en qualsevol laboratori de Biologia Molecular, així com les tècniques d'immunocitoquímica sobre cèl·lules en cultiu. Totes aquestes tècniques es poden trobar en la majoria de manuals, però en concret nosaltres ens hem basat en els protocols detallats en "Current Protocols in Protein Sciences" (Ausubel *et al.*, 2001).

Per la immunodetecció de la banda específica de la proteïna Mitofusina-2 en Western Blot, hem fet servir una dilució 1/100 del sèrum d'un conill immunitzat amb l'oligopèptid LGPKNSRRALMGYNDQVQRP. Vam escollir aquest pèptid per ser una part de la proteïna Mitofusina-2 poc estructurada, hidrofílica, amb alta probabilitat d'estar exposada a l'exterior de la proteïna, i rica en aminoàcids antigènics, segons la predicció de diversos programes informàtics i l'opinió experta del Dr. Jorge Lloberas (Dpt. Immunologia, Universitat de Barcelona). La síntesi del pèptid, la immunització del conill i l'extracció del sèrum se li ha encarregat a la companyia Research Genetics. La immunodetecció s'ha realitzat pel sistema ECL (Enhanced Chemiluminescence; Amersham Pharmacia Biotech).

La resta d'anticossos utilitzats per Western Blot i per immunocitoquímica, tant primaris com secundaris, són comercials, i els podem trobar llistats en l'Apèndix I.

IV.13 MESURES DE CANVIS EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL PER CITOMETRIA DE FLUX

El citòmetre permet separar e identificar diferents poblacions cel·lulars. Per exemple cèl·lules transfectades i no transfectades, o cèl·lules de diferents línies cel·lulars. A més permet quantificar la fluorescència emesa per cada cèl·lula individual i fer un anàlisi estadístic sobre poblacions. Algunes molècules catióniques molt hidrofòbiques emeten fluorescència en ser il·luminades amb una llum làser a determinada longitud d'ona. Les característiques hidrofòbiques d'aquestes molècules les permet travessar les membranes cel·lulars i distribuir-se pels diferents compartiments de la cèl·lula, però per la seva càrrega positiva tendeixen a concentrar-se més en aquells compartiments més carregats negativament. Això fa que es concentrin especialment a les

IV. Materials i mètodes

mitocòndries, i ho facin a una concentració depenent del potencial de membrana, per això les anomenem sondes de marcatge mitocondrial, o "mitochondrial dyes". La intensitat de fluorescència de les sondes de marcatge mitocondrial depenent de potencial de membrana serà proporcional a aquest potencial de membrana mitocondrial, i permetrà establir comparacions entre diferents poblacions.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Material estàndard de cultius.

Sonda de marcatge mitocondrial Mitotracker (Molecular Probes)

(les solucions "stock" acostumen a estar en DMSO, a -20°C , 1000x conc).

PROCEDIMENT:

1. Es tripsinitzen les cèl·lules i se centrifuguen seguint les precaucions habituals en el treball amb medis de cultiu.
2. Per la mesura de fluorescència associada a GFP no cal més que ressuspendre-les en PBS o medi DMEM incomplet, a una concentració de 10^6 cels/ml, i portar-les al citòmetre. Si volem marcar-les amb alguna sonda mitocondrial les ressuspenem amb una solució de sonda 2-10 μM en PBS o DMEM incomplet, protegides de la llum.
3. Incubem les cèl·lules a l'incubador, amb el tub obert, durant 30 min.
4. Centrifuguem i les ressuspenem en medi DMEM incomplet o PBS sense sonda. Les rentem dos vegades amb PBS i les portem al citòmetre a una concentració de 10^6 cels/ml.

IV.14 MARCATGE MITOCONDRIAL DEPENDENT DE POTENCIAL DE MEMBRANA PER MICROSCOPIA DE FLUORESCÈNCIA

Com hem explicat en l'apartat anterior, les molècules de tinció de mitocòndries dependent de potencial són molècules catióniques permeables a les membranes, capaces de distribuir-se per la cèl·lula lliurement, però es concentren en cada compartiment dependent de la càrrega negativa d'aquest, de manera que queden més concentrats al citosol que al medi extracel·lular, però molt més concentrats a les mitocòndries que al citosol. A part d'aquesta distribució hi ha sempre una unió inespecífica a diferents parts de la cèl·lula, especialment a membranes. Aquestes molècules s'anomenen "mitochondrial dyes", i emeten fluorescència en ser il·luminades amb un làser a determinada longitud d'ona. Ens permeten marcar les mitocòndries per visualitzar-les en un microscopi de fluorescència.

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Portaobjectes i cobreobjectes

Medi de muntatge: Immunofluore Mounting Medium (ICN).

Material de cultiu estàndard.

Sonda de marcatge mitocondrial Mitotracker (Molecular Probes)

Les solucions "stock" acostumen a estar en DMSO, a -20°C , 1000x conc.

IV. Materials i mètodes

PROCEDIMENT:

1. Prèviament haurem fet créixer les cèl·lules que volem marcar sobre cobreobjectes estèrils en la pròpia placa de cultius.
2. Preparem una solució de "mitochondrial dye" en medi DMEM incomplet (sense sèrum) a 2-10 μ M, depenent de cada sonda. La protegim de la llum.
3. Rentem les cèl·lules dos vegades amb PBS i afegim a sobre (suficient com per cobrir-les), la solució de sonda mitocondrial. Incubem 30 min a 37°C, a l'incubador.
4. Rentem els cobreobjectes amb PBS, els assequem, sense tocar ni fer malbé la monocapa cel·lular.
5. Els muntem sobre el portaobjectes amb una gota de medi de muntatge. Tot protegit de la llum ho conservem durant 24 h a 4°C abans de portar-ho al microscopi.

IV.15 CITOMETRIA DE FLUX

Aquesta tècnica ha estat utilitzada en aquesta tesi per mesurar percentatges de transfecció detectant el percentatge de cèl·lules que emetien fluorescència verda, i per tant estaven expressant la GFP (Green Fluorescence Protein); i per comparar marcatges mitocondrials depenent de potencial de membrana entre cèl·lules d'un tipus i un altre, transfectades i no transfectades, control o "antisense"...etc.

Ja hem explicat a l'apartat "Microscopia Confocal de Fluorescència" la utilitat de les sondes de marcatge mitocondrial per potencial de membrana. En el cas del citòmetre ens és especialment fàcil mesurar la intensitat de fluorescència de cada cèl·lula, i fer-ho per nombres realment importants de cèl·lules, de manera que, si més no, podem comparar la intensitat de fluorescència mitjana de dos o més poblacions de cèl·lules. En el cas d'intensitat de fluorescència associada a Mitotracker podrem parlar d'intensitat de potencial de membrana mitocondrial. Això, sense més,

serà la suma de quantitat de mitocòndries en la cèl·lula, mes funcionalitat d'aquestes mitocòndries, (veure "Mesura de canvis en el potencial de membrana mitocondrial per citometria de flux").

El citòmetre de flux fa passar les cèl·lules una a una i les il·lumina amb una llum làser, de manera que les molècules fluorescents a dins de la cèl·lula (GFP, Mitotracker...etc.), rendeixen una lluminositat de color verd o vermell, respectivament. Aquesta és amplificada pels fotomultiplicadors de l'aparell, i mesurada. Al capdavant hem mesurat la intensitat de fluorescència de cada cèl·lula a cada longitud d'ona, en una enorme població de cèl·lules, i per tant, podem fer grups i subgrups en funció de la seva fluorescència. Igualment, degut a la reflexió i difracció de la llum és capaç de distingir la mida i la rugositat de cada cèl·lula.

Així hem pogut mesurar percentatges de transfecció (cèl·lules GFP positives en la població), o intensitats de fluorescència (i per tant de potencial de membrana mitocondrial), de Mitotracker, en cèl·lules transfectades (GFP+) i no transfectades (GFP-); o simplement en una població de cèl·lules normals comparant amb una població de cèl·lules transfectada establement amb constructes "antisense" (Veure "Generació de clons estables "antisense"").

IV.16 MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA

Ha estat habitual durant aquesta tesi l'anàlisi al microscopi de la proteïna GFP (Green Fluorescence Protein), que és expressada per alguns dels plàsmids utilitzats per transfectar i que permet detectar al microscopi de fluorescència o al citòmetre, les cèl·lules transfectades. A part s'ha utilitzat el microscopi de fluorescència per la detecció de proteïnes per immunocitoquímica (Veure "Tècniques de detecció de proteïnes"), i per analitzar la morfologia de les mitocòndries en diferents condicions (veure "Marcatge mitocondrial depenent de potencial de membrana per microscopia de fluorescència").

IV. Materials i mètodes

Al microscopi de confocal hem acostumat a observar i prendre imatges, amb els objectius de 64X o de 100X augments, i hem pres imatges de 512x512 píxels amb un factor de zoom d'entre 1,4 i 2 unitats. Per fer reconstruccions amb la tecnologia confocal hem pres imatges de 9 talls separats 0,2 micres entre ells, utilitzant un feix làser per excitar els fluorocroms que rendien color verd i vermell respectivament. Les imatges s'han pres de manera clàssica, de tot el gruix observat al visor, o bé s'han pres talls consecutius, utilitzant la tecnologia confocal, que ens han permès reconstruir després un model 3D de les cèl·lules observades, amb molta més resolució.

Sovint s'ha utilitzat la fluorescència verda de la GFP, coexpressada en el mateix vector que la proteïna d'interès per identificar les cèl·lules transfectades i després observar, en vermell de Mitotracker, la tinció i morfologia de les mitocòndries en les cèl·lules transfectades i les no transfectades.

IV.17 ESTUDIS METABÒLICS

IV.17.1 Mesures d'oxidació de glucosa

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Material estàndard de cultius.

Hyamina (Sigma)

Comptador de radiació β

Mitjans de tractament de residus radioactius.

Tampó de lisi (0,1 M NaOH, 1% SDS)

Tampó Krebs-Ringer 10x

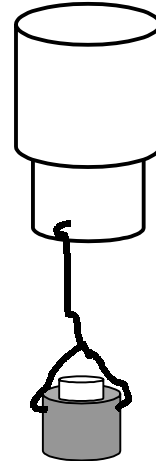
- NaCl 80 g/l
- KCl 3,53 g/l
- MgSO₄·7H₂O 2,92 g/l
- KH₂PO₄ 1,61 g/l
- CaCl₂·2H₂O 3,73 g/l

Medi d'incubació Glc 5 mM (es prepara al moment), per 50 ml:

- 45 gr de Glucosa (final 5 mM)
- 3.9 µl de [U]-¹⁴C-Glucosa 323 mCi/ml, 200 µmols/ml (Amersham Pharmacia Biotech)
- 1 ml FBS inactivat
- 5 ml de tampó Krebs-Ringer 10x
- Fins a 50 ml d'aigua destil·lada estèril

Ho esterilitzem tot per filtració

Taps de goma estèrils i estancs pels flascons de 25 cc de cultius, amb cistelleta adossada que conté paper de filtre, com en el dibuix. (Material de construcció artesanal).

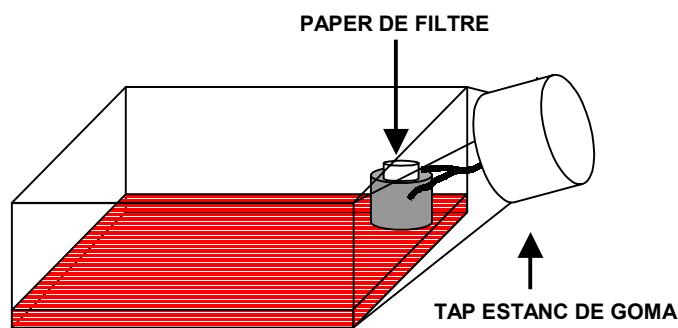


PROCEDIMENT:

1. Se sembren les cèl·lules en flascons de 25 cc. a 100.000 cel/flascó el dia abans de l'experiment, en DMEM enriquit amb 10% FBS com habitualment, i seguint els procediments normals de treball amb cultius. Això ens garanteix que el dia de l'experiment les cèl·lules es troben en creixement logarítmic, i no han arribat a confluència.

IV. Materials i mètodes

2. El dia de l'experiment es renten les cèl·lules 3 vegades amb PBS, i s'afegeixen 3 ml del Medi d'Incubació Glucosa 5 mM.
3. Immediatament es tanquen els flascons amb els taps de goma estancs, que porten incorporats la cistella i el paper i s'introdueixen a l'incubador. Han de quedar com es mostra en el dibuix procurant que el paper de filtre no entri mai en contacte amb el medi radioactiu.



4. Als temps prèviament establerts es treuen els flascons de l'incubador i s'afegeix punxant amb una xeringa 300 μ l d' H_2SO_4 0,25 M, sobre el medi de cultiu. Això mata les cèl·lules i atura el consum de glucosa. A part, desplaça l'equilibri entre bicarbonat i CO_2 en el medi i allibera tot el CO_2 a la microatmosfera del flascó.
5. Immediatament després, també amb una xeringa a través del tap de goma, per mantenir la estanquitat, afegim 300 μ l de Hyamina (segrestador del CO_2) sobre el paper de filtre.
6. Incubem els flascons a 4°C en agitació suau. Mica en mica, tot el CO_2 anirà quedant atrapat en la Hyamina en el paper de filtre.
7. Obrim el flascó i recuperem el paper de filtre que posem a comptar en el comptador beta.
8. El medi el desestimem o el recuperem per la mesura d'altres metabòlits, com ara el lactat.
9. Rentem les cèl·lules amb PBS dos vegades.

10. Solubilitzem les cèl·lules amb Tampó de Lisi, i mesurem la quantitat de proteïna.
11. Tenint en compte l'activitat específica de la glucosa marcada en el medi, podrem deduir a partir de les cpm's en el paper de filtre, corresponent al CO₂ atrapat en la Hyamina, quanta glucosa ha estat oxidada i expressarem el resultat per µg de prot, per obviar diferències en el nombre de cèl·lules, entre flascó i flascó.

IV.17.2 Mesures d'oxidació d'àcids grassos

El protocol és idèntic al de mesura de consum de glucosa, tret que els àcids grassos s'han de conjuguar amb BSA prèviament a afegir-los al medi d'incubació, per tal que siguin solubles en medi aquós i accessibles a les cèl·lules. A part cal dir que en els nostres experiments de mesures d'àcids grassos, sempre ha hagut una concentració de 5 mM de glucosa en el medi, que és el substrat principal d'aquestes cèl·lules. Ens hem basat en els protocols que apareixen a Rizzo *et al.*, (1984) i Street *et al.*, (1990).

Aquí detallarem només el protocol de conjugació dels àcids grassos a l'albumina de sèrum boví (BSA).

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

[1]-¹⁴C-Àcid palmític 57 mCi/mmol 200µCi/ml (Amersham Pharmacia Biotech)

Albumina lliure d'àcids grassos 30% - FFA-BSA (Sigma)

Etanol 100%

NaOH 0,6 M

IV. Materials i mètodes

PROCEDIMENT:

1. Per 50 ml de medi final a una concentració final de palmitat de 1 μ M barrejarem:
 - 14,2 μ l de [1]-¹⁴C-Palmitat
 - 5 μ l de NaOH 0,6 M
 - 300 μ l d'Etanol 100%i incubem a 75°C durant 15 min.
2. Agitant amb el tap obert, a 37 °C en agitació, anem afegint gota a gota i molt lentament 1 ml de FFA-BSA i deixem incubant durant una hora.
3. Afegim la barreja al medi que calgui. DMEM incomplet-FBS 1% o el Medi d'incubació Glc 5 mM (Veure "Oxidació de Glucosa")
4. Continuem amb el mateix protocol descrit a "Oxidació de Glucosa".

IV.17.3 Mesures de consum d'oxigen

IV.17.3.1 Rentat i preparació dels elèctrodes

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Dos elèctrodes de Clark amb els seus agitadors, enregistradors, etc.

Solució d'amoni 4%

Al₂O₃ en pols

Aigua destil·lada

Membrana

Solució de KCl saturada

PROCEDIMENT:

1. Desmuntem els elèctrodes i rentem tot amb aigua destil·lada.
2. Apliquem Al_2O_3 en pols sobre l'elèctrode metàl·lic i rentem amb paper humitejat en solució d'amoni al 4%. Fins que recuperi la lluentor.
3. Rentem amb aigua destil·lada, i cobrim l'elèctrode de la solució de KCl
4. Apliquem la membrana convenientment retallada sobre l'elèctrode.
5. Muntem el sistema, assegurant-nos de no deixar bombolles sota la membrana.
6. Rentem la cambra 3 vegades amb aigua, 3 vegades amb etanol 96° i tres vegades més amb aigua.

IV.17.3.2 Mesura de linealitat

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Solució de mitocòndries purificades

Rotenona 2 mM

Succinat 1M

Tampó KHE

KCl 120 mM

KH_2PO_4 5 mM

HEPES 5 mM

IV. Materials i mètodes

EGTA 1mM

BSA lliure d'àcids grassos 0,3%

Ajustar pH = 7,2 amb KOH.

PROCEDIMENT:

1. Afegim 450 µl de tampó KHE a la cambra.
2. Amb tots els sistemes operant (inclosa l'agitació), ajustem el 0% i el 100% en l'enregistrador.
3. Afegim al KHE en la cambra 50 µl de solució de mitocòndries purificades i 5 µl de Rotenona . Tanquem els taps dels elèctrodes i afegim immediatament 10 µl de succinat 1 M amb xeringa de Hamilton™.
4. Deixem que les mitocòndries esgotin l'oxigen i comprovem que el registre és lineal.

IV.17.3.3 Mesura del consum d'oxigen amb diferents inhibidors

MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Solució de cèl·lules 10T1/2 control i "antisense" $4 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml

ressuspeses en tampó d'incubació Glc 5 mM

Tampó Krebs-Ringer 10x

- NaCl	80 g/l
- KCl	3,53 g/l
- MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,92 g/l
- KH ₂ PO ₄	1,61 g/l

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,73 g/l

Medi d'incubació Glc 5 mM (es prepara al moment), per 50 ml:

- 45 gr de Glucosa (final 5 mM)
- 1 ml FBS inactivat
- 5 ml de tampó Krebs-Ringer 10x

Fins a 50 ml d'aigua destil·lada estèril

Set d'inhibidors, concentracions "stock":

KCN	5M	(inhibidor del complex III)
Oligomicina	4mg/ml	(inhibidor de l'ATP sintasa)
Mixotiazol	100mM	(inhibidor del complex III)
FCCP	1mM	(desacoblador)

PROCEDIMENT:

1. Per cada punt experimental mesurem el consum d'oxigen en paral·lel d'un i altre tipus cel·lular en cada elèctrode. Després fem una rèplica intercanviant els tipus cel·lulars d'elèctrode.
2. Les cèl·lules les mantenim al bany de 37°C en agitació, en un tub de 50 ml obert, per permetre l'equilibri de la concentració d'oxigen entre l'aire i la mostra.
3. Rentem l'elèctrode 3 vegades amb aigua, 3 amb etanol i 3 amb aigua.
4. Afegim 500 μl del tampó d'incubació Glc 5 mM. Amb els taps oberts esperem que s'estabilitzi el registre, és a dir que la línia marqui una concentració d'oxigen constant en el temps. Això vol dir que la concentració d'oxigen en el medi ha entrat en equilibri amb la de l'atmosfera. En aquest punt ajustem el 0% i el 100% en l'enregistrador.
5. Treiem el tampó d'incubació de l'elèctrode i afegim 500 μl de la solució de cèl·lules en cada elèctrode. $2 \cdot 10^6$ cèl·lules.

IV. Materials i mètodes

6. Posem els taps i enregistrem la davallada de la concentració d'oxigen en el temps durant uns minuts. Mesurem només entre 90% i 70% de concentració.
7. Un cop arribats al 70 % de concentració treiem els taps, i intercanviem les cèl·lules entre un i altre elèctrode, per corregir diferències entre ells. Ajudem a l'equilibrat pipetejant amb cura les cèl·lules amunt i avall. Quan la concentració d'oxigen és de nou del 90% en les mostres, tornem a tancar els taps i mesurem de nou.
8. Rentem 3 vegades amb aigua, 3 amb etanol i 3 amb aigua.
9. Repetirem els passos de l'1 al 8 amb noves mostres de cèl·lules, de nou, per cadascun dels inhibidors. Afegirem la droga immediatament després de les cèl·lules a la cambra, i deixarem incubar durant un temps abans de tancar els taps i començar a mesurar el consum d'oxigen. Els volums i temps d'incubació per cada droga apareixen a la taula:

	Conc stock	Volum	Temps incub.	Conc final
KCN	5 M	10 μ l	5'	100 mM
Oligomicina	4 mg/ml	10 μ l	10'	80 μ g/ml
Myxothiazol	100 mM	1 μ l	10'	200 μ M
FCCP	1 mM	1 μ l	0'	2 μ M

10. Un cop fetes totes les mesures, calculem la taxa de consum d'oxigen a partir de la gràfica obtinguda. Mesurant quant oxigen ha desaparegut de la cambra i en quant temps. Típicament mirem la caiguda entre 90% i 70%. Per calcular quants nmols d'oxigen representa cada unitat de la gràfica considerem que el 100% d'oxigen al medi és de 479 nmols d'oxigen/ml. Com treballem amb 0,5 ml a la cambra el 100% d'oxigen són 239,5 nmols. A partir del resultat amb diferents inhibidors calcularem:
 - a. Respiració total: consum d'oxigen inhibible per KCN.
 - b. Respiració mitocondrial: respiració total inhibible per mixotiazol.
 - c. Respiració no mitocondrial: respiració total no inhibible per mixotiazol.
 - d. Respiració acoblada: respiració mitocondrial inhibible per oligomicina.
 - e. Respiració desacoblada: respiració mitocondrial no inhibible per oligomicina.

IV.18 ESTUDIS D'ESTEREOLOGIA

Els estudis estereològics duts a terme en aquesta tesi es basen en el treball de Baddeley *et al.* (1986). Hem treballat amb múscul sòleus de rates Zucker normals (fa/+ i +/+) i obeses (fa/fa). L'objectiu d'aquesta metodologia és determinar relacions de superfície/volum en objectes tridimensionals de formes diverses o amorfs, a partir de fotografies (dos dimensions), de la manera més acurada possible. En aquesta tesi en concret la intenció era poder visualitzar diferències en la forma de les mitocòndries entre múscul de rates control i obeses. Per fer-ho:

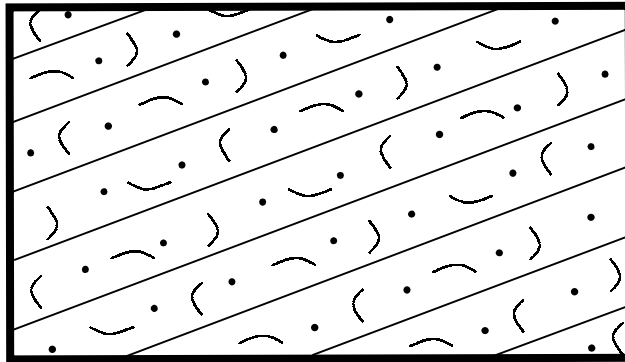
MATERIAL, REACTIUS I SOLUCIONS:

Microscopi electrònic de transmissió

Músculs sòleus d'animals controls i obesos.

PROCEDIMENT:

1. Els músculs es tallen en diferents angles a l'atzar respecte el seu eix longitudinal, per tal de garantir la màxima representació espacial en les tres dimensions, i es prenen 80 fotografies a l'atzar de cada condició, al microscopi electrònic. Amb l'única limitació de que aparegui sempre, com a referència, el disc Z de la fibra muscular i sempre amb el mateix augment. (Veure "Microscopia Electrònica de Transmissió").
2. Cada fotografia complirà els següents requeriments:
 - inclourà el disc Z i les mitocòndries al seu voltant.
 - no inclourà sarcolemma ni població de mitocòndries subsarcolemmals.
3. Sobre cada fotografia aplicarem una graella com la del dibuix, inscrita sempre a la fotografia.



4. Comptabilitzem el nombre de punts que cauen dintre de la mitocòndria, i el nombre de talls de les corbes de la graella amb la membrana mitocondrial externa, per a cada fotografia. El sumatori total de punts serà una estimació del volum mitocondrial total i el sumatori total de talls serà una estimació de la superfície mitocondrial total. La relació superfície/volum serà una magnitud dependent del tipus de mitocòndria e independent d'errors experimentals o "bias" en la presa de fotografies, de la zona de la fibra fotografiada més o menys rica en mitocòndries, del nombre total de mitocòndries estudiades, etc.

IV.19 MICROSCOPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ

Aquesta tècnica que permet analitzar mostres biològiques a molts augments, s'ha fet servir per l'anàlisi ultraestructural i morfològic de les mitocòndries de cèl·lules transfectades i de talls de múscul de rata. Als Serveis Científico-Tècnics de la U.B. s'encarreguen dels talls semifins i ultrafins de les mostres i del seu muntatge a les reixetes per tal de ser observades al M.E.T. (Microscopi

Electrònic de Transmissió). Correspon a l'usuari la preparació de la mostra i l'obtenció de les fotografies de les mostres ja tallades.

IV.19.1 Teixits – Estudis d'estereologia

1. S'obtenen els teixits dels animals controls o obesos (fa/fa), normalment múscul sòleus, com ja s'ha descrit prèviament, però amb el particular de que no es congelen immediatament sinó que es submergeixen en paraformaldehid 3%, i es guarden a 4°C fins que són portats als Serveis Científico-Tècnics per ser tallats.
2. En el cas dels estudis d'estereologia per determinar diferències en la morfologia de les mitocòndries es donen instruccions precises de que els músculs siguin muntats longitudinalment i després tallats en diferents angles respecte l'eix longitudinal, a l'atzar, per garantir la màxima representació espacial de les mitocòndries en les fotografies que es prendran.
3. Es prenen fotografies dels músculs, en el cas dels estudis estereològics, sempre a la mateixa magnificació (en el nostre cas 5000 augments) i al voltant del disc Z, i evitant agafar sarcolemma i població de mitocòndries subsarcolemmals.

IV.19.2 Cèl·lules

1. Les cèl·lules (> de 2 milions), transfectades o no, se centrifuguen, seguint les mesures habituals del treball amb medis de cultius, i el "pellet" es submergeix en paraformaldehid 3% i es porta a tallar als Serveis Científico-Tècnics.
2. S'obtenen fotografies a diferents magnificacions depenent de si volem observar la forma de les cèl·lules senceres, del seu nucli, o de les seves mitocòndries.

IV.20 APÈNDIX I. ANTICOSSOS.

IV.20.1 Anticossos primaris

En aquesta tesi només s'han utilitzat tres anticossos primaris, depenent de què es volgués detectar.

- Sèrum d'un conill immunitzat amb l'oligopèptid LGPKNSRRALMGYNDQVQRP, preparat per Research Genetics per encàrrec. Utilitzat per Western Blot a una dilució 1/400 en solució de llet en pols "Sveltesse" (Nestlé) 5 % en PBS
- Anticòs murí contra la porina humana 1 mg/ml (Calbiochem). Utilitzat per Western Blot a una dilució 1/5000 en TBSx1.
- Anticòs comercial de ratolí contra l'epítoc myc : 9E10 anti-myc, Molecular Probes. Utilitzat per immunocitoquímica a una dilució 1/400 en FBS 10%

IV.20.2 Anticossos secundaris

En aquesta tesi s'ha fet servir un anticòs secundari lligat a fluoresceïna per la detecció de **myc** en la immunolocalització de myc-Mitofusina-2, i dos anticossos secundaris per la detecció dels

anticossos primaris anti-Mitofusina-2 i anti-porina en Western Blot. Els anticossos secundaris utilitzats per Western Blot porten conjugada la proteïna HRP ("horse radish peroxidase"), per la detecció mitjançant el sistema ECL. (Amersham Pharmacia Biotech, veure "Tècniques de detecció de proteïnes").

La dilució de treball amb els anticossos secundaris per Western Blot és entre 1/2000-1/4000 preparat en solució de llet en pols "Sveltesse" (Nestlé) 1% en PBS. S'han utilitzat diferents anticossos secundaris depenent de l'espècie en que ha estat desenvolupat l'anticòs primari:

- Un anticòs secundari produït en ovella acoblat a la HRP dirigit contra IgG de conill ("HRP-conjugated sheep anti-rabbit-IgG solution", Sigma).
- Un anticòs secundari produït en conill acoblat a la HRP dirigit contra IgG de ratolí ("HRP-conjugated rabbit anti-mouse-IgG solution", Sigma).

L'anticòs secundari per la detecció de **myc** en la immunocitoquímica és un anticòs comercial:

- Anticòs de cabra contra la cadena invariable de ratolí marcat amb fluoresceïna diluït 1/100 en solució 10% FBS: "Goat anti-mouse Oregon Green", Molecular Probes, 2mg/ml.

IV.21 APÈNDIX II. REACTIUS GENERALS

Denhardt (solució de Denhardt):

- Ficoll a l'1%
- polivinilpirrolidona a l'1%
- albúmina sèrica bovina a l'1%

Es guarda aliquotat a -20°C .

DEPC-H₂O:

- aigua desionitzada (Milli-Q, Millipore)
- DEPC 0,01%

Incubem l'aigua desionitzada amb el DEPC durant 12 h a 37°C i amb agitació. Ho autoclavem per destruir el DEPC que podria modificar les purines de l'RNA.

DNA d'esperma de salmó:

1. Dissolem el DNA d'esperma de salmó en aigua estèril a una concentració de 10 mg/ml. El deixem dissoldre durant 2-4 hores a temperatura ambient.

2. Hi afegim NaCl fins a una concentració final de 0,1 M.
3. Extraïem el DNA afegint-hi 1 volum de fenol neutre, ho barregem i ho centrifuguem a 2.000 rpm. Recollim la fase aquosa.
4. Ho tornem a extreure amb una solució de fenol:cloroform (1:1).
5. Recollim la fase aquosa i la passem diverses vegades per una agulla de calibre 17 o bé soniquem.
6. Precipitem el DNA afegint-hi 2 volums d'etanol absolut i incubant-ho a -20°C durant 2 hores.
7. Redissolem el precipitat amb aigua estèril a una concentració aproximada de 10 mg/ml.
8. Determinem la concentració llegint l'absorbància a 260 nm en un espectrofotòmetre.
9. Ho guardem en alíquotes a -20°C .
10. Soniquem cada alíquota quan la descongelem abans d'utilitzar-la.

Fenol àcid:

- 250 g de Fenol (Merk, cat. 206)

Liquem el fenol a 65°C en una campana extractora. Hi afegim 1 volum de H_2O -DEPC i ho barregen per formar una emulsió. Ho deixem reposar a 4°C perquè se separin les dues fases. Aspirem la fase aquosa deixant una capa de 2-3 mm per prevenir l'oxidació del fenol. Ho guardem a 4°C protegit de la llum.

IV. Materials i mètodes

Fenol:cloroform (1:1) saturada en Tris-HCl:

1. Barregem 1 volum de fenol saturat en Tris-HCl amb un volum de cloroform.

Fenol neutre (saturat amb Tris-HCl):

1. S'afegeix el mateix volum de Tris-HCl, pH 8, 1M al fenol dissolt en aigua (fenol àcid). Generalment hi afegim 8-hidroxiquinoma a una concentració de 25 mg/ml per identificar la fase fenòlica (adquireix una coloració groguenca) i prevenir l'oxidació del fenol. Ho barregem per inversió diverses vegades tenint en compte que el fenol es molt tòxic.
2. Separem les fases per centrifugació a baixa velocitat (2.000 rpm, en una centrífuga Sorvall RC3B) durant 5 minuts. Comprovem el pH de la fase aquosa. Ha de ser major de 7. En cas contrari repetim aquest pas. Si el pH es major de 7, ho guardem a 4°C.

Formamida desionitzada:

- formamida
- reïna Amberlite MB3 0,1g/ml (Sigma)

Afegim la reïna a la formamida i ho barregem amb una vareta magnètica a temperatura ambient durant 30 minuts. La reïna canvia de color de verd a daurat. Ho filtrem amb paper Whatman i ho conservem alíquotat a -20°C. Les alíquotes descongelades es poden conservar a 4°C durant períodes curts de temps.

LB. Medi de cultiu per a bacteris:

- triptona a l'1,0%
- extracte de llevat al 0,5%
- NaCl al 0,5%

Ajustem el pH a 7,5 amb NaOH i ho esterilitzem a l'autoclau.

LB-agar:

- triptona a l'1,0%
- extracte de llevat al 0,5%
- NaCl al 0,5%

1. Ajustem el pH a 7,5 amb NaOH. Hi afegim agar a l'1,5%.
2. Ho autoclavem per esterilitzar i dissoldre l'agar.
3. Després d'autoclavar ho temperem a 50°C. Hi afegim l'antibiòtic de selecció i el repartim (uns 15-20 ml per placa) en plaques de 10 cm Ø. Ho deixem gelificar a temperatura ambient i les guardem invertides a 4°C.

PBS 5x (per 1 litre):

- 40 g de NaCl
- 1 g de KCl

IV. Materials i mètodes

- 7,2 g de Na₂HPO₄
- 1,15 g de KH₂PO₄
- ddH₂O fins a 1 l

Ho ajustem a pH 7,4 amb HCl. Ho mantenim a temperatura ambient.

Per obtenir PBS 1x diluïm 1/5 aquesta solució.

SSC 20x:

- citrat sòdic 0,3 M, pH 7,0
- NaCl 3,0 M
- H₂O-DEPC

SSPE 20x:

- NaH₂PO₄, pH 7,4
- NaCl 3,0 M
- EDTA 0,02 M
- H₂O-DEPC

Tampó d'electforesi d'RNA – MOPS

- MOPS 0,2 M, pH 7.0
- Acetat de sodi 0,5 M
- EDTA 0,01 M

Ho esterilitzem per filtració i ho guardem a la foscor.

Tampó STE:

- Tris-HCl pH 7,5 10mM
- NaCl 100 mM
- EDTA 1mM

Tampó TBE 10x (per 1 litre):

- Tris base 108 gr
- Àcid bòric 55 gr
- EDTA 0,5 M 40 ml, pH 8.0

Tampó TE:

- Tris-HCl pH 7,5 10mM
- EDTA 1 M

V Resultats

V.1 CLONACIÓ DE GENS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS EN MÚSCUL ESQUELÈTIC EN CONDICIONS DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA.

V.1.1 Aplicació de la tècnica de "Differential Display" en preparacions d'RNA de múscul esquelètic de rates joves i velles.

Donat que l'envelliment en rosegadors es mostra associat a un progressiu desenvolupament de la resistència a la insulina en múscul esquelètic, vam escollir aquest model animal per fer un primer intent d'aïllar i identificar gens amb expressió alterada en aquestes condicions. Vam utilitzar rates Wistar normals a les quals se les hi va extreure múscul esquelètic (múscul gastrocnemius) als 3 mesos o als 12 mesos de vida. Es va purificar RNA total i es va utilitzar la tècnica de "Differential Display" tal com es descriu en "Materials i mètodes". La figura 3 és el resultat d'un experiment representatiu on es mostren tres rèpliques per cada grup experimental, i a on es va usar la combinació de primers 5'-AAGCTTCGACTGT-3' i 5'-AAGCTTTTTTTTTTTG-3'. Es mostra el resultat de l'electroforesi en gel de poliacrilamida dels productes de PCR després de l'amplificació. Al carril 1 es mostra el blanc de PCR. Al carril 2 el blanc de retrotranscripció. Els carrils RT- representen els controls d'amplificació de DNA genòmic, en els que al fer la síntesi de cDNA no s'hi ha afegit RT (retrotranscriptasa), de manera que només el DNA genòmic que arrosega la mostra d'RNA total es pot amplificar. En aquestes condicions es va detectar una banda d'aproximadament 310 pb, que es fa menys intensa en el grup de rates velles (figura 3).

La banda diferencialment expressada es va retallar i purificar del gel d'acrilamida com s'explica en "Materials i mètodes". En la secció "Estudis sobre P311/PTZ-17" es mostren els estudis de caracterització que hem dut a terme.

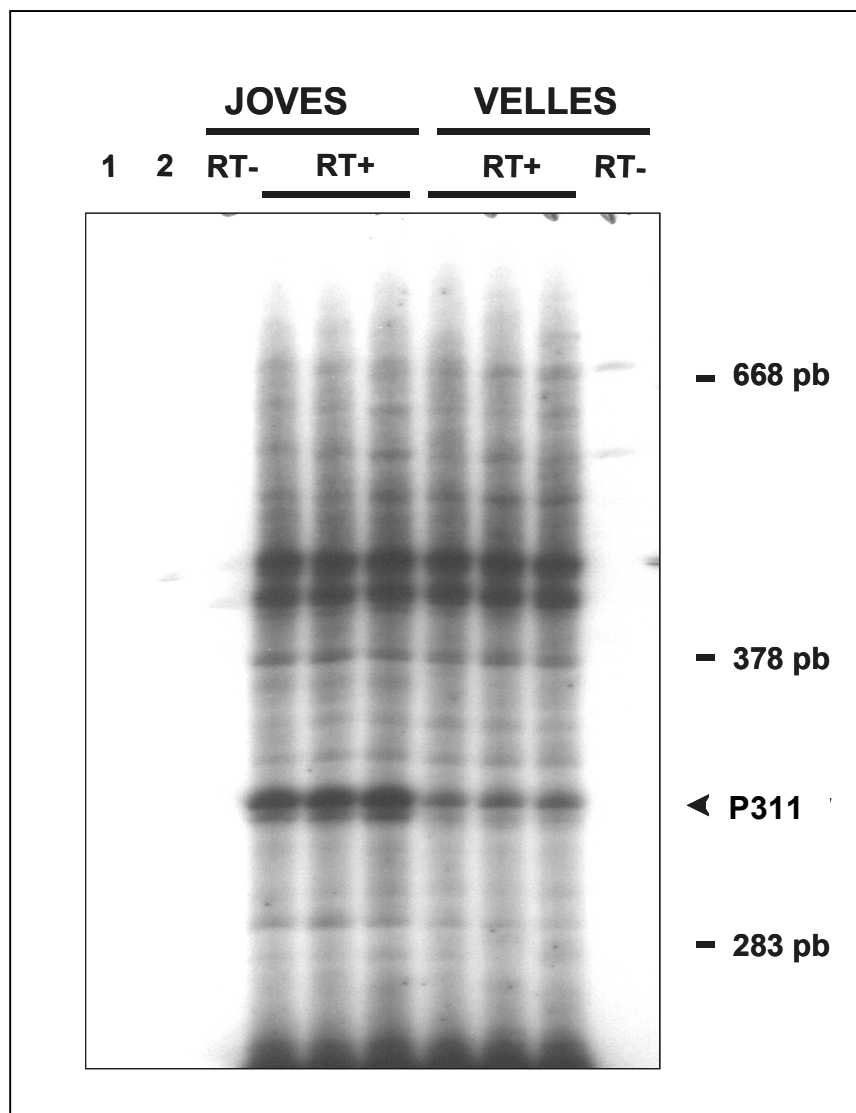


Figura 3. "Differential Display PCR" sobre múscul esquelètic de rates joves i velles. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (gastrocnemius) de rates joves i velles. Després de fer un "pool" d'RNA per grup es va sintetitzar cDNA i es va amplificar aplicant "Differential Display PCR" (veure "Materials i mètodes"). S'han carregat 5µl de producte de PCR en cada carril en un gel de poliacrilamida d'alta resolució. Es mostra un experiment representatiu amb 3 rèpliques per grup experimental, que correspon a l'amplificació amb els "primers" 5'-AAGCTTCGACTGT-3' i 5'- AAGCTTTTTTTTTTTG-3'. La banda diferencialment expressada correspon al fragment 3' del cDNA del gen PTZ-17. A la dreta es mostra la mobilitat electroforètica de les bandes del marcador de pesos moleculars. El carril 1 correspon al control negatiu de PCR. El carril 2 correspon al control negatiu de retrotranscripció. RT- correspon al control de genòmic en el qual només s'amplifica el DNA genòmic arrossegat amb la mostra d'RNA total.

V.1.2 Experiments d'hibridació sostractiva a partir d'RNA de múscul esquelètic de rates control i obeses

Vam escollir la rata obesa Zucker com a model animal de resistència a insulina en múscul esquelètic. Es va purificar mRNA poli-A a partir de múscul esquelètic (múscul gastrocnemius) i es va seguir la tècnica d'hibridació sostractiva a partir de 2µg d'aquest mRNA poli-A, segons està descrit en "Materials i mètodes". En tot el procés es va incloure un control de mRNA poli-A de múscul esquelètic humà, que incorporava o no ("test" i "driver" respectivament; veure "Materials i mètodes") els fragments resultants de la digestió del bacteriòfag ϕ X174 amb HaeIII. Amb aquestes dues mostres control es va seguir tot el procés en paral·lel de manera que al final, de la hibridació d'aquestes dues mostres s'haurien d'obtenir només els fragments de digestió del bacteriòfag ϕ X174 amb HaeIII. Amb les mostres problema, en una primera hibridació sostractiva que anomenarem "directa" vam hibridar el cDNA de múscul control ("test") amb un excés de cDNA de múscul obès ("driver") per eliminar els cDNA's igualment expressats en una i altra condició i obtenir tots aquells cDNAs sobreexpressats en el múscul esquelètic control; posteriorment es va realitzar una hibridació sostractiva que anomenarem "reversa" en que vam hibridar el cDNA de múscul obès (ara com a "test") amb un excés de cDNA de múscul control (ara com a "driver") per eliminar tots els cDNA's expressats de la mateixa manera en les dues condicions i obtenir tots els cDNAs sobreexpressats en el múscul esquelètic obès. En la hibridació sostractiva control es va hibridar el cDNA de múscul esquelètic humà que contenia un 2% de fragments de DNA lineals corresponents al bacteriòfag ϕ X174 digerit amb HaeIII, amb un excés de cDNA de múscul esquelètic humà normal. De cada sostracció s'ha fet un control de cDNA no sostret, que correspon al cDNA "test" sense hibridar-lo amb el "driver". En el cas de la hibridació sostractiva directa, el control no sostret correspon a l'amplificació per PCR dels cDNAs de múscul esquelètic de rata control i en el cas de la hibridació sostractiva reversa, el control no sostret correspon a l'amplificació per PCR dels cDNAs de múscul esquelètic de rata obesa. En el cas de la hibridació control, el control no sostret correspon a l'amplificació per PCR de tots els cDNAs del múscul

V. Resultats

esquelètic humà control proveït per Clontech al qual s'hi ha afegit un 2% de DNA corresponent al bacteriòfag ϕ X174 digerit amb HaeIII. Es van carregar 10 μ l dels productes de PCR de cadascuna de les hibridacions sostractives i dels seus respectius controls no sostrets en un gel d'agarosa, es va fer un Southern Blot (veure "Materials i mètodes") i es va hibridar amb una sonda contra la miogenina com a control de sostracció. La miogenina és un gen abundant en múscul esquelètic i per això va ser utilitzat per comprovar l'eficiència de la tècnica.

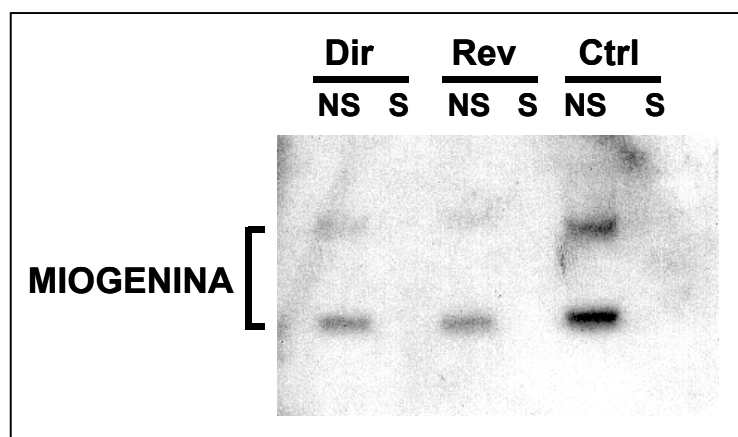


Figura 4. Comprovació de l'eficiència de sostracció per Southern Blot.

En la hibridació sostractiva directa (Dir), cDNA de múscul de rata control va ser hibridat (sustret: S) o no (NS) amb un excés de cDNA de múscul de rata obesa segons la tècnica d'hibridació sostractiva (veure "Materials i mètodes"). Els fragments resultants en cada cas van ser amplificats per PCR. En la hibridació sostractiva reversa (Rev), es va substituir el cDNA de múscul de rata control pel cDNA de rata obesa i a la inversa. En la hibridació sostractiva control (Ctrl), cDNA de múscul humà control amb un 2% de DNA corresponent al bacteriòfag ϕ X174 digerit amb HaeIII va ser hibridat (sustret:S) o no (NS) amb un excés de cDNA de múscul humà control. Els fragments resultants en cada cas van ser amplificats per PCR. 10 μ l dels productes de PCR de les hibridacions sustractives (S) directa (Dir), reversa (Rev) i control (Ctrl) i dels respectius controls no sustrets (NS), es van analitzar per Southern Blot amb una sonda de miogenina marcada radiactivament. La miogenina és un gen igualment expressat en totes les preparacions de cDNA provinents de múscul esquelètic, per tant si la sostracció funciona esperem que no hi sigui present entre els productes de les respectives hibridacions sostractives (S), mentre que ho serà de manera abundant en els respectius controls no sustrets (NS). La sonda de miogenina utilitzada reconeix dos fragments de PCR amplificats, producte de la digestió amb RsaI que es fa durant el procés de la hibridació sostractiva.

Com s'observa en la figura 4, dos fragments del mRNA de la miogenina mostren senyal abundant en els tres controls no sostrets, que corresponen al cDNA de rata control en la hibridació sostractiva directa, al cDNA de rata obesa en la hibridació sostractiva reversa, i al cDNA humà amb un 2% de DNA corresponent al bacteriòfag ϕ X174 digerit amb HaeIII, en la hibridació sostractiva control. Després de la sostracció en cadascun dels experiments, desapareix la senyal de miogenina. Això ens confirma la potència de la tècnica, perquè la miogenina, que és un gen igualment abundant en tots els cDNAs de múscul esquelètic, no la recuperem després de sostraure el cDNA del múscul control amb el cDNA del múscul obès o a la inversa. Esperem, per tant, que els cDNAs amplificats en la hibridació sostractiva directa corresponguin només a aquells cDNAs sobreexpressats en el múscul esquelètic control, i els amplificats en la hibridació sostractiva reversa corresponguin a aquells cDNAs sobreexpressats en el múscul esquelètic obès. Respecte la hibridació sostractiva control, només recuperem els fragments del DNA del bacteriòfag ϕ X174 digerit amb HaeIII, i tampoc detectem la senyal de miogenina.

Els productes de PCR resultants de cada hibridació sostractiva van ser digerits amb l'enzim RsaI, per alliberar els adaptadors, i clonats en un plàsmid pBluescript SK+ (Stratagene). Bacteris *E. coli* van ser transformats amb aquests constructes, constituïnt així el que anomenem llibreria de sostracció (directa o reversa, depenent del cas). A continuació es va fer un anàlisi per "Diferencial Screening" (veure "Materials i mètodes") de 288 clons de la llibreria de sostracció directa per excloure falsos positius i identificar aquells fragments de cDNA que fossin realment sobreexpressats en múscul esquelètic control respecte múscul esquelètic obès. Els resultats del "Diferencial Screening" de 96 d'aquests clons es mostren en la figura 5.

En la figura 5 es mostren dues membranes de nylon idèntiques que contenen el DNA de 96 colònies aïllades de la llibreria de sostracció directa. La primera d'elles (panell A) ha estat hibridada amb els productes de PCR de la hibridació sostractiva directa marcats radiactivament. L'altra (panell B) ha estat hibridada amb els productes de PCR de la hibridació sostractiva reversa marcats radiactivament. Les colònies que donen senyal amb les dues hibridacions correspondran

V. Resultats

a cDNAs molt abundants tant en la mostra de múscul control com en la de múscul obès, que el procés d'hibridació sostractiva no ens ha permès eliminar, i que considerem falsos positius. D'aquelles colònies que donen senyal amb la hibridació sostractiva directa però no amb la reversa, es van seleccionar 50. De cadascuna d'elles es va fer una purificació de plàsmid, es va seqüenciar el fragment clonat i es va fer servir com a sonda per anàlisi de Northern Blot emprant RNA total de múscul esquelètic de rates control i obeses.

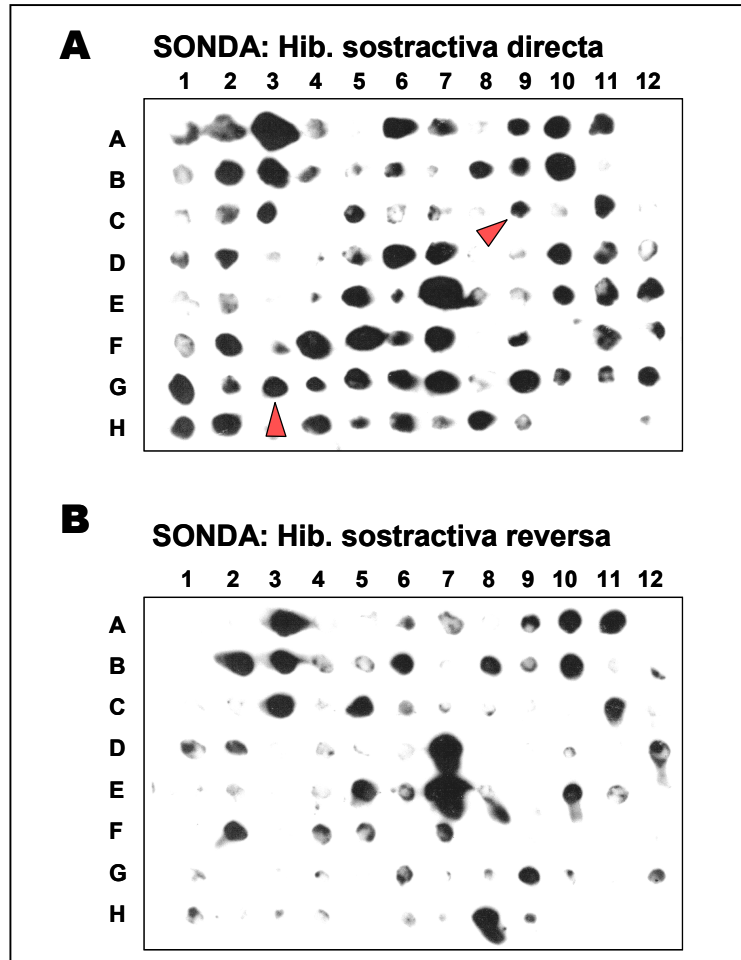


Figura 5. "Differential Screening" de la llibreria de sostractió directa. Dos membranes de nylon van ser preparades amb el DNA de 96 colònies diferents de la llibreria de sostractió directa en cadascuna d'elles (veure "Materials i mètodes"). Una d'elles va ser hibridada emprant com a sonda marcada radiactivament els productes de PCR de la hibridació sostractiva directa (A). L'altra va ser hibridada emprant com a sonda marcada radiactivament els productes de PCR de la hibridació sostractiva reversa (B). Les colònies que donàren positiu en el panell A i en el B foren considerades com a falsos positius. Les colònies que donàren positiu en el panell A i negatives en el B se seleccionaren per a posteriors anàlisis. Els caps de fletxa indiquen la colònia que conté el fragment del gen *Mfn2* (posició C9), i la colònia que conté al fragment del gen *DOR* (posició G3), els quals han estat objecte de profund estudi durant aquesta tesi.

Tenint en compte la informació que aportava la seva seqüència i les caigudes d'expressió en múscul obès detectades per Northern Blot, que es mostraran més endavant, vam seleccionar dos d'aquests clons per a posteriors estudis. Un d'ells corresponia a un gen no identificat fins aleshores, i que hem anomenat DOR ("Diabetes and Obesity Related"). Els estudis duts a terme amb aquest clon es detallen en la secció "Estudis sobre DOR". L'altre clon corresponia a un fragment 3' de la regió no traduïda d'un cDNA de rata prèviament clonat però del qual no s'havia publicat inicialment cap informació a part de la seqüència en les bases de dades d'EST's. Durant l'any 2001 va aparèixer publicada la caracterització del gen humà i de la proteïna, i va ser anomenat Mitofusina-2. Els estudis que vam portar a terme durant aquesta tesi per caracteritzar la funció de Mitofusina-2 apareixen en la secció "Estudis sobre Mitofusina-2".

V.2 ESTUDIS SOBRE MITOFUSINA-2

V.2.1 Identificació del cDNA complet de Mitofusina-2

El fragment de cDNA clonat per hibridació sostractiva, comentat en la secció anterior, i que correspon al gen Mitofusina-2, va ser seqüenciat (figura 6). Aquesta seqüència va ser utilitzada per fer una cerca en diverses bases de dades mitjançant el programa BLAST (veure "Materials i mètodes"). No hi havia cap gen conegut que donés una bona homologia de seqüència amb aquest fragment. En canvi, en la base de dades d'EST vam trobar una seqüència de cDNA de rata (Acc.Nu. U41803), que presentava una identitat total amb el nostre fragment, entre les posicions 2098 i 2419. Igualment vam trobar una seqüència de cDNA humà de 4550 parells de bases (Acc.Nu. D86987; figura 7), que presentava una homologia de seqüència de 79% amb el nostre

```

1  tgtatgagcg gctgacctgg accaccagag ccaaggagag ggccttcaag cgccagtttg
61  tggagtatgc cagtgagaag ctgcagctca ttatcagtta taccggctct aactgcagcc
121 accaagttca gcaagaattg tctgggacat ttgctcatct gtgccagcaa gttgacatca
181 cccgggataa tctggagcag gaaattgctg ccatgaacaa gaaagttgag gctctggatt
241 cacttcagag caaagccaaa ttgctcagga ataaagctgg ctggttgac agcgaactca
301 acatgttcat acacca

```

Figura 6. Fragment de cDNA clonat per hibridació sostractiva. Es va purificar mRNA poli-A a partir de múscul esquelètic de rates control i obeses Zucker, i es va aplicar la tècnica d'hibridació sostractiva tal com es detalla en "Materials i mètodes". Dels productes de PCR resultants, corresponents als cDNA's sobreexpressats en rates control respecte obeses, es va fer una llibreria de sostracció, que es va analitzar posteriorment per "Differential Screening". Dels 288 clons analitzats s'en van seleccionar 50 per seqüenciar i fer Northern Blot. Aquí es presenta el corresponent al gen Mitofusina-2.

V. Resultats

```
1 gtaggcgggg cgagccggct gggctcaggg tccaccagct caccggttc gaggggcaat
61 ctgaggcgac tggtagcgcg cttatccact tccctcctcc cgcctcccc cggggtggcg
121 ctcgctggtg acgtagtgag tgtgatggcc gccgcgaggc cgggaaggtg aagtcaggac
181 tggtaggagtc aacacagtca atcaatagcc aacctcaacc tgagacagga cagaagagaa
241 ctccagaatct ttttgtcttt tggacttcag ccatgtccat gatgcctacc ctgtgaagat
301 ctctcaccat ccaaaaaacg caatgtccct gctcttctct cgatgcaact ctatcgtcac
361 agtcaagaaa aataagagac acatggctga ggtgaatgca tccccactta agcactttgt
421 cactgccaaag aagaagatca atggcatttt tgagcagctg ggggcctaca tccaggagag
481 cgccaccttc cttgaagaca cgtacaggaa tgcagaactg gaccccgtta ccacagaaga
541 acaggttctg gacgtcaaag gttacctatc caaagtgaga ggcatacagtg aggtgctggc
601 tcggaggcac atgaaagtgg ctttttttgg ccggacgagc aatgggaaga gcaccgtgat
661 caatgccatg ctctgggaca aagtctctgcc ctctgggatt ggccacacca ccaattgctt
721 cctgctgggta gagggcacag atggccatga ggctttctc cttaccgagg gctcagagga
781 aaagaggagt gccaagactg tgaaccagct ggcccatgcc ctccaccagg acaagcagct
841 ccatgccggc agcctagtga gtgtgatgtg gcccaactct aagtgccac tctgaagga
901 tgacctcgtt ttgatggaca gccctgggat tgatgtcacc acagagctgg acagctggat
961 tgacaagttt tgtctggatg ctgatgtgtt tgtgctggtg gccactcag agtccacct
1021 gatgcagacg gaaaagcact tcttcacaa ggtgagttag cgtctctccc ggccaaacat
1081 cttcatcctg aacaaccgct gggatgcatc tgcctcagag cccgagtaca tggaggagg
1141 gcggcggcag cacatggagc gttgtaccag cttcctggtg gatgagctgg gcgtgggtga
1201 tcgatcccag gccggggacc gcatcttctt tgtgtctgct aaggaggtgc tcaacgccag
1261 gattcagaaa gcccagggca tgctgaagg agggggcgtc ctgcagaag gctttcaagt
1321 gaggatgttt gagtttcaga attttgagag gagatttag gatgtcatct cccagctctg
1381 agtgaagac aagtttgagc agcacacggt ccgggccaag cagattgac aggcggttcg
1441 actcatcact gactccctgc acatggcggc tcgggagcag caggtttact gcgaggaat
1501 gcgtgaagag cggcaagacc gactgaaatt tattgacaaa cagctggagc tcttggtca
1561 agactataag ctgcgaatta agcagattac ggaggaagtg gagaggcagg tgtcactgc
1621 aatggccgag gagatcaggc gcctctctgt actggtggac gattaccaga tggacttcca
1681 cccttctcca gtagtcctca aggtttataa gaatgagctg caccgccaca tagaggaag
1741 actgggtcga aacatgtctg accgctgctc cacggccatc accaactccc tgcagaccat
1801 gcagcaggac atgatagatg gcttgaacc cctccttct gtgtctgtgc ggagtcagat
1861 agacatgctg gtcccacgcc agtgcttctc cctcaactat gacctaaact gtgacaagct
1921 gtgtgctgac ttccaggaag acattgagtt ccatttctct ctcgatgga ccatgctggt
1981 gaataggttc ctgggcccc aagaacagccg tcgggccttg atgggtaca atgaccaggt
2041 ccagcgtccc atccctctga cgcagccaa cccagcatg cccccactgc cacagggtc
2101 gctcaccag gaggagttca tggtttccat ggttaccggc ctggcctcct tgacatccag
2161 gacctccatg ggcattcttg ttgttgagg agtggtgtgg aaggcagtg gctggcggct
2221 cattgccctc tcctttgggc tctatggcct cctctacgtc tatgagcgtc tgacctggac
2281 caccaaggcc aaggagagg ccttcaagcg ccagtttgtg gagcatgcca cggagaagct
2341 gcagcttgtc atcagctaca ctggctccaa ctgcagccac caagtccagc aggaactgtc
2401 tgggaccttt gctcatctgt gtcagcaagt tgacgtcacc cgggagaacc tggagcagga
2461 aattgccgcc atgaacaaga aaattgaggt tcttgactca cttcagagca aagcaagct
2521 gctcaggaat aaagccggtt ggttgacag tgagctcaac atgttcacac accagtacct
2581 gcagcccagc agatagtggg cacctgaggc ggagtctgcg tggagagggg cgggtgctgcc
2641 agccctaagt gccgtgtggg ctccccagg gccacgtgtg gctcctgcc cctggcact
2701 gccaagagaa tgaagcacc agtctcgtac cattttgagc cctccagcc tactatttt
2761 ccccacctt tgcctgctgt tgcctggaaga gctggctcat accccaaag gacactttca
2821 gcgacagcta tggacagcat ggtaccaagg agttaagttg aggctttttc cagctttctc
```

```

2881 tggttcattt gattgcttga taaggcctca ggatctcagc attgcacaat gcctcatgga
2941 agcctttgag ggtatcacac agacaccccc accttcctcc agcctgtgog cacctgcctt
3001 ccttgcagcc cagcacacct gcaggtgtaa gggacgattg gagtttcttc ccagagagtc
3061 tgtcccagaa ggactgtggc ttgtgtgtgt ccatctcgcc tgttggctca gtgcttcac
3121 ccatttgcag agcctcagac acgtcttggg ggtgaggctc agttaccctt gggcttaggc
3181 tgaggcgggc cctgtgctgg ggggtgtaga aaggatgctg ctgaggcagc tggaggagtg
3241 ggagtagctc agaggggagg gctgttggat gtatggggag ctggcagagc aggtggcagt
3301 cactgggaca aggagggact tgcctctctt ctattattg tgtcctttgc tttagtgtca
3361 gtctgggact tgtgcaggcc tgttttgtgt agatctgttt tggagatgg catggtctag
3421 gtggttgaag gatgtagtag aaggatggat ggtggaaggt ggggacgttg gtggctggct
3481 gaggtgcatg ggccccacac aggacagctg gagaatgggc cgtccacttg gcctcgttct
3541 gcgaggggct catgggtctg agagccccc cccactaggc ttgattgcat ccctgttgtg
3601 ccctttaaga gacatgtttc caccaccacc ccaaccttgt cccaagtgcc ctggactaaa
3661 tttcctgtgc cagtgactgc agttggccaa gggacaatgt ggaaaacca gtgtccatct
3721 ttccaccctc cctgatctcc agaaccttcg actgaccccc ttgtctttat gctgatgttg
3781 agttttggga ttgttactgg ttgaagtggg ggcagatgcc tgtcaccaag gtgttgactg
3841 tgtgagaaaa gcagtttggg tgacaaatcc tgtgtggcac aagttggatc gcttcttaga
3901 aataagcaac acctctccca aaaaagcagc ccacaaggca ggggccagc agcccagcca
3961 tcaactcatc ttgaggaaat gaggttgtag cctctgtgca ctgtttggtg gccacatcac
4021 aggtgatgtc ctgttcacat acctgcttgt atttaaagcc ctcagtctgt cctgttgtgt
4081 ggggcgaagt gatggactct gccagggtga catgctgtgg gtggatgttc ccggcgtgtg
4141 ccgggcctga atggacaggg gccacttcac agcatgtcag ggaaaatcac tgtcacacaa
4201 ttccaatgga ttttgtgctc tttttgaaaa aaaaaaattc tttagcgtaa acatgaattt
4261 tttttcaatg tagcccctgg ggaatgaatg aaattttgag cttcttcaat acgtaaaatt
4321 aaatttatac cactgagggg gagacccttt ctgaaagaag tatggccaaa agcactttaa
4381 tgctgctgac attgttgttt ttatgttcat ttgctggagc gcaagacgtg ctgacacagt
4441 gagttttctc tgatgtattt aagtgatgtt atttgcctga gttactcctg tatcattgct
4501 cataatattg gaaactaaaa taaaacctag ttggaaatcc aaaaaaaaaac

```

Figura 7. Seqüència de cDNA de Mitofusina-2 humà. La seqüència de cDNA de Mitofusina-2 humà va ser trobada utilitzant el fragment clonat per hibridació sostractiva (figura 6) en una cerca BLAST (veure "Materials i mètodes" a la base de dades d'EST del NCBI, nombre d'accés D86987, dipositada per Nagase *et al.*, (1996). És un cDNA de 4550 pb amb una ORF (en negreta) entre les seves posicions 323 i 2594 que codifica per una proteïna de 757 aminoàcids. Subratllat apareix la seqüència homòloga al fragment de cDNA de rata clonat per hibridació sostractiva.

fragment, entre les posicions 2261 i 2577 (subratllat a la figura 7). Aquest clon de cDNA conté una ORF ("Open Reading Frame") entre les posicions 323 i 2594 que codifica per una proteïna de 757 aminoàcids (en negreta a la figura 7). Aquestes dues seqüències van ser directament dipositades en la base de dades per Chen *et al.* (1995) (la seqüència de rata U41803) i per Nagase *et al.* (1996) (la seqüència humana D86987). El clon D86987 va ser amablement cedit pel doctor Takahiro Nagase del Kazusa DNA Research Institute (Japó), i el vam fer servir per a posteriors estudis. Per

V. Resultats

tal de comprovar que el clon cedit pel doctor Nagase corresponia al cDNA sencer de Mitofusina-2, vam amplificar i seqüenciar l'extrem 5' del missatger a partir de cDNA de múscul esquelètic humà, mitjançant la tècnica de SMART RACE-PCR (veure "Materials i mètodes"). El resultat de l'amplificació coincideix amb l'extrem 5' del clon D86987, i ens confirma que aquest clon representa un cDNA sencer. En un recent treball de Santel *et al.* (2001) s'ha identificat aquest gen com Mitofusina-2.

V.2.2 Expressió de Mitofusina-2 en rates obesas Zucker

A continuació es presenten els resultats dels estudis realitzats a partir del fragment de cDNA clonat per hibridació sostractiva corresponent al gen Mitofusina-2. El primer que es va fer, va ser comprovar per Northern Blot la caiguda d'expressió del gen Mitofusina-2 en el múscul esquelètic de rates obesas Zucker. Aquestes rates són obesas per una mutació en el receptor de la leptina i presenten resistència a la insulina en teixits perifèrics. Malgrat tot, són capaces de compensar la resistència a la insulina amb una major secreció d'hormona i mantenen la normoglicèmia. També vam voler comprovar com era l'expressió de Mitofusina-2 en les rates ZDF (Zucker Diabetic Fatty), que també presenten una mutació en el receptor de la leptina i són obesas. Aquestes rates, en afegit, presenten diabetis de tipus 2 des de les primeres setmanes de vida, per causa d'una fallada en la cèl·lula β que les impedeix compensar la resistència a la insulina. Per fer aquests experiments de Northern Blot, es va purificar RNA total a partir de múscul esquelètic (gastrocnemius) de cadascun d'aquests models animals. Es van carregar 20 μ g d'RNA total a cada carril d'un gel d'agarosa, es van transferir a una membrana de niló segons la tècnica de Northern Blot (veure "Materials i mètodes"), i la membrana es va hibridar amb el fragment de cDNA corresponent al gen Mitofusina-2 provinent de la hibridació sostractiva, marcat radioactivament. Com a control de càrrega es va prendre la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 18S de l'RNA ribosòmic. Els resultats d'aquests Northern Blot es presenten en la figura 8.

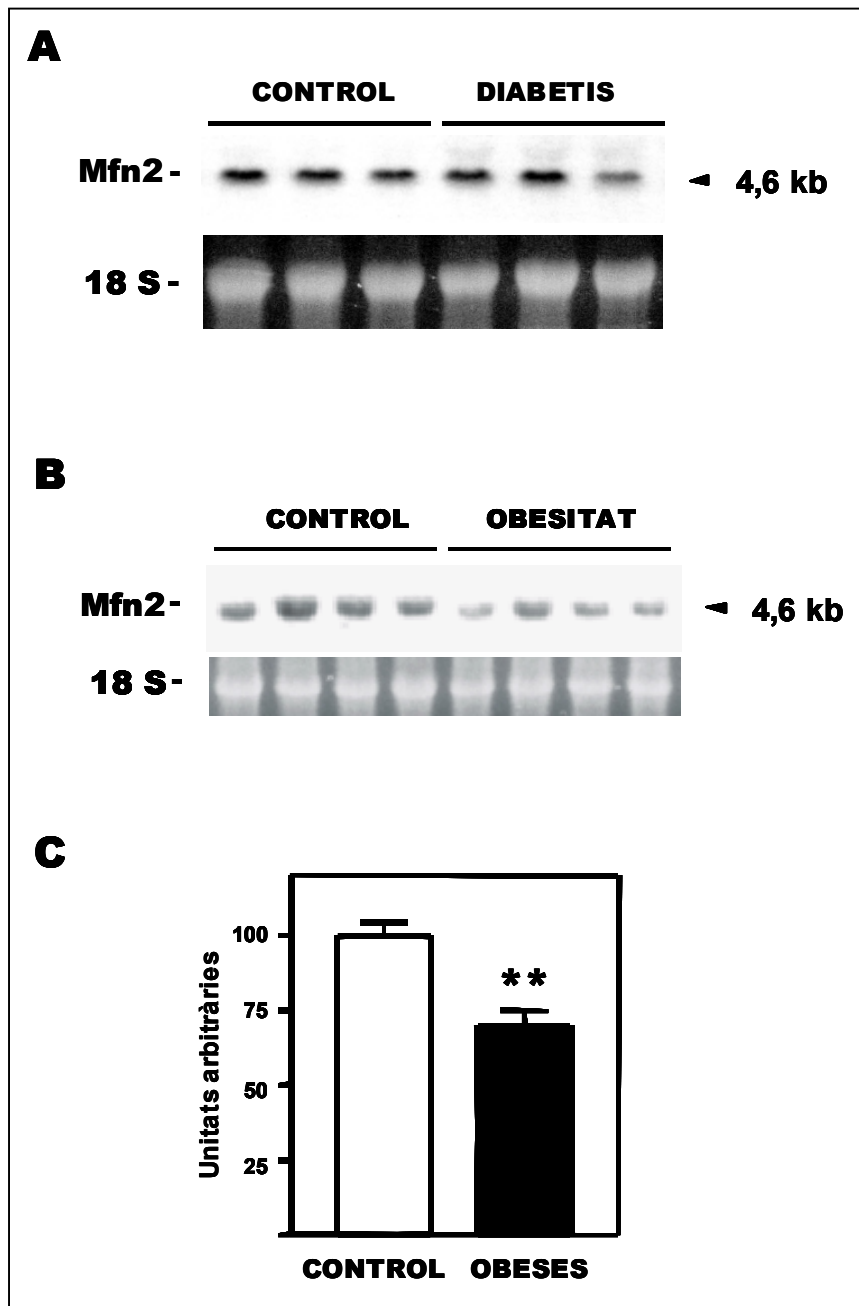


Figura 8. Expressió de Mitofusina-2 en rates obeses (Zucker) i diabètiques (ZDF). Es va purificar RNA total a partir de múscul esquelètic (gastrocnemius) de rates obeses Zucker i diabètiques ZDF. Es van aplicar 20 µg d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de Mitofusina-2 es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. Es mostra un experiment representatiu amb cada condició. En el panell C es mostra el resultat de l'anàlisi densitomètric de 4 observacions independents expressats com a mitges±ES d'unitats arbitràries.

V. Resultats

Mitjançant la tècnica de Northern Blot, es detecta una única senyal de Mitofusina-2 amb una mobilitat electroforètica corresponent a un mRNA de 4.6 kb. No hi ha diferències d'expressió del gen Mitofusina-2 entre les rates control i les rates ZDF (panell A). En canvi, l'expressió de Mitofusina-2 en les rates obesas Zucker es troba reduïda en un $44\pm 9\%$ respecte les rates control d'una manera estadísticament significativa (** $P < 0.01$, panells B i C). Es confirma doncs, que el gen Mitofusina-2 està sobreexpressat en les rates controls respecte les obesas, com ja ens havia indicat la tècnica d'hibridació sostractiva.

V.2.3 Distribució tissular de Mitofusina-2 en rata

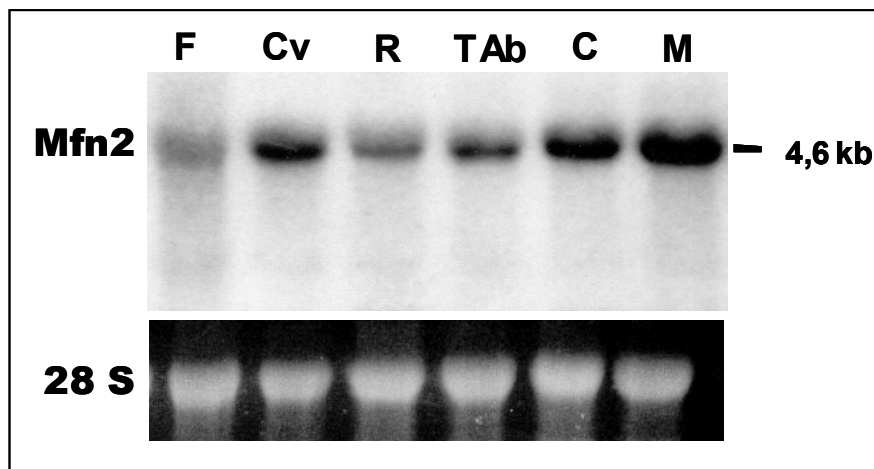


Figura 9. Expressió de Mitofusina-2 en diferents teixits en la rata. Es va purificar RNA total a partir de diferents teixits de rata Wistar. Es van aplicar 20 μg d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de Mitofusina-2 es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. F: fetge; Cv: cervell; R: ronyó; TAb: teixit adipós blanc; C: cor; M: múscul esquelètic.

A continuació vàrem determinar la distribució tissular de Mitofusina-2 en rata. Vam fer anàlisi de Northern Blot fent servir el mateix fragment de cDNA com a sonda marcada radioactivament, per detectar Mitofusina-2 en diferents teixits de rata. Per fer-ho, es van carregar 20µg d'RNA total de cada teixit en un gel d'agarosa, i es van transferir a una membrana de niló (veure "Materials i mètodes"). Com a control de càrrega es mostra la tinció de bromur d'etidi de la subunitat 18S de l'RNA ribosòmic. Els resultats es mostren en la figura 9. S'aprecia una única senyal corresponent a un mRNA de 4.6 kb, que és especialment intensa en cor i múscul esquelètic, però també la detectem en cervell, teixit adipós blanc, fetge i ronyó.

V.2.4 Expressió de Mitofusina-2 en cèl·lules 3T3-L1 i L6E9

També vam estudiar l'expressió del gen Mitofusina-2 en les línies cel·lulars 3T3-L1 i L6E9. La línia 3T3-L1 és una línia de fibroblasts murins capaços de diferenciar a adipòcits, mentre que la línia L6E9 és una línia de mioblasts de rata que en determinades condicions són capaços de fusionar i generar miotubs. L'estudi es va fer per Northern Blot utilitzant 20µg d'RNA total d'aquests tipus cel·lulars en diferents estats de diferenciació, com a sonda es va fer servir el mateix fragment de cDNA clonat per hibridació sostractiva, marcat radioactivament. Com a control de càrrega es mostra la tinció de bromur d'etidi de la subunitat 18S de l'RNA ribosòmic. Els resultats es mostren en la figura 10.

En cèl·lules 3T3-L1 i L6E9, l'mRNA de Mitofusina-2 té una mida de 4.6 kb i s'incrementa considerablement la seva expressió durant la diferenciació d'aquestes dues línies cel·lulars a adipòcits i miotubs, respectivament. Aquestes dades, juntament amb el patró d'expressió en teixits que hem comentat abans, suggereixen que l'expressió de Mitofusina-2 està associada a la biogènesi de múscul i teixit adipós.

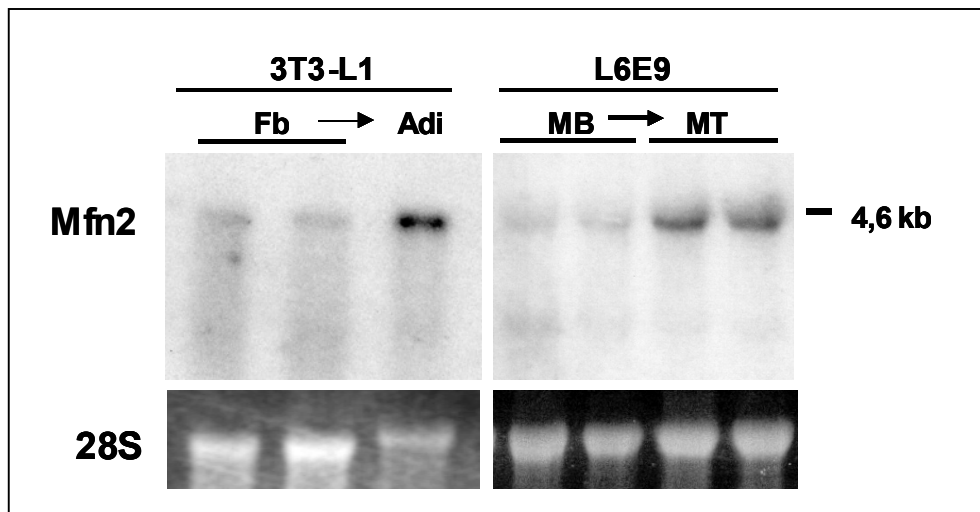


Figura 10. Expressió de Mitofusina-2 en cèl·lules 3T3-L1 i L6E9. Es va purificar RNA total a partir de diferents línies cel·lulars. Es van aplicar 20 µg d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de Mitofusina-2 es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. Fb: fibroblasts; Adi: adipòcits; MB: mioblasts; MT: miotubs.

V.2.5 Distribució tissular de Mitofusina-2 en humans

Donats els resultats obtinguts fins aleshores amb el fragment de cDNA clonat per hibridació sostractiva, ens vam disposar a estudiar l'expressió de Mitofusina-2 en diferents teixits humans. Per fer-ho, vam utilitzar una membrana comercial de Clontech en la qual s'havien transferit 2 µg d'mRNA poli-A de diferents teixits humans, en cada carril. En paral·lel vam fer assajos de Northern Blot utilitzant 20 µg d'RNA total de múscul esquelètic i teixit adipós blanc humans, ja que aquest últim teixit no era inclòs en la membrana proporcionada per Clontech. Com a sonda es va utilitzar el fragment de cDNA de rata clonat per hibridació sostractiva marcat radioactivament. Com a control de càrrega es va hibridar la membrana posteriorment amb una sonda contra la β-actina. El resultat es mostra en la figura 11.

Els Northern Blot es van realitzar en condicions de severitat que permetessin fer comparables les senyals de múscul esquelètic. Com es veu en la figura l'mRNA de Mitofusina-2 té una mida d'uns 4,6 kb i la seva expressió és especialment intensa en múscul esquelètic, en cor i en teixit adipós blanc, però també s'expressa, tot i que en menor quantitat, en cervell, en ronyó i en fetge.

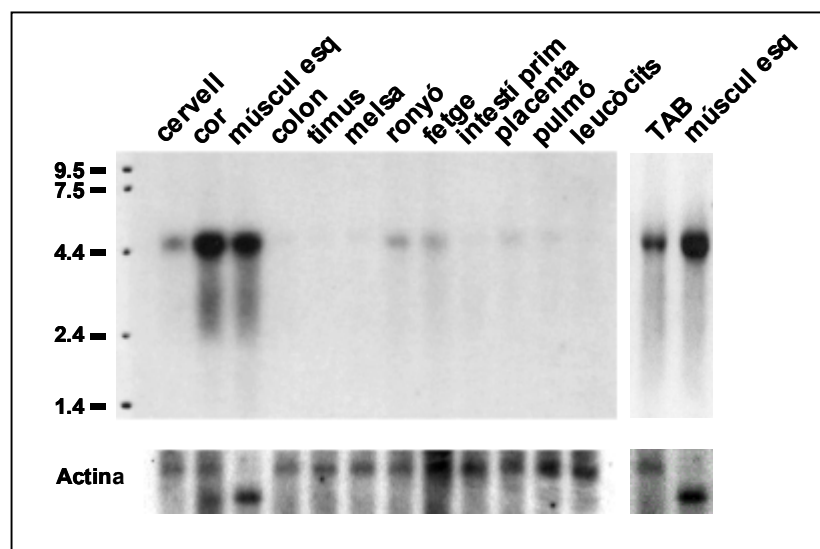


Figura 11. Expressió de Mitofusina-2 en diferents teixits humans. Es va utilitzar una membrana comercial (Clontech) que tenia 2 µg d'mRNA poli-A a cada carril per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de Mitofusina-2 es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La càrrega en cada carril va ser comprovada a partir de la hibridació de la membrana amb una sonda contra la β-actina. TAB: teixit adipós blanc, es va analitzar en una membrana independent, amb múscul esquelètic com a control.

mostra	Edat (anys)	Alçada (m)	Pes (kg)	EMI (kg/m ²)	valor M (µmol/m ² /l)	FFA (µmol/l)	TG (µmol/l)	Glc (mmol)	Ins (pM)	CC (µM)	Glicerol (µM)	DADES BASAL			DADES CLAMP			Chol (mmol/l)	HB1C (%)	
												Ut Glu (µmol/m ² /l)	Ox Glu (µmol/m ² /l)	Ox Lip (µmol/m ² /l)	Ut Glu (µmol/m ² /l)	Ox Glu (µmol/m ² /l)	Ox Lip (µmol/m ² /l)			Stock Glu (µmol/m ² /l)
Controls																				
34	21	1,68	60	21	1898	513	632	4,5	30	177	60	440	196	145	1898	815	0	1083		
36	21	1,73	59	20	2186	198	661	4,5	36	22	50	546	441	59	2186	803	41	1383		
38	22	1,68	72	26	2545	543	289	4,8	66	81	54	413	69	168	2545	606	54	1939		
120	27	1,73	59	20	1432	566	1020	4,7	36	155	54	527	134	172	1432	588	41	844		5,3
123	28	1,59	61	24	2202	524	664	4,3	30	244	41	567	188	175	2202	733	72	1469		5,1
126	23	1,69	57	20	1716	299	267	4,0	30	43	42	401	245	146	1761	785	19	976		
15	20	1,82	81	24	389			4,4	10											
17	21	1,80	71	22	625			4,2	9											
19	22	1,92	82	22	210			4,5	5											
23	32	1,66	59	21	518			4,2	8											
29	26	1,75	66	22	710			4,1	11											
Mitges	24	1,73	66	22	1997	464	589	4,4	25	120	50	482	212	144	2004	722	38	1282	4,5	5,2
SE	1	0,03	3	1	162	50	114	0,1	6	35	3	30	52	18	159	41	10	163	0,5	0,1
Diabètics de tipus 1																				
1	23	1,83	75	22	2050	708	379	13,9		251	108	2050	337	137	2050	601	79	1449		
3	32	1,53	59	25	1823	355	484	13,1		164	77	1823	347	69	1823	635	4	1188		
5	41	1,75	64	21	2238	131	483	10,7		71	28	2238	390	82	2238	817	7	1421		
7	44	1,68	56	20	1536	718	406	7,7		316	78	1536	245	123	1536	588	24	948		
9	24	1,63	57	21	859	744	354	16,7		481	86	859	187	109	859	672	14	187		
11	43	1,71	76	26	1719	543	435	13,7		674	55	1719	169	152	1719	791	47	928		
13	29	1,63	63	24	1568	994	514	13,8		1169	106	1568	284	95	1568	632	26	936		
15	33	1,73	70	23	751	1031	413	17,8		2779	112	751	258	143	751	336	75	415		
17	27	1,65	66	24	2784	228	446	10,9		80	33	2784	509	79	2784	882	19	1902		
Mitges	33	1,68	65	23	1703	606	435	13,1		665	76	1703	303	110	1703	662	33	1042		
SE	3	0,03	3	1	213	106	18	1,0		289	10	213	35	10	213	54	9	176		

Taula 2. Dades dels pacients controls i diabètics de tipus 1 procedents del Centre de Recherche en Nutrition Humaine (Lyon, França). De cadascun dels pacients, tots ells voluntaris, es va extreure una biòpsia amb agulla de múscul esquelètic (vastus lateralis), segons la metodologia emprada en el centre. Per cada pacient es van determinar el dia de la biòpsia, l'edat, l'alçada, el seu pes i el seu índex de massa corporal (BMI), també es va fer a cada pacient un anàlisi bioquímic a partir del sèrum, en que es van mesurar els nivells en estat basal de: glucosa (Glc), insulina (Ins), àcids grassos lliures (FFA), triglicèrids (TG), colesterol total (chol), glicerol, cossos cetònics (CC) i hemoglobina glicada (Hb1C). En afegit es va sotmetre a cada pacient a un "clamp" euglicèmic hiperinsulinèmic juntament amb una mesura de calorimetria indirecta per determinar el consum de glucosa basal (Ut Glu Basal), l'oxidació de glucosa basal (Ox Glu Bas), l'oxidació de lípids basal (Ox Lip Bas) i la seva sensibilitat a insulina (valor M) o altrament dit consum de glucosa durant el "clamp" (Ut Glu Clamp), l'oxidació de glucosa durant el "clamp" (Ox Glu Clamp), l'oxidació de lípids durant el "clamp" (Ox Lip Clamp) i la glucosa consumida no oxidada durant el "clamp" (Stock Glu). Totes les dades referents al consum i oxidació de substrats s'expressen com µmol de substrat per m² de superfície corporal i minut. A sota es presenten les dades promig de cada grup i l'error estàndard (SE).

Mostra	BMI (kg/m ²)	Edat (anys)	Greix total (%)	VO ₂ max (ml/kg/min)	Ins (μU)	Glc (mmol/l)	valor M (mg/kg/min)	FFA (μmol/l)	TG (mmol/l)	HDL Chol (mmol/l)	Lipoprot a (g/l)
Controls											
1	24	65	20,2	24,8	6,7	5,10	56,50	562	0,8	1,6	0,60
2	28	59	31,0	28,3	2,9	5,50	41,84	660	1,8	1,1	0,13
3	25	61			11,0	5,20					
4	24	51	18,0	31,8	5,7	4,66	60,90	408	1,1	1,4	0,06
5	24	59	25,7	30,2	6,6	4,76	34,26	414	1,1	1,1	0,67
6	25	60	20,6	31,7	73,0	5,34	27,48	707	1,5	1,1	0,13
7	26	64	28,9	19,8	7,2	4,67		403	1,4	1,2	0,04
8	29	55	24,5	32,6	16,0	5,64	29,09	440	1,5	1,4	0,03
9	25	52									
Mitges	26	58	24,1	28,5	16,1	5,11	41,68	513	1,3	1,3	0,24
SE	1	2	1,8	1,8	8,2	0,13	5,79	49	0,1	0,1	0,10
Diabètics de tipus 2											
10	24	61	19,1	30,2	10,7	7,40	32,92	702	1,1	1,7	0,04
11	33	49	32,2	30,8	71,0	6,10	10,09	343	1,7	0,8	0,07
12	28	52	21,3	29,0	11,0	6,56	52,20	420	0,8	1,4	0,18
13	21	58	12,8	36,6	5,4	8,43	42,67	573	1,6	0,9	0,13
14	27	63		33,6	9,2	7,66	43,91		0,8	1,1	0,19
15	26	60	20,0	33,8	12,0	7,70	15,05	402	1,6	1,0	
16	29	53	31,9		7,2	5,50	20,84	658	0,7	1,7	
17	32	58	27,2	24,1	24,0	13,30	13,75	1023	2,1	1,3	
Mitges	28	57	23,5	31,2	18,8	7,83	28,93	589	1,3	1,2	0,12
SE	1	2	2,7	1,5	7,7	0,85	5,69	89	0,2	0,1	0,03

Taula 3. Dades dels pacients controls i diabètics de tipus 2 no obesos procedents del Karolinska Institute (Stockholm, Suècia). De cadascun dels pacients, tots ells voluntaris, es va extreure una biòpsia amb agulla de múscul esquelètic (vastus lateralis), segons la metodologia emprada en el centre. Per cada pacient es van determinar el dia de la biòpsia el seu índex de massa corporal (BMI), l'edat, el greix total corporal en percentatge i la velocitat màxima de consum d'oxigen (VO₂ max), també es va fer a cada pacient un anàlisi bioquímic a partir del sèrum, en que es van mesurar els nivells en estat basal de: glucosa (Glc), insulina (Ins), àcids grassos lliures (FFA), triglicèrds (TG), HDL colesterol (HDL chol), i lipoproteïna A (Lipoprot A). En afegit es va sotmetre a cada pacient a un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic per determinar la seva sensibilitat a insulina (valor M), que s'expressa com mg de glucosa infundida per kilogram de pes corporal i minut. A sota es presenten les dades promig de cada grup i l'error estàndard (SE).

V.2.6 Expressió de Mitofusina-2 en la diabetis i l'obesitat humana

Un cop analitzada l'expressió de Mitofusina-2 en diferents condicions en rates, i comprovat que efectivament hi havien diferències d'expressió segons l'estat fisiològic de l'animal, vam estudiar quin era el comportament del gen en individus humans. Per fer-ho comptàvem amb mostres de múscul esquelètic (vastus lateralis), procedents de dos grups de pacients, uns procedents del Karolinska Institute (Stockholm, Suècia) i uns altres del Centre de Recherche en Nutrition Humaine (Lyon, França). Aquest darrer grup consta l'hem analitzat dividit en dos subgrups en funció de la seva edat. En la taula 1 apareixen les característiques dels individus procedents de Lyon d'edats

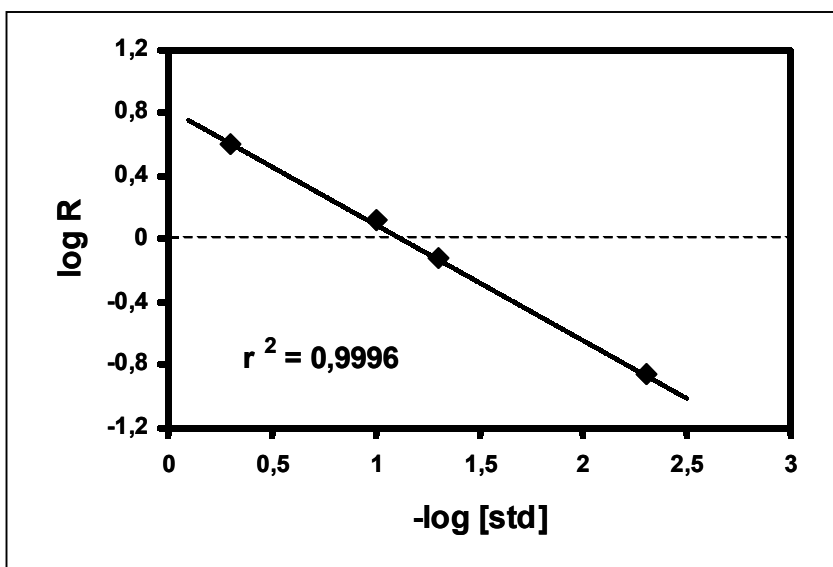


Figura 12. Experiment representatiu de PCR quantitativa competitiva per la mesura de l'expressió de Mitofusina-2. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic humà (vastus lateralis), i es va sintetitzar a partir d'ell cDNA. Es va dissenyar i sintetitzar un estàndard amplificable amb el mateix parell de "primers" que Mitofusina-2, però donant un producte lleugerament diferent en mida (200 pb en lloc de 300 pb), i es va coamplificar cada mostra de cDNA amb diferents concentracions d'estàndard. Es va mesurar la intensitat de les bandes amplificades per densitometria òptica o per fluorescència (veure "Materials i mètodes"). Sobre l'eix *x* es projecta el valor negatiu del logaritme de les concentracions d'estàndard usades (que oscil·len entre 0,001 i 1 amols/ μ l), i sobre l'eix *y* el logaritme d'*R*, essent *R* el quocient entre la intensitat de la banda corresponent a l'amplificació de l'estàndard i la intensitat de la banda corresponent a l'amplificació de Mitofusina-2. Allà on la recta talla el punt 0 de l'eix *y* (*R*=1; idèntica intensitat de banda d'amplificació dels dos productes), s'extrapola la concentració d'estàndard en aquell punt. Suposant idèntica eficiència d'amplificació per Mitofusina-2 i per l'estàndard usat, aquesta serà la concentració de Mitofusina-2 en la mostra problema de cDNA. La linealitat de la mesura en aquest rang de concentracions va ser molt bona ($r^2=0,9996$).

V. Resultats

mitjanes compreses entre 44 i 52 anys, i subdividits en: **controls**, **diabètics tipus 2 obesos** i **obesos no diabètics**. En la taula 2 apareixen les característiques dels individus procedents de Lyon més joves, d'edats mitjanes de 23 i 33 anys corresponents als subgrups de **controls** i de **diabètics de tipus 1**. El grup d'individus procedents de Suècia, d'edats mitjanes de 57 i 58 anys, consta d'un grup **control** i un grup que anomenarem **diabètics de tipus 2 no obesos** atés el BMI mitjà del grup, tot i que tenen un grau d'obesitat superior als controls, i que de fet dos individus del grup són obesos (BMI>30). El grau d'obesitat apareix indicat a les taules amb les sigles BMI ("Body Mass Index"), i correspon al valor resultant de dividir el pes de l'individu en quilograms per l'alçada en metres elevada al quadrat (veure "Introducció"). Com a valor M s'entén el grau de sensibilitat a insulina mesurada per un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic. Aquesta tècnica, que es va aplicar a tots els pacients estudiats, consisteix en infondre insulina en el pacient fins a uns nivells en els quals s'activa el transport de glucosa en teixits perifèrics i s'inhibeix la producció hepàtica de glucosa i la lipòlisi; en paral·lel, es fa una infusió de glucosa per tal de mantenir la euglucèmia. Tot aquest procés té lloc durant 3 hores. El valor M és la quantitat de glucosa infosa per minut i pes corporal (mg/kg/min) o bé per superfície corporal ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{min}$). Quan més gran sigui aquest valor, major serà la glucosa absorbida en resposta a insulina (sensibilitat a insulina).

En tots els casos es va aplicar el mateix protocol de PCR competitiva quantitativa per mesurar els nivells d'mRNA de Mitofusina-2, tal com es descriu en "Materials i mètodes". En la figura 12 es mostra un experiment representatiu amb un dels pacients que dóna una mesura de la linealitat de la tècnica en el rang de concentracions d'estàndard que es va fer servir per Mitofusina-2.

V.2.6.1 Expressió de Mitofusina-2 en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos

Vam estudiar els nivells d'mRNA de Mitofusina-2 per PCR competitiva quantitativa, a partir d'RNA total dels pacients de Lyon (França). El grup constava de 7 individus control prims (BMI: 23 ± 1), 6 individus obesos (BMI: 34 ± 1), i 18 individus diabètics de tipus 2 obesos (BMI: 31 ± 1) d'edats similars (veure taula 1). Els individus obesos eren normoglicèmics i hiperinsulinèmics, i mostraven una absorció de glucosa estimulada per insulina mesurada per "clamp" euglicèmic hiperinsulinèmic, un 50% menor que els individus controls ($4,9 \pm 0,8$ i $10,1 \pm 1,1$ mg/kg.min per als individus obesos i prims, respectivament). La sensibilitat insulina era menor en els pacients diabètics de tipus 2 ($3,9 \pm 0,5$ mg/kg.min), aquests eren hiperglicèmics i hiperinsulinèmics. L'expressió de Mitofusina-2 és un $40 \pm 16\%$ menor en els individus obesos ($P < 0,05$) i no es veuen diferències estadísticament significatives ($20 \pm 18\%$ de reducció) en pacients diabètics de tipus 2 respecte els individus control (figura 13).

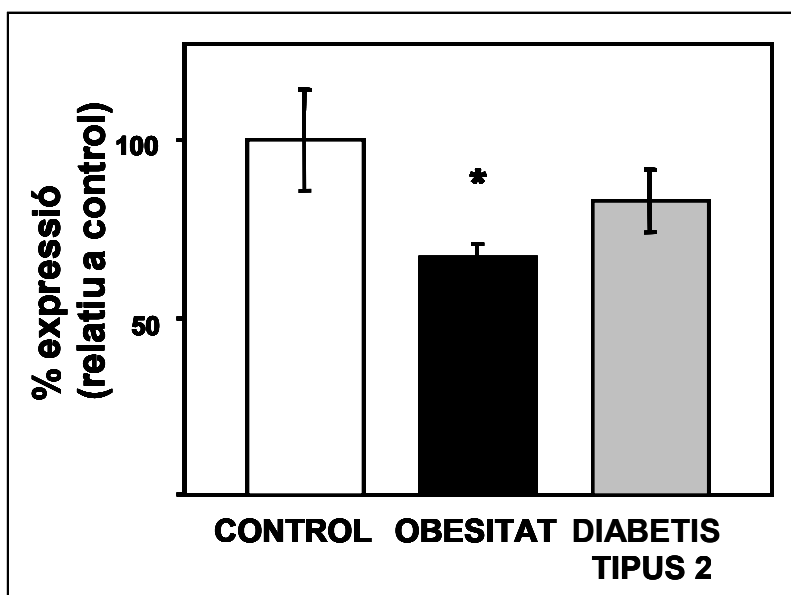


Figura 13. Expressió del mRNA de Mitofusina-2 en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls, de pacients diabètics tipus 2 obesos, i de pacients obesos no diabètics. L'mRNA de Mitofusina-2 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES de set, divuit, i sis observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte el grup control. * indica una diferència estadísticament significativa respecte els subjectes control, a $P < 0,05$.

V. Resultats

En considerar conjuntament totes aquestes dades, vàrem detectar significatives correlacions lineals entre els nivells d'mRNA de Mitofusina-2 i diferents paràmetres fisiològics (figura 14). Apareixia una correlació negativa amb el grau d'obesitat (BMI; $r=0,445$; $P<0,05$), una correlació positiva amb el grau de sensibilitat a insulina (valor M; $r=0,565$; $P<0,05$), i una correlació negativa amb els nivells de triglicèrids en sèrum (TG; $r=0,434$; $P<0,05$). Amb aquests pacients també s'observava una bona correlació entre els nivells de Mitofusina-2 i la taxa basal d'oxidació de lípids (Ox.Lip.Basal; $r=0,426$; $P<0,05$). En resum, baixos nivells d'mRNA de Mitofusina-2 s'associen a un elevat BMI, a una disminuïda sensibilitat a insulina, a nivells elevats de triglicèrids

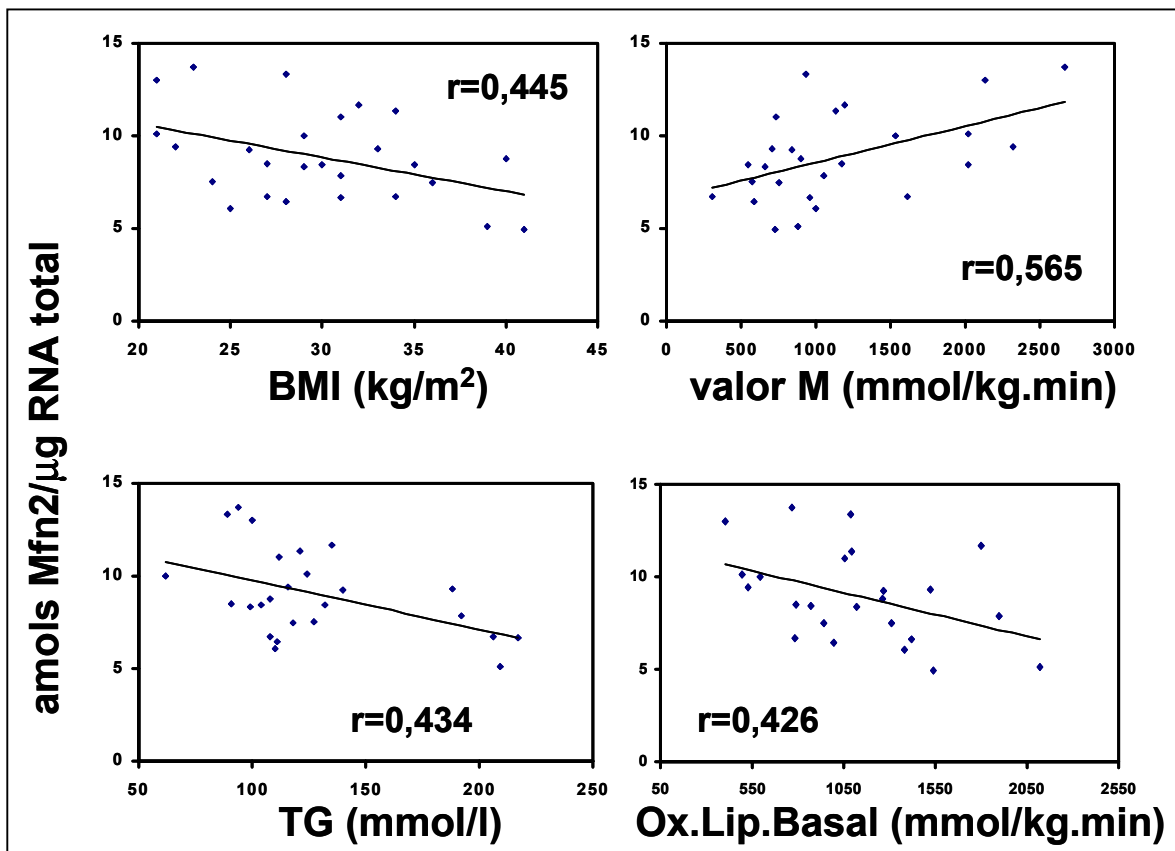


Figura 14. Correlació de l'expressió de Mitofusina-2 amb el grau d'obesitat (BMI), la sensibilitat a insulina (valor M), els nivells de triglicèrids (TG) i l'oxidació basal de lípids (Ox.Lip.Basal) en pacients control, obesos i diabètics de tipus 2 obesos. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls, obesos i de pacients diabètics tipus 2 no obesos. L'mRNA de Mitofusina-2 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"), i expressat com amols d'mRNA de Mitofusina-2 per μg d'RNA total. Es mostra la correlació entre els nivells d'mRNA de Mitofusina-2 en múscul esquelètic i diversos paràmetres fisiològics en pacients controls i diabètics de tipus 2. Les dades s'ajusten a una funció lineal de manera estadísticament significativa ($P<0,05$) essent el coeficient de correlació $r=0,445$ pel grau d'obesitat (BMI); $r=0,565$ per la sensibilitat a insulina (valor M); $r=0,434$ per nivells de triglicèrids en sèrum (TG); $r=0,426$ per l'oxidació basal de lípids (Ox. Lip.Basal).

en sèrum, i a una elevada taxa basal d'oxidació de lípids. D'aquestes correlacions no en podem treure cap conclusió de relacions causa-efecte amb cap dels paràmetres estudiats, però indiquen una possible relació de Mitofusina-2 amb el grau d'obesitat i el metabolisme lipídic.

V.2.6.2 Expressió de Mitofusina-2 en pacients diabètics de tipus 2 no obesos

Es va estudiar l'expressió de Mitofusina-2 en múscul esquelètic de 9 individus control i 8 individus diabètics de tipus 2 no obesos, que conformaven el grup de pacients del Karolinska Institute (Suècia) (taula 3). Els nivells de l'mRNA de Mitofusina-2 en aquests dos grups apareixen en la figura 15 com a percentatge d'expressió respecte el grup control. No s'observen variacions estadísticament significatives en els nivells de Mitofusina-2 entre el grup control i el grup diabètic de

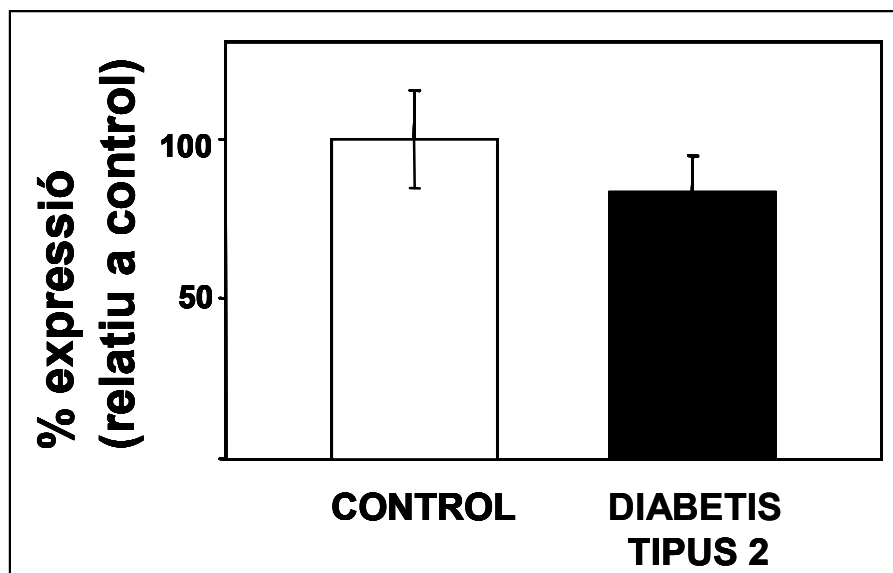


Figura 15. Expressió de Mitofusina-2 en pacients diabètics de tipus 2 no obesos. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 2 no obesos. L'mRNA de Mitofusina-2 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES, de nou i vuit observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte al grup control.

V. Resultats

tipus 2, malgrat que aquest presenta una reducció del 17% d'expressió mitja respecte el grup control, (control: $100 \pm 15\%$; diabètics: $83 \pm 11\%$). Aquesta tendència recorda el que ja havíem vist en l'expressió de Mitofusina-2 en el grup de diabètics obesos de Lyon.

Quan considerem conjuntament totes les dades, s'observa una bona correlació dels nivells d'expressió de Mitofusina-2 amb diferents paràmetres fisiològics, com es mostra en la figura 16. En aquesta figura, observem una correlació negativa ($r=0,539$) de l'expressió de Mitofusina-2 amb el grau d'obesitat (BMI), estadísticament significativa ($P<0,05$). De manera que quan més gran és el grau d'obesitat, menor és l'expressió de Mitofusina-2. Igualment, els nivells d'expressió de Mitofusina-2 s'ajusten a una funció lineal ($r=0,542$) quan els correlacionem amb el grau de sensibilitat a insulina mesurat mitjançant "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic (el valor M) d'una manera estadísticament significativa ($P<0,05$), de manera que a nivells baixos d'expressió de Mitofusina-2 en múscul esquelètic menor és la sensibilitat a la insulina. Per últim, l'expressió de Mitofusina-2 també correlaciona amb els nivells de triglicèrids ($r=0,628$, $P<0,05$) en aquests pacients, dels quals no tenim dades de taxa d'oxidació lipídica, a diferència dels pacients francesos.

En resum, baixos nivells d'mRNA de Mitofusina-2 s'associen a un elevat BMI, una disminuïda sensibilitat a insulina, i uns nivells de TG anormalment elevats. No és possible establir relacions causa-efecte a partir d'aquestes dades, ni tampoc establir si existeix una relació directa amb algun d'aquests paràmetres. De fet, tots tres estan relacionats entre ells, ja que un elevat BMI és causa d'una disminució de la sensibilitat a la insulina (veure "Materials i mètodes") i va acompanyat d'alts nivells de triglicèrids en sang. Però en qualsevol cas indiquen que expressions reduïdes de Mitofusina-2 acompanyen aquest fenotip.

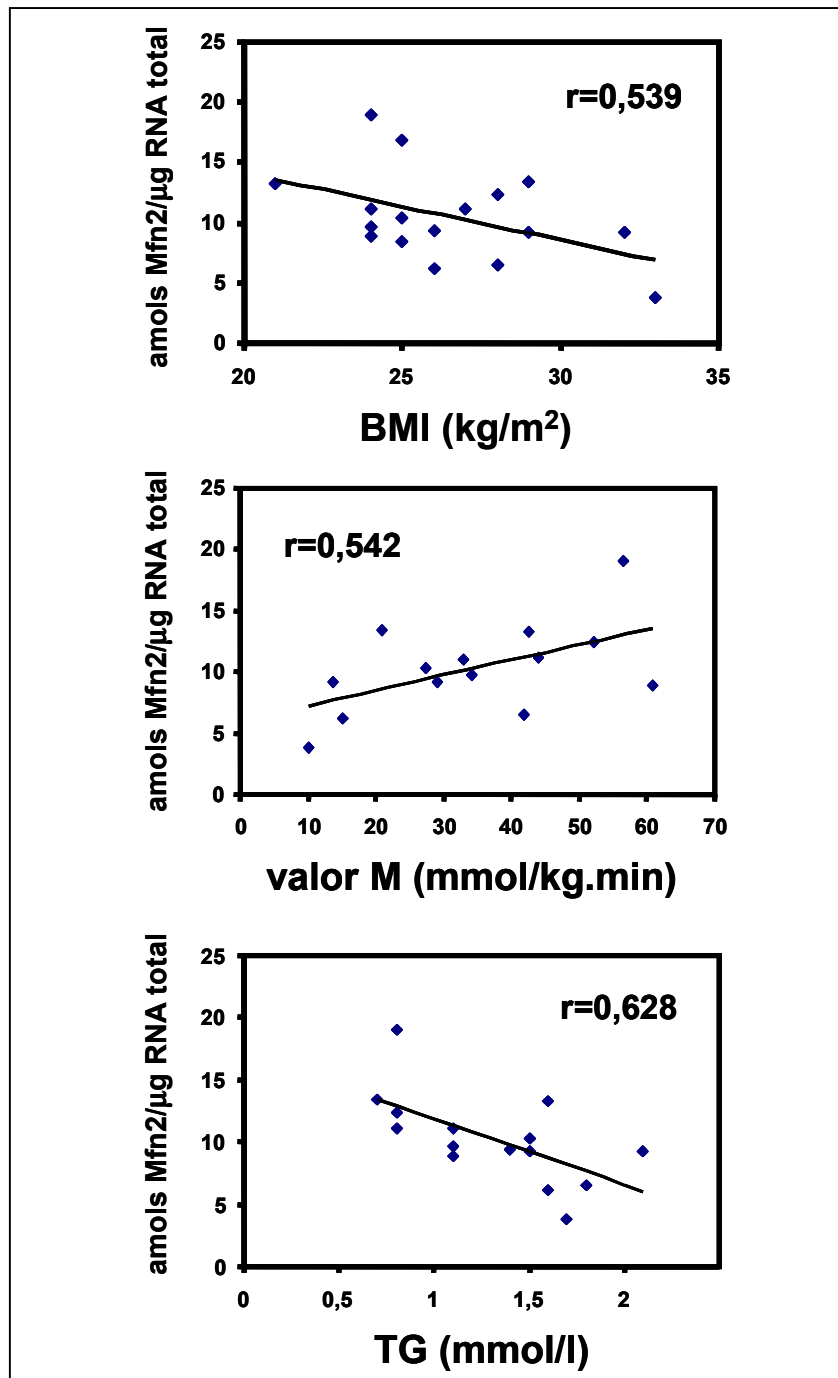


Figura 16. Correlació de l'expressió de Mitofusina-2 amb el grau d'obesitat (BMI), la sensibilitat a insulina (valor M) i els nivells de triglicèrids (TG) en pacients control i diabètics de tipus 2 no obesos. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 2 no obesos. L'mRNA de Mitofusina-2 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"), i expressat com amols d'mRNA de Mitofusina-2 per μg d'RNA total. Es mostra la correlació entre els nivells d'mRNA de Mitofusina-2 en múscul esquelètic i diversos paràmetres fisiològics en pacients controls i diabètics de tipus 2. Les dades s'ajusten a una funció lineal de manera estadísticament significativa ($P<0,05$) essent el coeficient de correlació $r=0,539$ pel grau d'obesitat (BMI); $r=0,542$ per la sensibilitat a insulina (valor M) i $r=0,628$ per nivells de triglicèrids en sèrum (TG).

V. Resultats

V.2.6.3 Expressió de Mitofusina-2 en diabetis de tipus 1

Els nivells d'expressió de Mitofusina-2 van ser també mesurats per PCR competitiva quantitativa en els 11 individus controls primis i 9 individus diabètics de tipus 1 d'edats similars, procedents de Lyon (taula 2). Els resultats es mostren en la figura 17. S'observa un increment d'un $37\pm 24\%$ en l'expressió de Mitofusina-2 en els individus diabètics de tipus 1 respecte el grup control ($P < 0,05$).

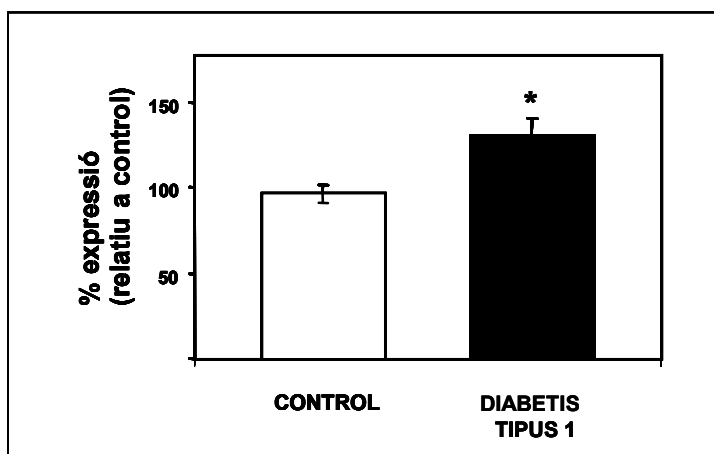


Figura 17. Expressió de Mitofusina-2 en pacients diabètics de tipus 1. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 1. L'mRNA de Mitofusina-2 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES, d'onze i vuit observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte al grup control. * indica una diferència estadísticament significativa entre els subjectes control i els diabètics de tipus 1, a $P < 0,05$.

Quan s'incorporen aquestes dades a les de la resta del grup de Lyon i es consideren conjuntament continuen mantenint-se correlacions estadísticament significatives de l'expressió de Mitofusina-2 amb BMI ($r=0,359$; $P < 0,05$), sensibilitat a insulina ($r=0,357$; $P < 0,05$), nivells de triglicèrids en sèrum ($r=0,353$; $P < 0,05$) i oxidació basal de lípids ($r=0,487$; $P < 0,005$), com les observades a les figures 14 i 16.

V.2.7 Efecte de la insulina sobre l'expressió de Mitofusina-2

Com ja hem explicat anteriorment, el grup de pacients procedents del Centre de Recherche en Nutrition Humaine de Lyon (Lyon, França) es divideix en dos grups ben diferenciats per edats (taula 1 i 2). El primer grup està format per 7 individus control prims (edat 51 ± 2 anys), 6 individus obesos (edat: 44 ± 5 anys) i 18 individus diabètics de tipus 2 obesos (edat: 52 ± 2 anys). El segon grup, és un grup format per 11 individus control prims d'edat mitjana 24 ± 1 anys i 9 individus diabètics de tipus 1 de 33 ± 3 anys. En tots ells es va estudiar la regulació en l'expressió de Mitofusina-2 després de l'exposició a 3 hores de hiperinsulinèmia (taxa d'infusió d'insulina: 12 pmol/kg/min) durant un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic. Això ens permetia estudiar la regulació de Mitofusina-2 en resposta a insulina. Els resultats es mostren en la figura 18.

En el primer grup de pacients (panell A), de mitjanes d'edat compreses entre 44 i 52 anys, els resultats són els següents: en els individus controls s'observa una davallada en l'expressió de Mitofusina-2 del $36\pm 20\%$ ($P < 0,05$) en resposta a insulina. En canvi, en els individus obesos i diabètics de tipus 2 obesos, tots ells resistents a insulina, no s'observa cap canvi en l'expressió de Mitofusina-2 després de 3 hores de hiperinsulinèmia aguda. En el segon grup d'individus (panell B), de mitjanes d'edat compreses entre 22 i 33 anys, s'observa un increment en l'expressió de Mitofusina-2 en resposta a insulina: un lleuger increment del $22\pm 18\%$ en el grup control ($P < 0,05$), i un increment del $36\pm 19\%$ en el grup de diabètics de tipus 1 ($P < 0,01$).

Els resultats contradictoris entre els dos grups d'individus control, d'edats diferents, indiquen que l'edat és un component important en la regulació de Mitofusina-2 per acció de la insulina. A part d'això, vam considerar conjuntament totes les dades, per estudiar si hi havia correlacions entre els nivells d'expressió de Mitofusina-2 i altres paràmetres fisiològics. En la

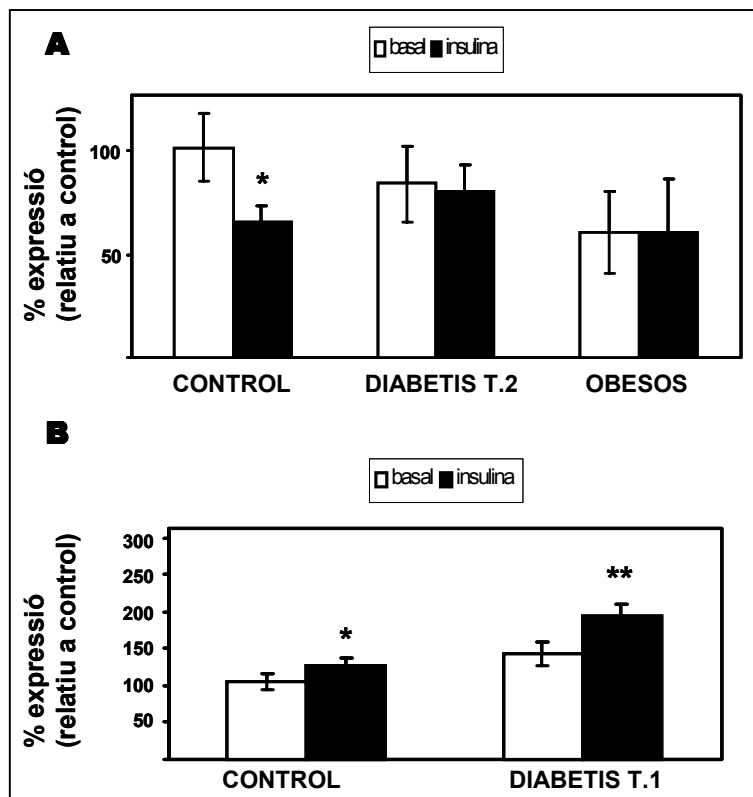


Figura 18. Expressió del mRNA de Mitofusina-2 en pacients obesos, pacients diabètics de tipus 2 obesos i diabètics de tipus 1 abans i després d'un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls, de pacients diabètics tipus 2 obesos, de pacients obesos no diabètics i de pacients diabètics de tipus 1 abans (basal; columnes buides) i després (insulina; columnes plenes) d'un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic en que es va infondre insulina a una taxa de 12 pmol/kg.min. L'mRNA de Mitofusina-2 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). En el panell A es mostren les dades dels pacients d'edat mitja entre 44 i 52 anys (taula 2), i en el panell B les dades dels pacients d'edat mitja entre 24 i 33 anys (taula 3). Les dades són les mitges±ES, de set, divuit, i sis observacions independents, respectivament en el panell A, i d'11 i 9 observacions independents en el panell B, i estan expressades com a percentatge d'expressió respecte el control. * indica una diferència estadísticament significativa entre les mesures abans i després del "clamp", a $P < 0,05$, i ** a $P < 0,01$

figura 19, panell A, considerant totes les dades dels individus de Lyon, (taules 1 i 2), es pot observar com la variació dels nivells de Mitofusina-2 abans i després de 3 hores d'infusió d'insulina, presenta una bona correlació negativa amb el nivell d'àcids grassos lliures en sèrum ($r=0,459$; $P < 0,05$) i amb els nivells de glicerol en sèrum ($r=0,407$; $P < 0,05$). Sens dubte, l'edat juga un paper important en la regulació de Mitofusina-2 en resposta a insulina, però aquesta podria estar

relacionada també amb altres paràmetres fisiològics. De fet, quan considerem grups d'edats similar, obviant així l'efecte d'aquesta, continuem observant aquestes correlacions amb àcids grassos i glicerol. En la figura 19, panell B, prenent les dades del grup de pacients procedents de

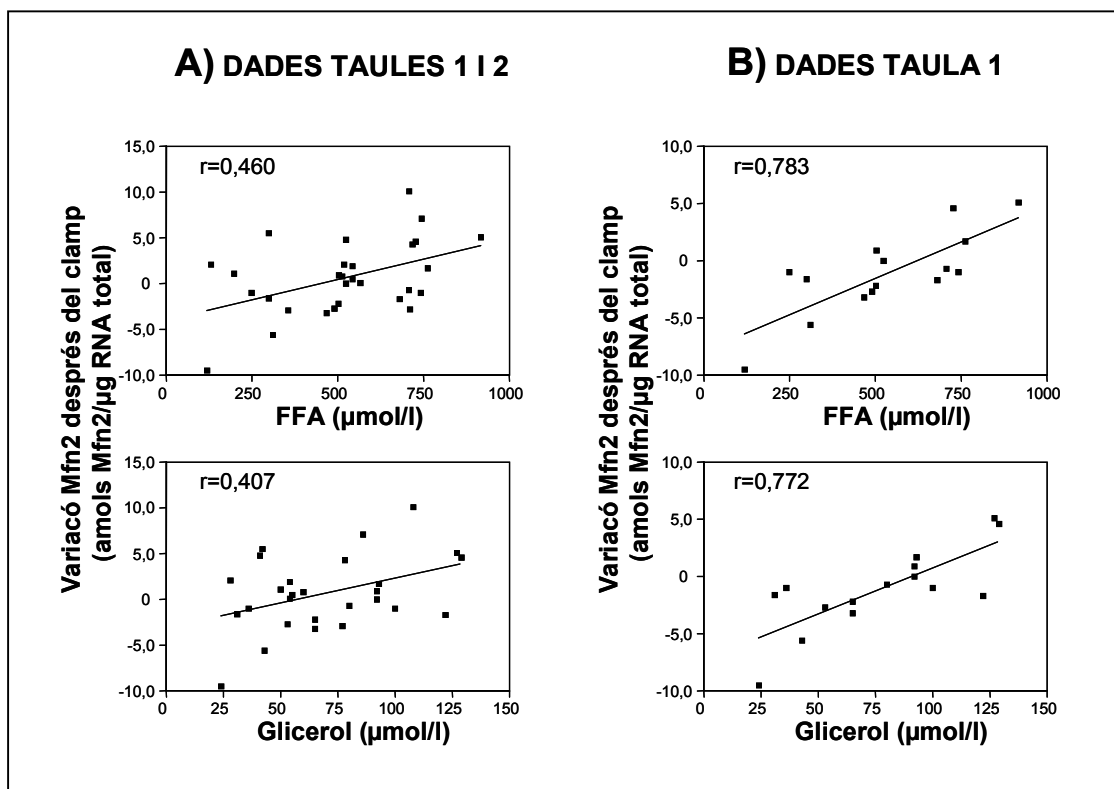


Figura 19. Correlació de la variació de l'expressió de Mitofusina-2 en resposta a insulina amb àcids grassos lliures (FFA) i glicerol. Es va extreure una biòpsia de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls, diabètics de tipus 1, obesos i de pacients diabètics tipus 2 obesos (veure taules 1 i 2) abans i després d'un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic, dut a terme durant tres hores, amb una infusió constant d'insulina de 12 pmols/kg/min (veure "Materials i mètodes"). A partir del múscul extret es va purificar RNA total i l'mRNA de Mitofusina-2 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"), i expressat com amols d'mRNA de Mitofusina-2 per µg d'RNA total. Es mostra la correlació entre la variació d'mRNA de Mitofusina-2 en múscul esquelètic abans i després del "clamp" i els nivells d'àcids grassos lliures i de glicerol en sèrum. Es mostren en el panell A les correlacions amb totes les dades dels pacients procedents de Lyon (controls, diabètics de tipus 1, diabètics de tipus 2 i obesos) que s'ajusten a una funció lineal de manera estadísticament significativa ($P < 0,05$) essent el coeficient de correlació $r=0,460$ pels nivells d'àcids grassos lliures en sèrum (FFA) i $r=0,407$ pels nivells de glicerol en sèrum. En el panell B es mostren les dades dels pacients procedents de Lyon d'edats mitges compreses entre els 44 i 52 anys (controls, diabètics de tipus 2 i obesos), que s'ajusten a una funció lineal de manera estadísticament significativa ($P < 0,001$) essent el coeficient de correlació $r=0,783$ pels nivells d'àcids grassos lliures en sèrum (FFA) i $r=0,772$ pels nivells de glicerol en sèrum.

V. Resultats

Lyon, d'edats mitges compreses entre 44 i 52 anys (taula 1), les variacions de l'expressió de Mitofusina-2 abans i després de 3 hores de hiperinsulinèmia, correlacionen significativament ($P < 0,001$) sobretot amb els nivells de glicerol ($r = 0,772$) i d'àcids grassos lliures en sèrum ($r = 0,783$), a part d'altres paràmetres com el grau de sensibilitat a insulina ($r = 0,684$), o la taxa basal d'oxidació de lípids ($r = 0,622$) (no mostrats). De nou, sembla que la taxa de lipòlisi i d'oxidació de lípids és important per regular els nivells de Mitofusina-2, també en resposta a insulina.

V.2.8 Identificació del cDNA de Mitofusina-2 de ratolí

Utilitzant la informació disponible en la base de dades d'EST de ratolí, consistent en petits fragments de seqüències d'entre 300 i 600 parells de bases i mercès al coneixement que ja teníem sobre els cDNA's sencers de Mitofusina-2 humà i de rata, vam ser capaços de deduir la seqüència codificant completa del cDNA de Mitofusina-2 de ratolí (figura 20). Per fer-ho, vam utilitzar els programes d'ensamblatge d'EST (veure "Materials i mètodes"), per construir una seqüència consens de ratolí a partir dels EST existents en la base de dades. Possibles incoherències derivades d'EST erronis amb deleccions, insercions o errors de seqüència, van ser subsanades comparant la seqüència consens de ratolí que s'en derivava, amb els cDNA's sencers de rata

```
aggccggaaggtgaagacaggacaggtggagtcaacaccatcaagagccaacctcaacc 60
tgaacacagcacagaagagaactcgaatccttttctctttcggactccagccatgtccacg 120
atgcccaacctgtgaagatccctcaccagccaaaaacgaatgtccctgctcttctctcga 180
                                     M S L L F S R
tgcaactccatcgtcacagtcaagaaggataagagacacatggctgaagtgaatgcatcc 240
C N S I V T V K K D K R H M A E V N A S
ccactcaagcactttgtcactgccaagaaaaagatcaatggaatctttgagcagctgggg 300
P L K H F V T A K K K I N G I F E Q L G
gcctacatccaagagagcgcagcttccttgaagacacccacaggaacacagaactggac 360
A Y I Q E S A S F L E D T H R N T E L D
cccgttaccacagaagaacaggtcctggacgtcaaaggatacctatccaaagtcagagggc 420
P V T T E E Q V L D V K G Y L S K V R G
atcagtgaagtgtgcccaggaggcacatgaaagtggcttttttggccggacgagcaat 480
I S E V L A R R H M K V A F F G R T S N
```

```

gggaagagcacctgataaatgccatgctctgggacaaagtctgccatcggggattggc 540
G K S T V I N A M L W D K V L P S G I G
cacaccaccaattgcttcctgcggttgggggcacagatggccatgaggccttcctcctc 600
H T T N C F L R V G G T D G H E A F L L
acagagggtcagaagagaagaagagtgtcaagactgtgaaccaactggcccatgcctc 660
T E G S E E K K S V K T V N Q L A H A L
catcaggacgagcagttgcatgcaggcagcatggtgagtgatgtggcccaactccaag 720
H Q D E Q L H A G S M V S V M W P N S K
tgtccactcctgaaggatgacctcgtgctgatggacagccctgggatcgatgtcaccaca 780
C P L L K D D L V L M D S P G I D V T T
gagctggacagctggattgataagttttgctggatgctgatgtgtttgtgctggtggcc 820
E L D S W I D K F C L D A D V F V L V A
aactcagagtccacctgatgcagacggagaagcagttcttccacaaagtgagtgaacgt 900
N S E S T L M Q T E K Q F F H K V S E R
ctctccggcccaacatcttcatcctgaataaccgctgggatgcgtctgcctcagagcct 960
L S R P N I F I L N N R W D A S A S E P
gagtacatggaggaggtgcgggcagcatggagcgtgcaccagctttctggtggat 1020
E Y M E E V R R Q H M E R C T S F L V D
gagctgggctggtggatcgagcccaggctggggaccggatcttcttctgctgctgccaag 1080
E L G V V D R A Q A G D R I F F V S A K
gaggttctcagcgcagggtccagaaagcccaggcatgccagaaggaggcggcgtctc 1140
E V L S A R V Q K A Q G M P E G G A L
gcagaaggttttaagtaaggatgtttgagtttcagaatttcgagaggcagtttgaggag 1200
A E G F K V R M F E F Q N F E R Q F E E
tgcatttccagctgcagtaaaagaccaaatttgagcagcacacagtcgggccaagcag 1260
C I S Q S A V K T K F E Q H T V R A K Q
attgcagaggccgttcgtctcatcatggattccctgcacatcgagctcaggagcagcgg 1320
I A E A V R L I M D S L H I A A Q E Q R
gtttactgcctagaatgcgggaagagcgggcaagaccggctgaggtttatagacaagcaa 1380
Y C L E M R E E R Q D R L R F I D K Q
ctggagctcctggctcaagactacaagctgcaattaagcagattacggaggaagtggaa 1440
L E L L A Q D Y K L R I K Q I T E E V E
aggcaggtgtccacagccatggctgaagagatcaggcgcctctctgtgctagttagcag 1500
R Q V S T A M A E E I R R L S V L V D E
taccagatggacttccacccatccccagttgtcctcaaggtttataagaacgagctgcac 1560
Y Q M D F H P S P V V L K V Y K N E L H
cgccatatagaggaaggtctgggcccgaacctgtctgaccgctgctccactgccattgcc 1620
R H I E E G L G R N L S D R C S T A I A
agttcactgcagactatgcagcaggacatgatagacggcttgaaaccttcttctctgta 1680
S S L Q T M Q Q D M I D G L K P L L P V
tctatgggaatcagatagacatgctgggtcccacgacagtgtttctccctcagctatgac 1740
S M R N Q I D M L V P R Q C F S L S Y D
ctgaattgtgacaagctgtgtgctgactttcaggaggacatcgagttccacttctccctt 1800
L N C D K L C A D F Q E D I E F H F S L
ggatggaccatgctagtgaacaggttccctgggcccccaagaacagccgcccggccttgta 1860
G W T M L V N R F L G P K N S R R A L L
ggctacaatgaccaagtccagcgtcccctccctctgacaccagccaaccccagcatgccc 1920
G Y N D Q V Q R P L P L T P A N P S M P
cccctgccacaaggtccctcaccaggaagagctcatgggctccatggttaccggcctg 1980
P L P Q G S L T Q E E L M G S M V T G L
gcctccctgacttccaggacctccatgggcattcttgtggttggaggagtggtgtggaag 2040
A S L T S R T S M G I L V V G G V V W K
gccgtgggatggcgaataataacctctcttttgggctctatggcctcctctacgtctat 2100
A V G W R I I P L S F G L Y G L L Y V Y
gagcgactgacctggacaaccaagaccaaagagaaggccttcaagcgcagtttggtgaa 2160
E R L T W T T K T K E K A F K R Q F V E
tacgcagcagagaagctgcagcttatcatcagctacaccggctccaactgcagccaccg 2220
Y A S E K L Q L I I S Y T G S N C S H Q
gtccaacaagaactgtcgggaacatttgggtcatctgtgccagcaagttgacatcaccgg 2280
V Q Q E L S G T F G H L C Q Q V D I T R

```

V. Resultats

```
gataacctggagcaggaattgccgccatgaacaagaaagtggaggctcttgactcactt 2340
D N L E Q E I A A M N K K V E A L D S L
cagagcaaagcaaagctgctcaggaataaagccggttggttgacagtgagctcaacatg 2400
Q S K A K L L R N K A G W L D S E L N M
ttcacacaccagtacctgcagcccagcagatagtgggcacctgaggcggagtctgcgtgg 2460
F T H Q Y L Q P S R
agaggggaggctgctgccagccctaagtgccgtgtgggctccccaggggcacgtgtggct 2520
cctgccccctggccactgccaagagaatgaagcaccagctctcgtaccatcttggagcct 2580
ccagcactacttattttccccacctttgcctgctggttgctggaagagctggctcatacc 2640
cccaaaggacactttcagcgacagctatggacagcatggtaccaaggagttaagttgagg 2700
ctttttccagctttctctggttcatttgattgcttgataaggcctcaggatctcagcatt 2760
gcacaatgcctcatggaagcctttgagggatcacacagacacccccaccttccctccagc 2820
ctgtgcgcacctgcctccttgagcccagcacacctgcaggtgtaagggacgatggag 2880
ttcttcccagagagtctgtcccagaaggactgtggcttggtgtgtgtccatctcgctgt 2940
tggctcagtgcttcatcccatttgagagcctcagacacgtcttggtggtagaggctcagt 3000
taccctgggcttaggctgagggcggccctgtgctgggggtggtagaaaggatgctgctg 3060
aggcagctggaggagtgggagtagctcagaggggagggtgttggtatgtagggagctg 3120
gcagagcaggtggcagtcactgggacaaggaggactgcctctcttctcattattgtgt 3180
cctttgcttagtgctcagtcctggacttggtgcaggcctgttttgtgtagatctgttt 3237
```

Figura 20. Seqüència de cDNA i proteïna de Mitofusina-2 de ratolí (AY028170). Es va analitzar la base de dades d'EST's del NCBI mitjançant el programa BLAST (veure "Materials i mètodes") a partir del cDNA humà. Es van cercar aquells EST's de ratolí que tinguessin una alta homologia de seqüència amb Mitofusina-2 humà i es van ensamblar amb els programes disponibles en els servidors de TIGEM i THC per obtenir una única seqüència consens. Dubtes o contradiccions de seqüència en posicions concretes es van depurar en base a l'homologia present amb el cDNA de rata i d'humà. A partir de la seqüència consens es van trobar dos EST's que eren els extrems d'un únic clon, que semblava incloure tot el cDNA de ratolí. Es va demanar i es va seqüenciar. Aquesta seqüència va coincidir plenament amb la seqüència consens obtinguda *in silico*.

(U41308) i humà (D86987). Aquesta seqüència consens ens va permetre identificar un clon en la base de dades d'EST que no estava seqüenciat totalment, però que per la seva mida incloïa molt probablement el total de la seqüència codificant de ratolí. El vam demanar i el vam seqüenciar, tot comprovant que la seva seqüència era idèntica a la seqüència consens deduïda virtualment. Aquesta seqüència del cDNA sencer de Mitofusina-2 de ratolí la vam dipositar en el Genebank, sota el nombre d'accés AY028170.

V.2.9 Identificació del cDNA de Mitofusina-2 de *Drosophila melanogaster*

En les bases de dades públiques de seqüències de *D. melanogaster* no vam trobar cap seqüència que fos homòloga a Mitofusina-2 humana. En canvi, en les bases de dades de Celera Genomics, vam trobar un hipotètic gen homòleg a Mitofusina-2 humà, però mal anotat pel

```

catgagttgggtcaccttaacgttacatcatgtgcatttaaaaaaattaataatattaac 60
taaatttcgtgaaattgcttctctgcaactggattctagtcggcaatgtacggttattgg 120
aagttcgaaccacgctttccacaatttgccatttgaaaacgcatcagctgagggcgagca 240
atataaagaatcgacaaccggagaggaaaataatacaaatataaaataaaacaaatac 300
aaatatgagcgagagtggtcattaatcagttttatgacggttgatttttgagcaaaatcccc 360
caaaagcaatataacacacaataaacagagatagttaagttttgagtttcgggttggcgg 420
cgaagttgcagaagttggaagtctgaacaaccaatcccctgggctgcataccttttggt 480
ttgtatcgcaattctcttctctacaaaaaacatctgctaaaccgaatcaaccataaa 540
ccggatcccgaatggcggcctacttgaaccgcaccatctcgatgggtgaccgggcaaacg
M A A Y L N R T I S M V T G Q T
ggccccgcccagcagcagcgcctcctccacggacacgggtggacaaatccggacc 660
G P A D D D R H A S S T D T V D K S G P
ggttccccgctatcccggttcaactcatcgctgcaacaatccggctccacaatggccggc 720
G S P L S R F N S S L Q Q S G S T M A A
aatctgctaccggaatcgcggtctatcaatccaacgacaaatcacggctccagatcttt 780
N L L P E S R L Y Q S N D K S P L Q I F
gtgcgcgcaaaaagaagatcaacgatctacggcgagatcgaggagtatgtccatgag 840
V R A K K K I N D I Y G E I E E Y V H E
acgaccacctttatcaacgcctgcacgcggaagcggagatcgtggacaaggcggaacgg 900
T T T F I N A L H A E A E I V D K A E R
gagctgttgcgaagctatgtgtacaaggtggcggccattcgcgaagtactgcagcgggat 960
E L F E S Y V Y K V A A I R E V L Q R D
cacatgaaggtggccttctttggacgcacctccaacggcaagagctcgggtgattaatgcc 1020
H M K V A F F G R T S N G K S S V I N A
atgttgccgagagaagatcctgcccagcggcattggggcacaccacgaattgcttctgcaa 1080
M L R E K I L P S G I G H T T N C F C Q
gtggagggcagcaatggcggcgaggcgtatcttatgacagagggtccgaggagaagcta 1140
V E G S N G G E A Y L M T E G S E E K L
aatgtggtgaacatcaacaactggcgaatgccttgccaggagaagctctgcgagagc 1200
N V N I K Q L A N A L C Q E K L C E S
agtttggtgcgcatcttttgccgagggaaacgctgcagcctgctgcgcgacgatgtcgtc 1260
S L V R I F W P R E R C S L L R D D V V
tttggtgactcacctgggtgtggatgtgtcggccaatttgagcactggatcgataacat 1320
F V D S P G V D V S A N L D D W I D N H
tgctgaacgcgatgtctttgtgctggtcctgaatgccagatcaacgatgacgcgtgcg 1380
C L N A D V F V L V L N A E S T M T R A
gagaagcagttctttcacaccgtctcgagaagctaagcaagcgaacatcttcatctg 1440
E K Q F F H T V S Q K L S K P N I F I L
aacaatcgctgggatgcgtcggccaacgagcccagtgccaggaatcggttaagtctcag 1500
N N R W D A S A N E P E C Q E S V K S Q
cacacggaacgctgcactcctcaccaaggagctaaaggtgagcaacgagaaggag 1560
H T E R C I D F L T K E L K V S N E K E
gcggccgaaagggtattcttctgcttccgcaaggaaacgctgcaggcgcgcacatcgaggag 1620
A A E R V F F V S A R E T L Q A R I E E
gccaagggcaatccgcgcacatgggtgccattgccgagggctttcagatacgtacttc 1680
A K G N P P H M G A I A E G F Q I R Y F
gagttccaggacttcgagcgcgaagttcgaggagtgcacatctcgcagagtgctgtgaaaaca 1740
E F Q D F E R K F E E C I S Q S A V K T
aagttccagcagcacagttcgcgcggcaagagtgtttcgggtgacatgaaatcaatggtg 1800
K F Q Q H S S R G K S V S G D M K S M L
gacaacatttacgagcggatcacatattccgcaatctgaagcaggaccagaagaacctg 1860
D N I Y E R I T I F R N L K Q D Q K N L
ctcaccgaacgcatccagggcacagagacgcagatgatgcaggttacgcgggaaatgaag 1920
L T E R I Q G T E T Q M M Q V T R E M K
atgaagatccacaacatgggtcgaggaggtggaggagaaggtgtcaaagggcgtgaacgag 1980
M K I H N M V E E V E E K V S K A L N E
gagatctggcgcctggcgtactcattgacgagttcaatatgcccttccatccggagcgt 2040
E I W R L G V L I D E F N M P F H P E R
ttggtgctgaacatctacaaaaggattgaatgccatgtggagagcggcctgggcagc 2100
L V L N I Y K K E L N A H V E S G L G S

```

```

aatctgcgcgcccgctatccatggccctggccatgaacgtcgagtcgcccagacggag 2160
N L R A R L S M A L A M N V E S A Q T E
atgaccgatcgatgcacgccctggtgcccaacgagcagctcctggccaccagcaccaag 2220
M T D R M H A L V P N E Q L L A T S T K
atggtggtgcgacgcagcccttcgagatgctctactcactgaattgccagaacctctgc 2280
M V V R T Q P F E M L Y S L N C Q N L C
gccgacttccaggaggatctggagtttaagttcagctggggcattgcgggcatgatccag 2340
A D F Q E D L E F K F S W G I A A M I Q
cgcttcaccggcaaggtgcgcgagcgcagcaagaaggccagccggcgctggtcaatcga 2400
R F T G K V R E R S K K G Q P A L V N R
cagagcagttattggacacagcgtatcgacgcccaccacgacgcccgtggaagccactcct 2460
Q S S I G H S V S T P T T T P V E A T P
gtgtgctgctgcccgtcccgttgtggctggcattacgcccagcagctgtcgtgatc 2520
V C L L P A P V V A G I T P E Q L S L I
tcacgcttcgcggtgtcctccattggatcgcagggcaccggttgggtctcgtcgtagcc 2580
S R F A V S S I G S Q G T V G G L V V A
gggtgcatgctgaaaactatcggctggcgtgctcctggtgggctgggtgcccctctacggc 2640
G V M L K T I G W R V L V G V G A L Y G
tgcattcactgtacgagcgcctctcgtggacaaattcagccaaggagcgaacgttcaag 2700
C I Y L Y E R L S W T N S A K E R T F K
tcgcagtacgtgcccattgccaccaagaagctcaagatgattgtcgacctcacctcggcc 2760
S Q Y V R H A T K K L K M I V D L T S A
aactgcagccaccaagtgagcaggaattgtcagcacctttgcccgtttgtgcccgcacg 2820
N C S H Q V Q Q E L S S T F A R L C R T
ggtgataccgccaccacggacatgaatgatgagctcaagacgctggactcgcagctgaac 2880
V D T A T T D M N D E L K T L D S Q L N
atcctggaggcgcaaccagaagcaattgaagctgcttcgcaacaaggccaactacatacag 2940
I L E A N Q K Q L K L L R N K A N Y I Q
aacgagctggacatcttcgagcacaactatataatcgccgcagtagtggaacagtagtggg 3000
N E L D I F E H N Y I S P Q
ttggctgaccgtggggcaaaactaaccagaatgtggatgatcatagaaatcaggcgaa 3060
gacaaacacccaaacgactacaacaacattaatgcaccacgtatgtgctcaactctc 3120
agttttctctcctcttttattttatTTTTTTGtaagaaaatgcatgatatgagccaat 3180
cgattggaacctctttattctctatcgtttaaacaaaatcgttgttgttggatgagaattct 3140
tttaattcctaacatgcaactactctgctagtgattatTTAGTTTTTTTTTTGtaa 3200
ttggtgacccggaaacgcacgcgtatataatacaaatagagaagtatccaaaact 3260
gtgagcatggccagggt 3276

```

Figura 21. Seqüència de cDNA i proteïna de Mitofusina-2 de *D. melanogaster* (AF355475). Es va analitzar la base de dades de proteïnes de Celera Genomics mitjançant el programa BLAST (veure "Materials i mètodes") a partir del cDNA humà. Es va trobar una seqüència de *D. melanogaster* d'alta homologia amb la seqüència humana de Mitofusina-2. Aquesta seqüència es va comparar amb les seqüències de Mitofusina-2 humana i de ratolí, i es va concloure que incorporava un intró, per error. Per confirmar-ho es va amplificar el cDNA per PCR a partir d'RNA total de *D. melanogaster* i es va clonar i seqüenciar el fragment amplificat. La seqüència obtinguda confirmava que en la seqüència de Celera Genomics sobrava un fragment, probablement degut a una mala predicció informàtica de l'organització intró-exó del gen. La seqüència de Celera corregida va ser dipositada en el Genbank (NCBI) sota el nombre d'accés AF355475.

que fa a la seva distribució introns-exons. Fent valer el coneixement que ja teníem dels cDNA's de Mitofusina-2 humà, de rata i ratolí, i per comparació de seqüència, vam deduir la distribució introns-exons del gen de Mitofusina-2 de *D. melanogaster*. El punt de conflicte amb l'anotació que proposava Celera Genomics, el vam comprovar mitjançant l'amplificació del mRNA de Mitofusina-2 a partir de mostres de *D. melanogaster*, per RT-PCR, i posterior seqüenciació del cDNA amplificat. La seqüència del cDNA de *D. melanogaster*, convenientment anotada (figura 21), la vam dipositar en el Genbank sota el nombre d'accés AF355475.

V.2.10 Identificació del cDNA de Mitofusina-1 humà

Es va utilitzar la seqüència del cDNA de Mitofusina-2 humà (D86987) per analitzar, mitjançant el programa BLAST, la base de dades d'EST de l'NCBI (veure "Materials i mètodes"). Tots aquells EST que eren idèntics a la seqüència de Mitofusina-2 humana, es van excloure de l'anàlisi. Aquells que presentaven unes diferències de seqüència tan minses que podien ser atribuïdes a errors de seqüenciació, van ser també exclosos de l'anàlisi. Després d'aquest cribatge, vam seleccionar un conjunt d'EST que eren significativament semblants a la seqüència de Mitofusina-2 humana, els vam ensamblar utilitzant els programes disponibles a la xarxa (veure "Materials i mètodes"), per tal de construir una seqüència consens del que anomenem el cDNA de Mitofusina-1. Dos clons no seqüenciats completament semblaven cobrir el total de la seqüència del cDNA de Mitofusina-1. Els vam demanar i seqüenciar, i vam acabar de corregir la seqüència consens obtinguda virtualment. Un d'aquests dos EST contenia un intró en la seva seqüència, que va ser fàcilment detectat per comparació amb les seqüències de Mitofusina-2 humana, de ratolí, de rata i de *D. melanogaster*. Uns mesos després de l'obtenció d'aquest resultat apareixia a la literatura la clonació i caracterització de Mitofusina-1 (Santel *et al.*, 2001). La seqüència del cDNA resultant de Mitofusina-1 es presenta a la figura 22.

V. Resultats

```
cttctcgggaagatgagggcagtttggcatctgtggccgagttgctggtgccgggtgatag 60
ttggagcgggagacttagcataaatggcagaacctgtttctccactgaagcactttgtgctg 120
      M A E P V S P L K H F V L
gctaagaaggcgattactgcagctctttgaccagttactggagtttgttactgaaggatca 180
A K K A I T A V F D Q L L E F V T E G S
cattttgttgaagcaacatataagaatccggaacttgatcgaatagccactgaagatgat 240
H F V E A T Y K N P E L D R I A T E D D
ctggtagaaatgcaaggatataaagacaagctttccatcattggtgaggtgctatctcgg 300
L V E M Q G Y K D K L S I I G E V L S R
agacacatgaaggtggcattttttggcaggacaagcagtggggaagagctctgttatcaat 360
R H M K V A F F G R T S S G K S S V I N
gcaatggttgggataaagttctccctagtgggattggccatataaccaattgcttccta 420
A M L W D K V L P S G I G H I T N C F L
agtgttgaaggaactgatggagataaagcctatcttatgacagaaggatcagatgaaaaa 480
S V E G T D G D K A Y L M T E G S D E K
aagagtgtgaagacagttaatcaactggcccatgcccttcacatggacaaaagatttgaaa 540
K S V K T V N Q L A H A L H M D K D L K
gctggctgtctgtacgtgtgttttggccaaaagcaaaatgtgccctcttgagagatgac 600
A G C L V R V F W P K A K C A L L R D D
ctgggttagtagacagtcaggcacagatgtcactacagagctggatagctggattgat 660
L V L V D S P G T D V T D V T E L D S W I D
aagttttgcctagatgctgatgtctttgttttggtcgcaaactctgaatcaacactaatg 720
K F C L D A D V F V L V A N S E S T L M
aatacggaaaaaacactttttcacaaaggtgaatgagcggctttccaagcctaataatctt 780
N T E K H F F H K V N E R L S K P N I F
attctcaataatcgttgggatgcctctgcatcagagccagaatatatggaagacgtacgc 840
I L N N R W D A S A S E P E Y M E D V R
agacagcacatggaaagatgcctgcatttcttgggtggaggagctcaaagttgtaaatgct 900
R Q H M E R C L H F L V E E L K V V N A
ttagaagcacagaatcgtatcttctttgtttcagcaaaggaagttcttagtgctagaaaag 960
L E A Q N R I F F V S A K E V L S A R K
caaaaagcacaggggatgccagaagtggtgtggcacttgctgaaggatttcatgcaaga 1020
Q K A Q G M P E S G V A L A E G F H A R
ttacaggaatttcagaattttgaacaaatctttgaggagtgtatctcgcagtcagcagtg 1080
L Q E F Q N F E Q I F E E C I S Q S A V
aaaacaaagttcgaacagcacactatcagagctaaacagatactagctactgtgaaaaac 1140
K T K F E Q H T I R A K Q I L A T V K N
ataatggattcagtaaacctggcagctgaagataaaaggcattattcagtggaagagagg 1200
I M D S V N L A A E D K R H Y S V E E R
gaagaccaaattgatagactggactttattcgaaccagatgaaccttttaacactggat 1260
E D Q I D R L D F I R N Q M N L L T L D
gttaagaaaaaaatcaaggaggttaccgaggaggtgccaacaaaagtttcatgtgcaatg 1320
V K K K I K E V T E E V P N K V S C A M
acagatgaaatttgcgactgtctgttttgggtgatgaattttgttcagagtttcatcct 1380
T D E I C R L S V L V D E F C S E F H P
aatccagatgtattaaaaatataaaaagtgaattaaataagcacatagaggatggatg 1440
N P D V L K I Y K S E L N K H I E D G M
ggaagaaatttggctgatcgcagcaccgatgaagtaaacgccttagtgcttcagaccag 1500
G R N L A D R C T D E V N A L V L Q T Q
caagaaattattgaaaatttgaagccattacttccagctggtatacaggataaaactacat 1560
Q E I I E N L K P L L P A G I Q D K L H
aactgatcccttgcaagaaatttgatctcagttataatctaaattaccacaagttatgt 1620
T L I P C K K F D L S Y N L N Y H K L C
tcagattttcaagaggatattgtatttcgttttccctgggctggtcttcccttgtacat 1680
S D F O E D I V F R F S L G W S S L V H
```

```

cgatTTTTGGGCCCTAGAAATGCTCAAAGGGTGCTCCTAGGATTATCAGAGCCTATCTTT 1740
R F L G P R N A Q R V L L G L S E P I F
cagctccctagatctttagcttctactcccactgctcctaccactccagcaacgccagat 1800
Q L P R S L A S T P T A P T T P A T P D
aatgcatcacaggaagaactcatgattacattagtaacaggattggcgtccggttacatct 1860
N A S Q E E L M I T L V T G L A S V T S
agaacttctatgggcatcattattgttggaggagtgatttggaaaactataggctggaaa 1920
R T S M G I I I V G G V I W K T I G W K
ctcctatctgtttcattaactatgtatggagctttgtatctttatgaaagactgagctgg 1980
L L S V S L T M Y G A L Y L Y E R L S W
accacccatgccaaggagcagcctttaaacagcagtttggtaactatgcaactgaaaaa 2040
T T H A K E R A F K Q Q F V N Y A T E K
ctgaggatgattgttagctccacgagtgcaactgcagtcaccaagtaaaaacaacaata 2100
L R M I V S S T S A N C S H Q V K Q Q I
gctaccacttttgctcgcctgtgccaacaagttgatattactcaaaaacagctggaagaa 2160
A T T F A R L C Q Q V D I T Q K Q L E E
gaaattgctagattacccaaagaaatagatcagttggagaaaatacaaaaacaattcaaag 2220
E I A R L P K E I D Q L E K I Q N N S K
ctcttaagaaataaagctgttcaacttgaatgagctggagaattttactaagcagttt 2280
L L R N K A V Q L E N E L E N F T K Q F
ctaccttaagcaatgaagaatcctaacaatagagattgctttgggtgaccatgataggag 2340
L P S S N E E S
gaaacgaaacttgaagattggaacagttgtatTTTTATGAAACTTTAAATATGAA 2400
ttgtactaactgtacctaataagcaaagcctgtgtagattctggtaatgatctgtctca 2460
gggtatgtgattTTTTGAAGAGTGTTATGTCCTTAGTTTTAATTTTGAGTAAAGAAAAG 2520
ctaaaatcatgaattagttacaagcaacagtaaccaacttatgtgacccctgaggggtggg 2580
gctgtgagctcttaattttgtttttgattctgaaaaactctgcttcctggcatccaggagt 2640
tagagattgagcctttcatcttctctctcaaaactagtttttgatgctttctttcatggg 2700
aatagtcacttttttatttagtaaatcgattgctggaaccaccaaggagtgtggaatgt 2760
ccttgagtgattattttatgcaagtcacagtcacggttgccatcatggcagctatgtgaaa 2820
cactaataaatgtgTTTTACTTTTTATCCCGTAAAAGTGTGTAACAGGATAAAG 2940
gcttgttatagtcacttataagttatctgggtctaagtaatttctcttagatgtttctaaag 3000
aaacattttcagctttgctcccattatgattccaataaggaaacgctttctctagtgaatt 3060
ttaggagtaaagtttgaagagataaaaaatagccaaagataggagacgtctgaattttgaa 3120
tgataaacagtgatgttttaaaaaagctgttcttcaggaggcatttgcttaggatat 3180
tgctggattataccccattggaggcttttaattttatttggatgaattttccaggatttc 3240
attaaaaattattattgtattttttaccttaatgaaagattttgggttcaaatatctttc 3300
tatattaaaagctgattgagctgtacatatgt 3333

```

Figura 22. Seqüència de cDNA i proteïna de Mitofusina-1 humà. Es va analitzar la base de dades d'EST's del NCBI mitjançant el programa BLAST (veure "Materials i mètodes") a partir del cDNA humà de Mitofusina-2. Es van cercar aquells EST's d'humà que tinguessin una alta homologia de seqüència amb Mitofusina-2 i es van descartar tots aquells que eren idèntics a Mitofusina-2, la resta es van ensamblar amb els programes disponibles en els servidors de TIGEM i THC per obtenir una única seqüència consens. Dubtes o contradiccions de seqüència relacionades amb la presència d'introns en algunes seqüències es van depurar en base al que sabíem de l'organització genòmica del gen Mitofusina-2 en humà, en base a la seqüència de DNA genòmic dipositada en les bases de dades públiques i en base a les seqüències acceptores i donadores d'"splicing" que hi apareixien. En base a la seqüència obtinguda vam dissenyar "primers" i vam amplificar Mitofusina-1 per PCR a partir de cDNA humà de múscul esquelètic. El producte de PCR va ser clonat i seqüenciat. La seqüència coincidia amb la que vam trobar *in silico*.

V.2.11 Anàlisi de la seqüència proteica de Mitofusina-2

Partint de la seqüència proteica codificada pel clon D86987 (veure figura 7), vam fer un estudi de BLAST per tal de trobar aquelles proteïnes conegudes amb major homologia de seqüència amb Mitofusina-2 humana. Un alineament múltiple de Mitofusina-2 humana amb altres productes gènics relacionats (figura 23, panell A), mostra que és un 62% idèntica a la proteïna Mitofusina-1 humana (AF329637), un 95% idèntica a la proteïna Mitofusina-2 de rata (U41308), un 95% idèntica a la proteïna Mitofusina-2 de ratolí (AY028170), i un 45% idèntica a Mitofusina-2 de *D. melanogaster* (AF355475) i un 32% idèntica a la proteïna de *C. elegans* (U29244). Es va trobar una menor identitat de seqüència amb el producte del gen FZO de *D. melanogaster* (U95821; 28% d'identitat), i amb el producte del gen FZO de *S. cerevisiae* (Z36048; 11% d'identitat). FZO és un factor de fusió mitocondrial de *D. melanogaster*, que és també essencial per la biogènesi de mitocòndries funcionals en *S. cerevisiae* (Hales *et al.*, 1997; Rapaport *et al.*, 1998). L'arbre filogenètic (figura 23, panell B) basat en la similitud d'aquestes seqüències entre elles indica que el gen FZO de *S. cerevisiae* és el gen precursor de la família Mitofusina-2/FZO, i que probablement una duplicació gènica va ocórrer en *D. melanogaster*, així que la funció del gen Mitofusina-2 podria ser diferent de la de FZO.

Com es veu en la figura 23 (panell A), la proteïna Mitofusina-2 presenta 5 motius de seqüència (G1-G5) entre les posicions 103 i 307 de la seqüència humana, que conformen un domini d'unió a GTP típic de moltes proteïnes amb activitat GTPasa (Sprang *et al.*, 1997). Aquest domini és un 17% idèntic a la GTPasa ERA de *E. coli* (Chen *et al.*, 1999 a,b). En afegit, Mitofusina-2 humana, conté un motiu ric en prolines (no present en els productes del gen FZO) susceptible d'unir altres proteïnes, un llarg segment hidrofòbic (28 residus aminoacídics) assenyalat com a domini transmembrana per diversos programes bioinformàtics (veure "Materials i mètodes"), i dos regions "coiled-coil" flanquejant el putatiu domini transmembrana.

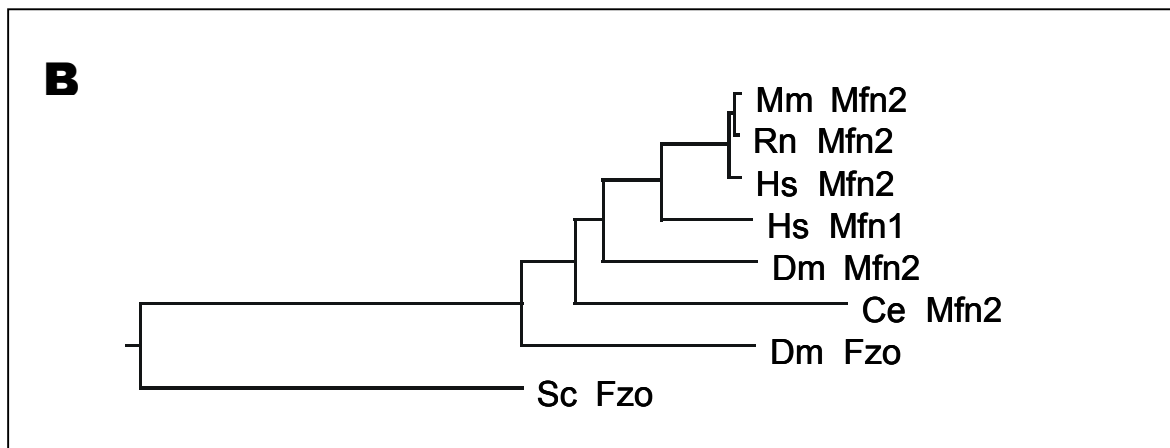


Figura 23. Comparació de les seqüències de proteïna Mitofusina-2 humana, de ratolí, de rata, de *D.melanogaster* amb Mitofusina-1 humana i les proteïnes FZO de *D.melanogaster* i de *S.cerevisiae*. Es van comparar per homologia de seqüència mitjançant el programa Clustal (panell A; "veure Materials i mètodes"), les seqüències de Mitofusina-2, Mitofusina-1 i FZO conegudes. Mitofusina-2 humana (H.s. Mfn2; D86987), Mitofusina-1 humana (H.s. Mfn1; AF329637), Mitofusina-2 de rata (R.n. Mfn2; U41803), de ratolí (M.m. Mfn2; AY128470) de *D.melanogaster*. (D.m. Mfn2; AF355475), de *C.elegans*(C.e.Mfn2; U29244) i FZO de *D.melanogaster* (D.m. Fzo; U95821), i de *S.cerevisiae* (S.c. Fzo; Z36048). Totes elles comparteixen els motius G1-G5 a l'extrem N-terminal, que conformen un domini GTPasa que s'estén al llarg dels 300 primers aminoàcids de la proteïna, i un domini transmembrana hidrofòbic a l'extrem C-terminal i dos regions amb estructura "coiled-coil" a cada banda del segment transmembrana. En afegit, les proteïnes Mitofusina-2 en mamífer presenten una regió rica en prolines a N-terminal del segment transmembrana. En el panell B, es mostra l'arbre filogenètic calculat pel programa DNASTar en base a la comparació de les diferents seqüències, i al nombre de residus conservats entre elles.

V.2.12 Generació d'un anticòs contra Mitofusina-2

Basant-nos en la seqüència de Mitofusina-2 codificada pel clon de cDNA D86987 vam escollir, assessorats pel Dr. Jorge Lloberas (Dpt. d'Immunologia, U.B.), una seqüència de 20 aminoàcids de Mitofusina-2 que per les seves característiques fos probablement hidrofílica, situada en contacte amb el solvent, i immunogènica. La seqüència escollida va ser LGPKNSRRALMGYNDQVQRP que difereix només en un aminoàcid (M→L) de les seqüències de rata i ratolí, i se li va encarregar a l'empresa Research Genetics (U.S.A.), la síntesi d'aquest pèptid,

la seva injecció a dos conills, el sagnat d'aquests a diferents setmanes i l'entrega dels sèrums. La investigadora del nostre laboratori, Sara Pich, va posar a punt les condicions de Western Blot i d'immunolocalització amb el millor dels sagnats.

V.2.13 Localització de Mitofusina-2 en cèl·lules en cultiu

Un cop constatat que nivells anormalment reduïts del mRNA de Mitofusina-2 s'associen a determinades situacions fisiològiques, vam passar a estudiar quina podria ser la funció de la proteïna Mitofusina-2. El primer que vam fer va ser determinar en quin compartiment subcel·lular es trobava la proteïna Mitofusina-2 quan era sobreexpressada en cèl·lules 10T1/2 a partir d'un DNA exogen. Per fer-ho vam fabricar un constructe en el qual, sota control d'un promotor fort (de citomegalovirus), s'expressava Mitofusina-2 amb la particularitat de portar en el seu extrem N-terminal una seqüència de 12 aminoàcids que conformen l'epítip **myc**, detectable amb un anticòs comercial del qual en disposem al laboratori. Vam transfectar cèl·lules 10T1/2 amb aquest constructe, seguint el sistema de transfecció per FuGene (veure "Materials i mètodes"), vam detectar l'epítip **myc** per immunolocalització, vam marcar les mitocòndries amb la sonda mitocondrial depenent de potencial de membrana Mitotracker, i vam observar les cèl·lules al microscopi confocal de fluorescència (veure "Materials i mètodes" per tots aquests protocols). El resultat d'un experiment representatiu, després de 12 hores de transfecció, es mostra en la figura 24.

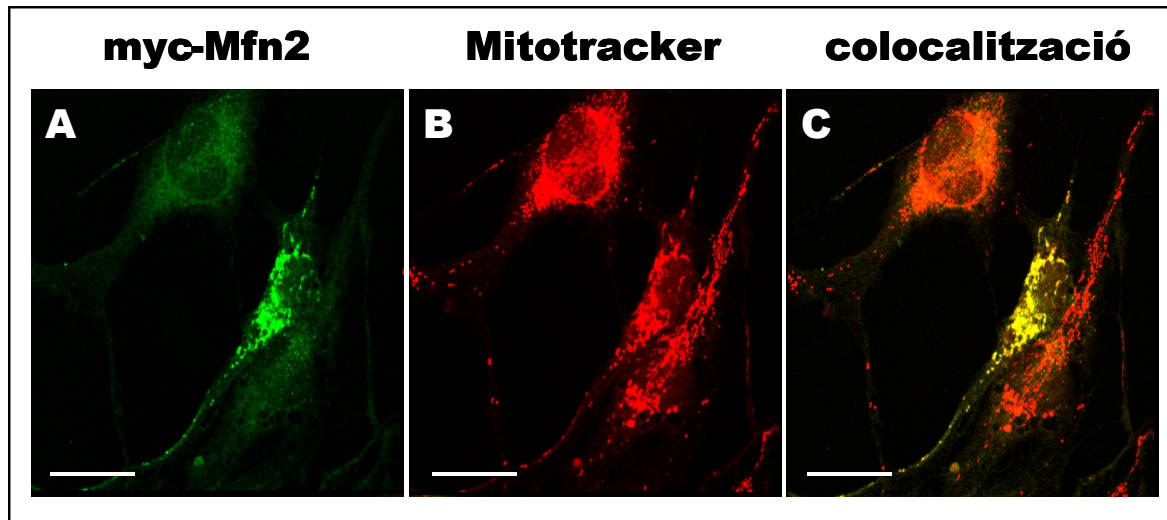


Figura 24. Colocalització del constructe myc-Mitofusina-2 amb marcatge mitocondrial. El constructe myc-Mitofusina-2 va ser transfectat transitòriament en cèl·lules 10T1/2 amb FuGene (veure "Materials i mètodes") . Després de 12 hores de transfecció les mitocondries es van incubar 30' amb la sonda de marcatge mitocondrial Mitotracker, es van fixar, i es van processar per immunocitoquímica amb un anticòs anti-myc. Un segon anticòs marcat amb fluoresceïna va ser utilitzat per detectar l'anticòs primari. Al microscopi de fluorescència confocal es van prendre imatges de fluorescència verda (fluoresceïna associada a myc-Mitofusina-2) i fluorescència vermella (Mitotracker associat a mitocondries) La barreja d'imatges es va fer amb el programa Adobe Photoshop v.5.0 En groc apareix la colocalització de la fluorescència verda i la fluorescència vermella. La barra d'escala correspon a 10µm.

Les cèl·lules que han incorporat el plàsmid i que expressen el constructe myc-Mfn2 presenten una senyal verda, producte de la immunodetecció de l'epítot **myc** i de la fluorescència que dóna l'anticòs secundari (panell A). En paral·lel, i per un altre canal del microscopi de fluorescència confocal detectem la senyal vermella corresponent a les mitocondries marcades amb Mitotracker (panell B). En el panell C es mostra la barreja de les imatges dels panells A i B. Apareix en groc la colocalització de la senyal verda del constructe myc-Mitofusina-2 i la senyal vermella de les mitocondries. S'aprecia una colocalització total de les dues senyals, la qual cosa indica que el constructe myc-Mitofusina-2, un cop sobreexpressat en les cèl·lules 10T1/2 es localitza a les mitocondries. Tot i no formar part d'aquesta tesi, s'escau fer esment en aquest punt, que en el nostre laboratori s'ha determinat per Western Blot la localització de la proteïna Mitofusina-2 endògena en fraccions mitocondrials de cèl·lules HeLa, la qual cosa confirma les dades anteriors, i indica que Mitofusina-2 es localitza en la mitocondria.

V.2.14 Morfologia de les mitocondries en múscul de rates obeses

Donat que FZO de *D. melanogaster* participa en el control de la morfologia de les mitocondries, i que l'expressió de Mitofusina-2 estava reduïda en l'obesitat en múscul esquelètic, vam estudiar la morfologia de les mitocondries en aquest teixit, extret de rates control i obeses Zucker. Per fer-ho vam utilitzar múscul sòleus de cada cama de quatre rates per grup, i el vam fixar immediatament en paraformaldehid. Els teixits es van enviar als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, on van ser tallats en angles diferents a l'atzar, seguint la tècnica d'estereologia que es detalla a "Materials i mètodes". Es van prendre al microscopi electrònic 80 fotografies per grup, i es va mesurar la relació superfície/volum de les mitocondries (veure "Materials i mètodes"). El resultat es presenta en la figura 25.

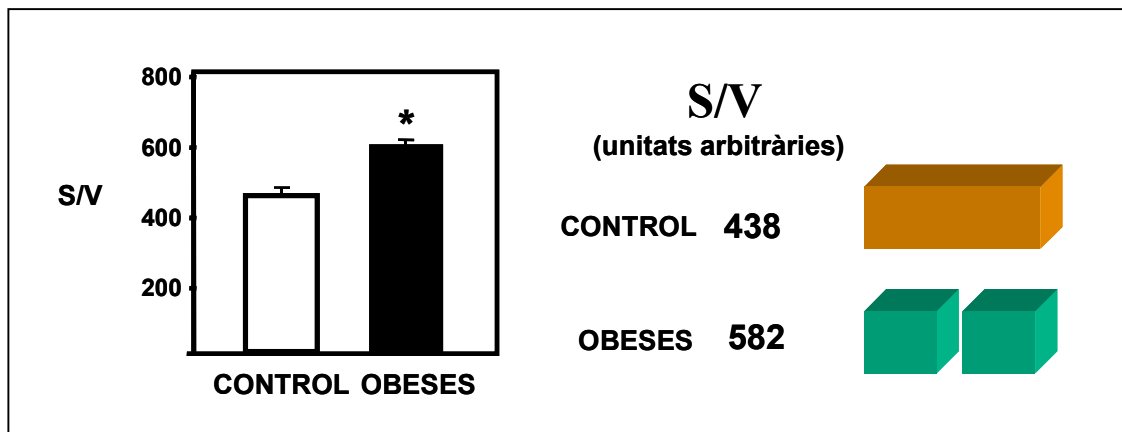


Figura 25. Morfologia de les mitocondries en múscul de rates obeses. Es van extreure els músculs soleus de les potes posteriors de quatre rates control i quatre rates obeses Zucker. Es van tallar en orientacions a l'atzar segons la metodologia de l'anàlisi estereològic per determinar morfologia d'òrgans (veure "Materials i mètodes") i es van realitzar 80 fotos de les mitocondries al microscopi electrònic. Mitjançant les graelles adequades es va fer una estimació del volum i de la superfície mitocondrial en cada condició. Les dades es mostren en la figura, expressades com la relació superfície/volum en múscul de rates control o rates obeses. Aquesta magnitud és independent del nombre de mitocondries estudiades. Es mostra un dibuix representatiu del que pot voler dir una major relació superfície/volum en el cas de les mitocondries.

El resultat de l'anàlisi estereològic sobre mitocòndries de múscul esquelètic de rates control i obeses, mostra que en aquestes darreres la relació superfície/volum és un $32\pm 4\%$ major que en el grup control. El volum mitocondrial total en les fotografies estudiades no era diferent entre els dos grups, en canvi la superfície mitocondrial total era el paràmetre que incrementava en el múscul obès i que provocava un increment de la relació superfície/volum. Es va escollir aquesta magnitud per ser independent del nombre de mitocòndries estudiades. Una més gran relació superfície/volum és l'esperable si les mitocòndries estan menys fusionades, com es mostra en el diagrama de la figura 25.

V.2.15 Efectes de la sobreexpressió de Mitofusina-2 sobre la xarxa mitocondrial.

Dels experiments detallats fins ara es conclou que Mitofusina-2 està a mitocòndries. També sabem, com queda palès en l'anàlisi de la seqüència proteica de Mitofusina-2 comentat abans, que Mitofusina-2 era molt semblant al gen FZO de *D. melanogaster* i de *S. cerevisiae* que s'havia implicat en la fusió de mitocòndries (Hales *et al.*, 1997; Rapaport *et al.*, 1998). És per aquest conjunt d'evidències que vam voler estudiar què passava amb la xarxa mitocondrial quan sobreexpressàvem Mitofusina-2 en cèl·lules en cultiu. En condicions normals és habitual trobar les mitocòndries connectades entre elles formant una intricada xarxa que s'estén per tot el citosol (Bakeeva *et al.*, 1978, 1981). Això s'observa en diverses situacions i teixits, des de múscul esquelètic i cardíac a fibroblasts en cultius (cèl·lules 10T1/2 o COS són bons exemples). Vam transfectar cèl·lules en cultiu 10T1/2 amb un plàsmid que contenia dos cassets d'expressió independents sota el control d'un promotor fort. Un dels cassets expressava la proteïna GFP ("Green Fluorescence Protein"), i en l'altre vam inserir el cDNA de Mitofusina-2 (pAdMfn2),

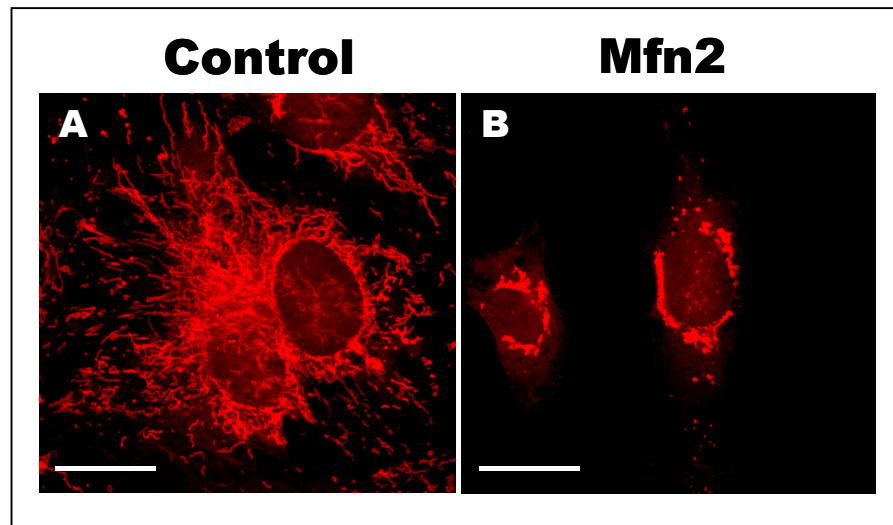


Figura 26. Efecte de la sobreexpressió de Mitofusina-2 sobre la xarxa mitocondrial. Cèl·lules 10T1/2 van ser transfectades transitòriament amb FuGene amb el plàsmid buit pAdTrack (Control) o amb un plàsmid que expressa Mitofusina-2 sota el control d'un promotor fort pAdMfn2(Mfn2). Després de 48 hores les cèl·lules van ser incubades durant 30 minuts amb la sonda de marcatge mitocondrial Mitotracker, van ser fixades, i portades al microscopi de fluorescència confocal, on es van prendre imatges de fluorescència vermella (Mitotracker associat a mitocondries). La barra d'escala correspon a 10 μ m.

o res (pAdTrack; control negatiu). Quaranta-vuit hores després de la transfecció es van marcar les mitocondries amb la sonda de marcatge mitocondrial depenent de potencial de membrana Mitotracker, i es van preparar les cèl·lules per la seva observació al microscopi confocal de fluorescència. La fluorescència verda de la proteïna GFP ens va permetre detectar les cèl·lules transfectades, tant en el cas de les transfectades amb el plàsmid que expressava Mitofusina-2 (pAdMfn2), com en el cas de les cèl·lules transfectades amb el plàsmid control negatiu (pAdTrack), i veure com eren les mitocondries (senyal de Mitotracker) en cada cas. Els resultats d'un experiment representatiu es mostren a la figura 26.

Les cèl·lules 10T1/2 transfectades amb el control negatiu presentaven, al igual que les cèl·lules no transfectades, una xarxa mitocondrial que s'estenia de manera radial del nucli cap a la perifèria, ocupant tot el citosol. Les cèl·lules transfectades que sobreexpressen Mitofusina-2 presenten les seves mitocondries en un "cluster" perinuclear, i han perdut la seva xarxa

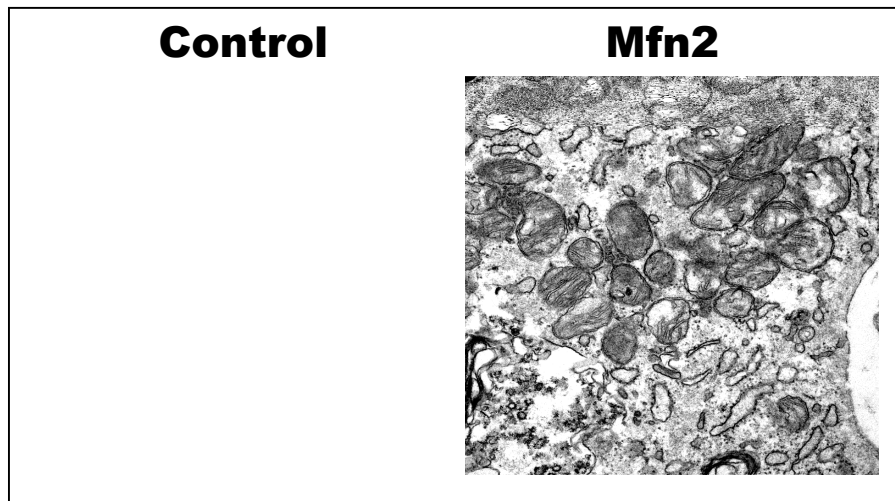


Figura 27. Efecte de la sobreexpressió de Mitofusina-2 sobre la xarxa mitocondrial (2). Cèl·lules 10T1/2 van ser transfectades transitòriament amb FuGene amb el plàsmid buit pAdTrack (CONTROL) o amb un plàsmid que expressa Mitofusina-2 sota el control d'un promotor fort pAdMfn2 (Mfn2). Tots dos plàsmids expressen la proteïna GFP. Després de 48 hores les cèl·lules van ser seleccionades en funció de la seva fluorescència verda segons fossin GFP+ (transfectades), o GFP- (no transfectades) mitjançant el citòmetre de flux, i processades pel microscopi electrònic de transmissió, on es van prendre imatges de les mitocondries (assenyalades amb asterisc). Es mostren una imatge representativa de cada condició. La barra d'escala correspon a 1 μ m.

mitocondrial. Al microscopi confocal de fluorescència és impossible discernir si es tracta d'una o diverses mitocondries gegants, producte de la fusió de mitocondries, o bé d'agregats de mitocondries de mida normal.

Mitjançant el citòmetre de flux és possible separar les cèl·lules transfectades que sobreexpressen Mitofusina-2 d'aquelles que no ho estan i expressen la Mitofusina-2 endògena a nivells normals. Així ho vam fer, tenint en compte d'aconseguir un nombre suficient de cèl·lules de cada tipus (300.000 cèl·lules com a mínim), i vam portar els precipitats als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, on els van processar per tal de poder ser examinats al microscopi electrònic. Els resultats d'un experiment representatiu es mostren a la figura 27.

Al microscopi electrònic el que veiem és una secció molt prima de la cèl·lula. És per això que no es pot apreciar la complexitat d'una xarxa mitocondrial com ho podem fer al microscopi

confocal de fluorescència, on podem veure un ampli gruix de cèl·lula. De manera que en les cèl·lules normals (no transfectades), les mitocòndries s'observen com a rodones, el·lipses o tubs més o menys allargats que corresponen a talls en diferents angles de les mitocòndries tubulars que s'observen al microscopi de fluorescència. En les cèl·lules transfectades, que sobreexpressen Mitofusina-2 veiem els "clusters" de mitocòndries perinuclears que també veiem al microscopi confocal, però no sembla el resultat d'una fusió de mitocòndries que hagin format "mitocòndries gegants", sinó agregats de mitocòndries que són normals en quant a mida i a ultraestructura, que les mitocòndries de les cèl·lules no transfectades.

V.2.16 Generació de clons "antisense" amb expressió de Mitofusina-2 disminuïda.

Els estudis dels efectes de la sobreexpressió de Mitofusina-2 van aportar interessants dades referents a una hipotètica funció de Mitofusina-2, però no eren un model paral·lel a allò observat en l'obesitat on havíem evidenciat una baixa expressió en múscul de Mitofusina-2. És per això que ens vam interessar en posar a punt un model en el qual es reprimís l'expressió de Mitofusina-2 i vam generar línies "Antisense" (AS) per Mitofusina-2 a partir de cèl·lules 10T1/2 (veure "Materials i mètodes"). Breument, es va transfectar un plàsmid (pcDNA3-AS) que expressava un fragment de cDNA (de 370 pb) complementari a la regió 5' no traduïda, l'inici de transcripció i part de la zona codificant del cDNA de Mitofusina-2. Aquest plàsmid conferia resistència a la geneticina a les cèl·lules transfectades, així que es van mantenir les cèl·lules en presència de l'antibiòtic durant unes quantes divisions (15 dies) fins que es van poder seleccionar aquelles colònies que havien incorporat el plàsmid en el seu genoma, i que per tant havien quedat transfectades establement amb el gen de resistència a geneticina i amb el fragment "antisense". Està descrit que la sobreexpressió de fragments de cDNA "antisense" d'aquestes característiques és capaç d'inhibir l'expressió del mRNA endogen al formar molècules híbrides amb ell de manera que no permeten la unió ni la progressió del ribosoma, i són ràpidament degradades per la RNAsa H endògena. Es va analitzar l'expressió del mRNA de Mitofusina-2 de trenta clons transfectats

V. Resultats

establement i resistent a la genètica, i es van seleccionar uns quants per analitzar l'expressió de la proteïna per Western Blot. En la figura 28 es mostren els nivells d'expressió del mRNA i de la proteïna Mitofusina-2 de dos d'aquests clons (AS1 i AS2); com a control s'inclouen cèl·lules normals no transfectades (wt) i cèl·lules transfectades establement amb el plàsmid buit (pcDNA3; idèntic a pcDNA3-AS però sense el fragment "antisense"), que únicament confereix resistència a genètica. En el panell A es mostra un experiment representatiu de Northern Blot en el que s'han carregat 20 µg d'RNA total de cada línia cel·lular. Com a control de càrrega es mostra la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosomal. En el panell B es mostra un

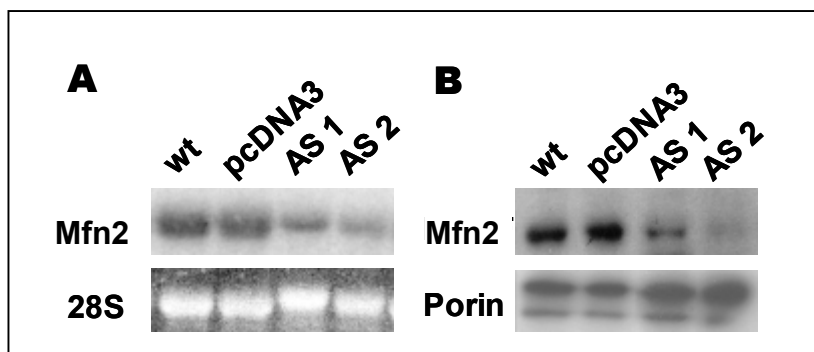


Figura 28. Caiguda de l'expressió d'mRNA i proteïna Mitofusina-2 en cèl·lules "antisense". Cèl·lules 10T1/2 van ser transfectades establement mitjançant el mètode de fosfat càlcic, amb un plàsmid control buit (pcDNA3), o amb un plàsmid que sobreexpressava un fragment complementari (370 pb's) del mRNA de Mitofusina-2, corresponent a la zona 5' no traduïda, a l'inici de traducció, i a part de la zona codificant. Es van seleccionar i amplificar clons individuals. Aquí es mostra l'expressió d'mRNA per Northern Blot (panell A), i de proteïna per Western Blot (panell B), de dos d'aquests clons (AS1 i AS2), junt amb l'expressió de les cèl·lules transfectades amb el plàsmid buit (pcDNA3) i cèl·lules no transfectades (wt). Com a control de càrrega es mostra la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic (panell A) i la senyal de porina (panell B).

experiment representatiu de Western Blot en el que s'han carregat 40 µg de proteïna d'un homogenat total de cada línia cel·lular. Com a control de càrrega es mostra la imatge de revelat de la part inferior de la membrana amb un anticòs contra la porina. S'aprecia en la figura 28 (panell A) com l'expressió del mRNA de Mitofusina-2 és inferior en els clons "antisense" que en les cèl·lules no transfectades o les transfectades amb el plàsmid buit. (50% d'expressió del clon AS1 i 27% del clon AS2, respecte els controls). Aquests mateixos clons també mostren una reduïda expressió de

la proteïna Mitofusina-2 detectada per Western Blot (panell B) (67% dels valors controls en l'AS1 i 32% en l'AS2).

V.2.17 Efectes de la repressió de Mitofusina-2 sobre la xarxa mitocondrial

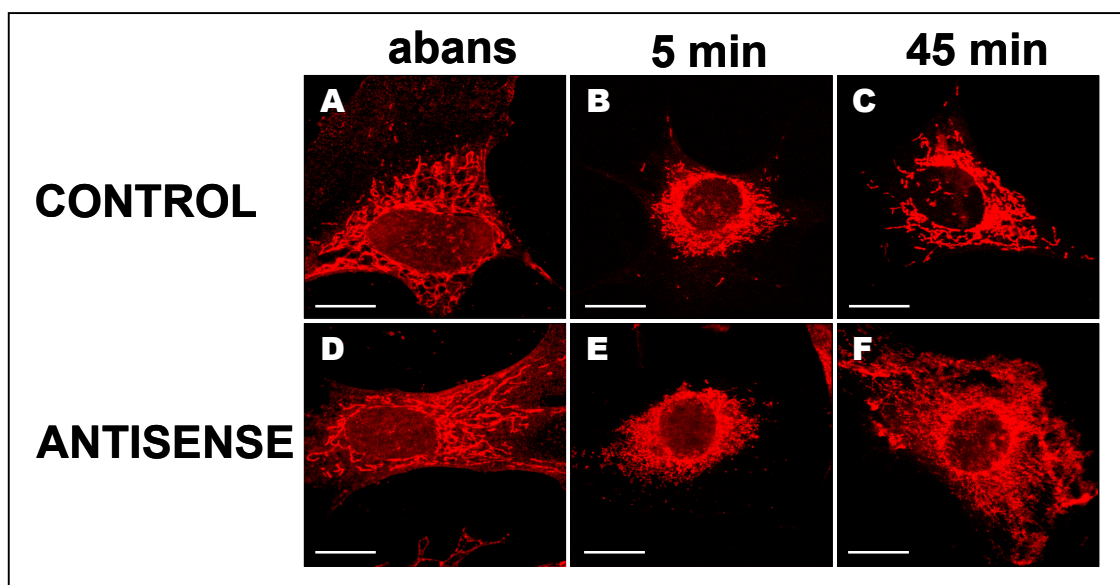


Figura 29. Efectes de la repressió de Mitofusina-2 sobre la xarxa mitocondrial. Les cèl·lules 10T1/2 no transfectades (control), i el clon "antisense" transfectat establement AS2, van ser sotmeses a un "shock osmòtic" de 5 minuts amb KCl 5M i posteriorment incubades de nou amb medi normal. Diferents mostres de cel·lules van ser preses just abans del "shock", just després o 45 minuts després del "shock". Van ser incubades durant 15 minuts amb la sonda de marcatge mitocondrial, i fixades, per observar-les al microscopi confocal de fluorescència. Imatges de 4 experiments independents van ser preses. Aquí es mostren les imatges d'un experiment representatiu. Les barres d'escala representen 10 µm.

La xarxa mitocondrial típicament present en les cèl·lules en cultiu es pot truncar mitjançant un "shock" osmòtic que desfai les estructures del citoesquelet, com van descriure Morris *et al.* (1985). Quan se sotmet les cèl·lules 10T1/2 no transfectades o transfectades amb plàsmid buit (pcDNA3) a una concentració 5 M de KCl durant 5 minuts i immediatament després es marquen les mitocòndries amb Mitotracker i es fixen les cèl·lules, totes les mitocòndries s'observen al microscopi confocal de fluorescència com un conjunt de punts discrets al voltant del nucli. Si després del "shock osmòtic" es deixen les cèl·lules recuperar abans de marcar-les amb Mitotracker

V. Resultats

i fixar-les, s'observa com les mitocòndries van desplaçant-se fins la perifèria i van formant túbuls fins acabar regenerant totalment la xarxa mitocondrial en només 45 minuts. Com s'observa en la figura 29 les cèl·lules "antisense" presenten un aspecte de la xarxa mitocondrial igual al de les cèl·lules control abans del "shock" osmòtic (panells A i B), i també perden la integritat de la xarxa mitocondrial després de 5 minuts de "shock osmòtic" (panells C i D). Però mentre les cèl·lules control recuperen la xarxa mitocondrial en 45 minuts (panell E), en les cèl·lules "antisense" que són defectives en l'expressió de Mitofusina-2, les mitocòndries migren cap a la perifèria però no formen estructures tubulars (panell F).

V.2.18 Efectes de la repressió de Mitofusina-2 sobre el metabolisme cel·lular

V.2.18.1 Efectes de la repressió de Mitofusina-2 sobre l'oxidació de glucosa

Paral·lelament als defectes en la recuperació de la xarxa mitocondrial les cèl·lules "antisense" mostraren una disminució en la taxa d'oxidació de glucosa comparades amb les cèl·lules transfectades establement amb el plàsmid buit (pcDNA3), tot i presentar una taxa de creixement i duplicació idèntica. Es va afegir [U]-¹⁴C-glucosa al medi normal de creixement de les cèl·lules 10T1/2 (concentració final: 5mM glucosa), i es va mesurar la quantitat de CO₂ marcat radioactivament alliberat al medi per les línies AS1 i AS2 o les línies controls (no transfectades: wt; i transfectades amb plàsmid buit: pcDNA3), en condicions de creixement exponencial (veure "Materials i mètodes"). Els resultats es mostren en la figura 30 expressats com nmols de glucosa oxidada per µg de proteïna i són les mitges ± ES de 4 experiments independents. Les diferències entre les cèl·lules "antisense" i les cèl·lules control pcDNA3 (45% dels valors de pcDNA3 en l'AS1 i 30% en l'AS2) són estadísticament significatives en els tres temps estudiats (P<0,05).

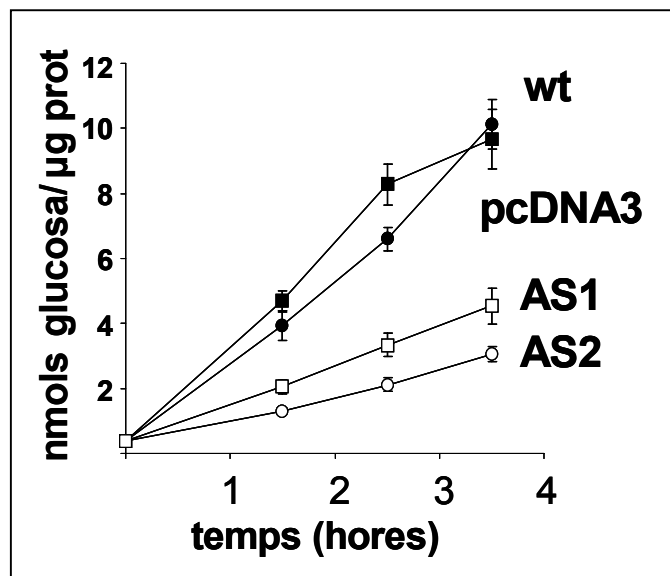


Figura 30. Efecte de la repressió de Mitofusina-2 sobre l'oxidació de glucosa. 200.000 cèl·lules 10T1/2 en fase logarítmica de creixement no transfectades (wt), transfectades establement amb el plàsmid buit (pcDNA3), o transfectades establement amb el constructe "antisense" (AS1 i AS2), van ser incubades amb ^{14}C -glucosa durant 3,5 hores en un sistema estanc. A diferents temps es va capturar el CO_2 emès pel mètode de la Hyamina (veure "Materials i mètodes"), i es va comptar la radioactivitat associada al ^{14}C en el comptador de centelleig beta. Els resultats són mitges \pm ES de quatre experiments independents, i s'expressen com a nmols de glucosa oxidada per μg de proteïna, en el temps. Les diferències entre els dos clons "antisense" i les cèl·lules control són estadísticament significatives en tots els punts estudiats ($P < 0,05$).

V.2.18.2 Efectes de la repressió de Mitofusina-2 sobre el "proton leak"

L'observació d'una menor oxidació de glucosa en les cèl·lules "antisense", que creixien a la mateixa velocitat que les normals i que no disposaven de substrats substitutius en el medi, ens va fer pensar de seguida que la repressió de Mitofusina-2 provocava un augment de l'eficiència metabòlica en aquestes cèl·lules. És conegut que prop d'un 20% del potencial de membrana mitocondrial generat per l'oxidació de substrats és dissipat per processos no conduents a la generació d'ATP, que anomenem respiració desacobrada o "proton leak" (veure "Introducció"). És

V. Resultats

per això que vam estudiar si en les cèl·lules "antisense", que expressaven menys quantitat de proteïna Mitofusina-2 es donava un increment de l'eficiència metabòlica provocat per una reducció en la taxa de "proton leak" respecte les cèl·lules control. Una reducció en la quantitat de "proton leak" o respiració desacoblada podria explicar el manteniment d'una taxa de síntesi d'ATP normal, a partir d'una menor oxidació de substrats, mercès a un millor aprofitament del potencial de membrana generat. Això indueix un increment en l'eficiència metabòlica.

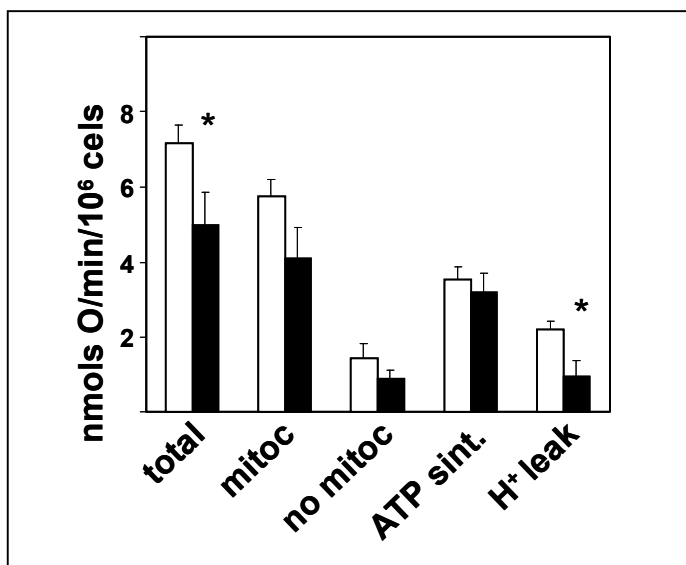


Figura 31. Efecte de la repressió de Mitofusina-2 sobre el consum d'oxigen i el "proton leak". Es va mesurar el consum d'oxigen de 2×10^6 cèl·lules transfectades establement amb el plàsmid buit (pcDNA3; barres buides), o transfectades establement amb el constructe "antisense" (AS2; barres plenes) en un elèctrode de Clark. Utilitzant diferents inhibidors (veure "Materials i mètodes") es va determinar la respiració total, la respiració mitocondrial, la respiració no mitocondrial, el consum d'oxigen conduent a la síntesi d'ATP (respiració acoblada) i el consum d'oxigen conduent a "proton leak" (respiració desacoblada). Els resultats són mitges \pm ES de quatre experiments independents i s'expressen com a nmols d'oxigen per minut i per milió de cèl·lules. * indica diferències estadísticament significatives entre AS2 i pcDNA3 ($P < 0,05$)

Vam mesurar la taxa de consum d'oxigen per la línia AS2 i per la línia control pcDNA3 (transfectada amb el plàsmid buit), en situació basal i en presència de diferents inhibidors (veure "Materials i mètodes"). Definim com a consum d'oxigen mitocondrial (respiració mitocondrial) el que

és inhibible per mixotiazol, i com a consum d'oxigen no mitocondrial (respiració no mitocondrial) el que és insensible a mixotiazol. El consum d'oxigen sensible a l'inhibició per oligomicina el definim com a respiració acoblada (conduent a la síntesi d'ATP) i el consum d'oxigen insensible a oligomicina però inhibible per mixotiazol (és a dir la part de respiració mitocondrial no inhibible per oligomicina) el definim com a "proton leak" o respiració desacoblada. Els resultats apareixen a la figura 31 expressats com a nmols d'oxigen consumit per minut i per un milió de cèl·lules i són mitges \pm ES de 4 experiments independents. S'aprecia una reducció del 30% en el consum total d'oxigen i una reducció del 50% en la respiració desacoblada ("proton leak") en la línia AS2 respecte la línia control pcDNA3. Les diferències en els dos paràmetres són estadísticament significatives ($P < 0,05$).

V.2.19 Localització cromosòmica de Mitofusina-2

El gen de Mitofusina-2 es localitza en el braç curt del cromosoma 1, en el locus 1p36.2 entre els marcadors D1S434 i D1S2843. Aquesta informació és fàcilment accessible en el servidor del NCBI, cercant a partir del nombre d'accés D86987, per exemple. Però en paral·lel en el nostre laboratori va ser confirmada pel Dr. Bernhard Baumgartner mitjançant l'anàlisi per PCR d'híbrids de radiació. Cal destacar que diversos estudis de lligament realitzats en humà i en ratolí, associen aquesta regió amb l'obesitat. Així, alguns QTL's ("quantitative trait loci") que influencien el pes corporal han estat mapats en un *locus* del cromosoma 4 de ratolí, que és sintènic amb la regió 1p36 humana, en un model poligènic d'obesitat (Brockman *et al.*, 1998) o en un model d'obesitat induïda per dieta (West *et al.*, 1994). Estudis de bessons impliquen la 6-PGH (6-fosfogluconat deshidrogenasa), situada en 1p36.2-p36.3, prop del *locus* de Mitofusina-2, en el gruix de plec de pell suprailíaca (Wilson *et al.*, 1991). En afegit, polimorfismes en el gen Rh o en el gen de TNF-R2, també propers al *locus* de Mitofusina-2, han estat associats amb obesitat, alts nivells de leptina o

V. Resultats

diabetis (Fernández-Real *et al.*, 2000; Stern *et al.*, 1986). Totes aquestes observacions suggereixen que Mitofusina-2 pot ser un gen de susceptibilitat per l'obesitat.

V.3 ESTUDIS SOBRE P311/PTZ-17

V.3.1 Identificació de P311

Com a resultat dels experiments de "Differential Display PCR", comentats en la primera part de "Resultats", vam obtenir la banda de cDNA amplificat que s'assenyala en la figura 32. Correspon a un fragment de cDNA de 316 parells de bases, que per les característiques de la tècnica emprada, corresponia a l'extrem 3'UTR del mRNA original.

```

1 ttctgaactg tttgcgcttc tgactgtaa acaccaatga tgcattgact
50 gtccctcttc gctctttctc tcgcttcccc tctggcttga atttcttgtg
100 cattctcgct acccccacct ctgtagggg aggtatatca gctatgtaa
150 taaagcaagg aaacggtatt gtgcatttgt ggcattatgt agaattgcag
200 tgtgcgctgc cgaaaatgca ggcttttcta acgtggtcct ctcataagta
250 cccaatgat tttagctatt ttagtaggat ttgttcaata aatatgcaag
300 ctataaggta aaaaaa

```

Figura 32. Fragment de P311 clonat per DD-PCR. Obtingut de la seqüenciació de la banda purificada de la figura 3, després d'aplicar la tècnica de "Differential Display" (veure "Materials i mètodes") a múscul esquelètic de rates joves i velles.

Per identificar l'mRNA de procedència d'aquest fragment de cDNA es va fer un anàlisi BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool; veure "Materials i Mètodes"), sobre el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information), contra la base de dades **nr** ("non redundant"). El resultat va ser que la nostra banda presentava un 100% d'identitat amb la part homòloga del cDNA de ratolí X70398 i un 83% amb la part homòloga del cDNA humà U30521 (entre els nucleòtids 1704 i 2027), clonats ambdós per Studler *et al.* (1993). Aquests cDNA's

V. Resultats

codifiquen per la proteïna P311 (o també anomenada PTZ-17). El cDNA humà es presenta a la figura 33. El nostre fragment clonat és a l'extrem 3' d'aquest cDNA i apareix subratllat.

```
1 tttcctcttt ctetaagagt ctctctctcc ctttccctct ctctcecccc aatctgtctt
61 tctagcatgt tgcctttttt caaccacatt tgtgtttcag gtgtagagag gagagagagt
121 gaacagggag cggggctttt gtctgttggg ctccctggac tgaagagagg gagaatagaa
181 gcccaagact aagattctca aaatggttta ttaccagaa ctctttgtct gggtcagtca
241 agaaccattt ccaaacaagg acatggaggg aaggcttctt aaggaagac ttctgtccc
301 aaaggaagtg aaccgcaaga agaacgatga gacaaacgct gcctccctga ctccactggg
361 cagcagtgaa ctccgctccc caagaatcag ttacctccac tttttttaat cgtaacacct
421 ccatattgat tacatatggg gtatgggtat tgatgaggtc atgggtatcat atatgggatt
481 tttttctgtg taaatcatca agtataagaa gaaactatgg gactctgagc cttgctttag
541 agaatttaca gtggacaaat aggtgtcatc aaaccagttt ttaatcattc tgactcaagt
601 gaaaacgctc agaatttcac actgtgaatc cacgtttaca acccttacag gtgggccttc
661 aggcctgggt cgctacaaca atgtcttcca caactcaaac tcccaccgcg ctcacacaac
721 cggctcactc ctgccttttc actcacacag ctcccgactg cttcttgtag aggctgagag
781 tcccccccc cacccttttt tttcatttag atgtaacaaa cctagtagtt tatgttcac
841 aattgtctgt atactcttat attttatcca tgtactcttt tgatgtatag aagtagtttg
901 aaactcattg tttccttgtg gtaagtgacc gagatgctgc cacaggacct gagacactga
961 tgaatgggtg tattttggac tttcaacatg ctccctggcg aggtagctct gatggagtta
1021 ttttttattt ccatgttcta agaaggtgtt ggtactctgt ttccctgaat gttgttctct
1081 agactggatt gaactgtttt cettgtgtct tcagtgtggc tttcttctc agtggttag
1141 gttgagcgaa tgctaccaga gtgtgagaga ccattgtctc gttggctggc gctcacggac
1201 atgcagtcac ggtagcggga gcaatcaca aactgtaatt tacttaccaa atctcttct
1261 ttccgtagcc tcgcctgcct gacttagaga aagaaaagca ataattttac aggcattttg
1321 aggtgtctct ttgggttctt tctgtttgaa aggatatttg tcgaaaaaaaa gagcaaaacc
1381 gttttaaata aactccccct ggaaaaaaaa ccaaaacact ggcactctgag taggaatatg
1441 aaaatgacac cttttccaaa tattaattg gaaaacaagg tctacaaaat catgatactt
1501 ttttaaaagg cagagcattc ttttttcggc aattttgata agcaaggtgt agatttacat
1561 ttttgtcctt gctcccacg aaatggataa acaaaaataa attaccatct actcatggaa
1621 tgttgttgtg ttagccagtc tgaaagccca cettaatttt tatataactg tctttagctc
1681 ttcttttgac agggcaggcc ttgttctgaa ctgtttcgct tctgactggt aacaccgat
1741 gacgcatgca ctgcacttct tcgttttctt cttgctcccc cattggcctg agtttcttgt
1801 gcattactcc tctccctcct tcgttagaat aggtatatca gctgtgtaaa tagagcaaga
1861 aaacagtatt ctgcatctgt ggcatttatg tagagttgca gttgtgtact gctgaaaatg
1921 caggcttttg taacagtgtg atctttactg atgcactcat gacaagtacc caatgtattt
1981 tagctatttt agtagtattt gttcaataaa tacgcaagct gtaaggtaac tgtctg
```

Figura 33. Seqüència del cDNA humà de P311 (PTZ-17). Utilitzant el fragment clonat per "Differential Display", que apareix a la figura 32, i utilitzant el programa BLAST al servidor del NCBI (veure "Materials i mètodes-Eines bioinformàtiques"), vam trobar per homologia les seqüències completes del cDNA de ratolí, i de humà, clonades de manera independent per Studler *et al.*(1993) i per Kajiwara *et al.* (1995). Aquí presentem la seqüència del cDNA humà de P311 (Genebank Acc.N. U30521). La zona que correspon al nostre fragment clonat per "Differential Display" és la compresa entre els nucleòtids 1704 i 2027 i apareix subratllada.

Studler *et al.* (1993), van descriure que aquest era un gen expressat abundantment en el cervell de l'embrió de ratolí i que durant el pas a la vida adulta de l'animal es manté altament expressat en el cerebel, en l'hipocamp i en el bulb olfatori. De manera independent, Kajiwara *et al.* (1995) descriviren que l'expressió d'aquest gen es reprimeix en cultius primaris de neurones de ratolí en resposta al pentilenetetrazol (PTZ). Aquest fàrmac provoca episodis epilèptics en ratolins i es fa servir com a model d'estudi d'aquesta malaltia. El recent treball de Taylor *et al.*, (2000) mostra que la proteïna codificada per aquests cDNA's podria ser el polipèptid de 68 aminoàcids producte de la transcripció entre les posicions 203 i 409 del cDNA humà U30521.

V.3.2 Expressió de P311 durant l'envelliment en la rata

L'interès d'identificar gens d'expressió disminuïda o augmentada en l'envelliment de la rata radica en que amb l'edat apareix la resistència a la insulina en el múscul d'aquests animals, de la mateixa manera que passa en humans. Un cop vam tenir clonat i identificat el fragment amplificat al final de tot el procés experimental de "Differential Display PCR" vàrem comprovar que no estàvem davant d'un fals positiu. Utilitzant el fragment clonat (figura 33) com a sonda, vam comprovar que efectivament l'expressió del gen fos disminuïda en l'envelliment. Per això vam fer servir teixits extrets de rates Wistar normals joves (3 mesos) i velles (1 any), els mateixos dels quals havíem obtingut cDNA per fer l'experiment de DD-PCR (Differential Display PCR). Vam obtenir RNA total de múscul cardíac i de múscul esquelètic (gastrocnemius) i vam fer Northern Blot, hibridant les membranes amb el fragment de la figura 32, marcat radioactivament amb ^{32}P -dATP, com a sonda. Com a control de càrrega vam utilitzar la imatge de la tinció amb bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosomal. El resultat es mostra a la figura 34.

Amb aquesta tècnica i mitjançant l'anàlisi densitomètric de les imatges de Northern Blot, vam demostrar que, efectivament, l'mRNA de P311 mostrava una reduïda expressió amb l'envelliment tant en múscul esquelètic (en unitats arbitràries una caiguda en l'expressió del $50\pm 8\%$

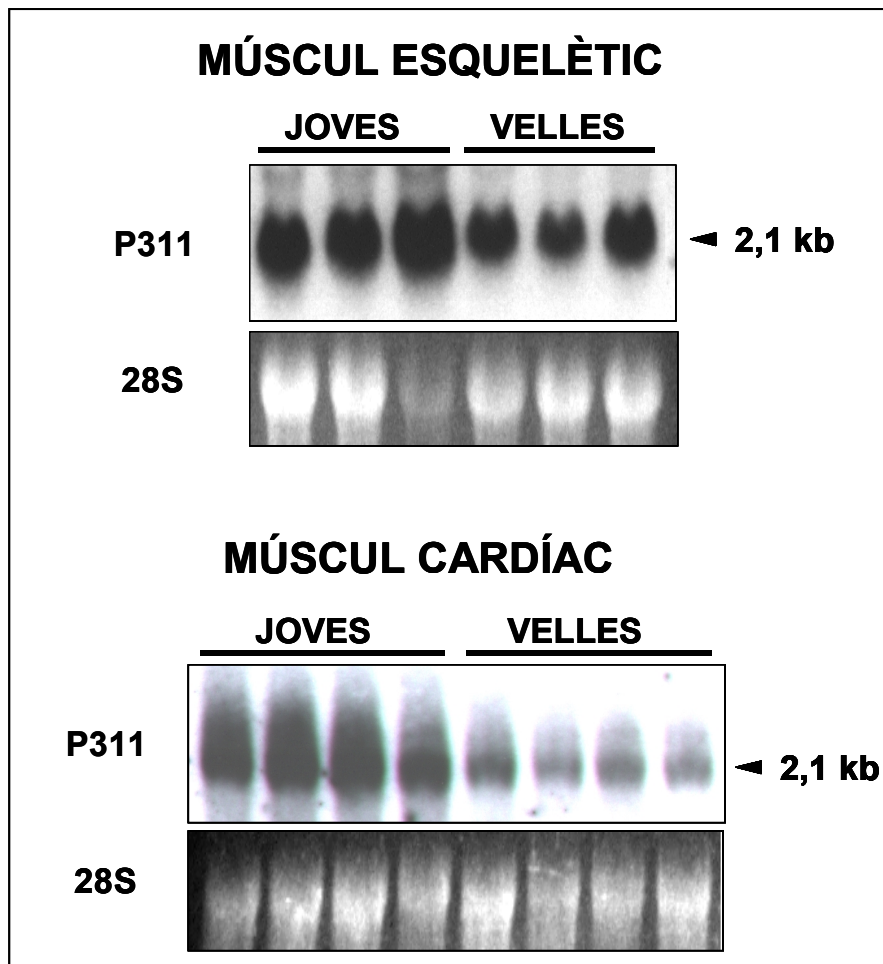


Figura 34. Expressió del gen de P311 en múscul esquelètic i cardíac de rates joves i velles. Es va purificar RNA total a partir de múscul esquelètic (gastrocnemius) i múscul cardíac de rates Wistar joves (3 mesos d'edat) i velles (12 mesos d'edat). Es van aplicar 20 µg d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de P311 es va detectar després de la hibridació amb el fragment de 316 pb corresponents a l'extrem 3'UTR del mRNA (veure figura 32). La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. Es mostra un experiment representatiu amb cada tipus de teixit.

com en múscul cardíac (en unitats arbitràries una caiguda del $76\pm 9\%$) A més el missatger mostrava una mobilitat electroforètica d'acord amb la seva mida segons les bases de dades (2,1 kb). L'extensió de la caiguda en l'expressió de P311 en múscul esquelètic va ser semblant a la que havíem vist en l'experiment de "Differential Display". En el cas d'aquesta banda, doncs, la tècnica de "Differential Display PCR" va reproduir fidelment l'expressió del mRNA en una i altre condició. Aquest fet és destacable perquè és coneguda la distorsió que introdueix l'amplificació exponencial

de la PCR a l'hora de representar les poblacions relatives de cada mRNA. Aquesta amplificació exponencial incrementa el risc de tenir tant falsos positius com falsos negatius. Els primers els descartem amb Northern Blot, però els segons els perdem.

V.3.3 Expressió disminuïda de P311 en un model animal de diabetis de tipus 2.

Si l'expressió gènica de P311 està reduïda en l'envelliment, situació caracteritzada per la resistència a la insulina, fóra lògic pensar que altres situacions de resistència a la insulina també podrien associar-se a canvis en l'expressió d'aquests gen. És per aquesta raó que es va estudiar l'expressió de P311 en múscul esquelètic en la rata Zucker *fa/fa* obesa i en la rata obesa i diabètica ZDF (Zucker Diabetic Fatty). De nou s'aplicà la tècnica de Northern Blot per la qual es va utilitzar el mateix fragment amplificat per DD-PCR com a sonda, es va marcar radioactivament amb ^{32}P -dATP i es va hibridar contra la membrana de niló que contenia els RNA total de múscul esquelètic

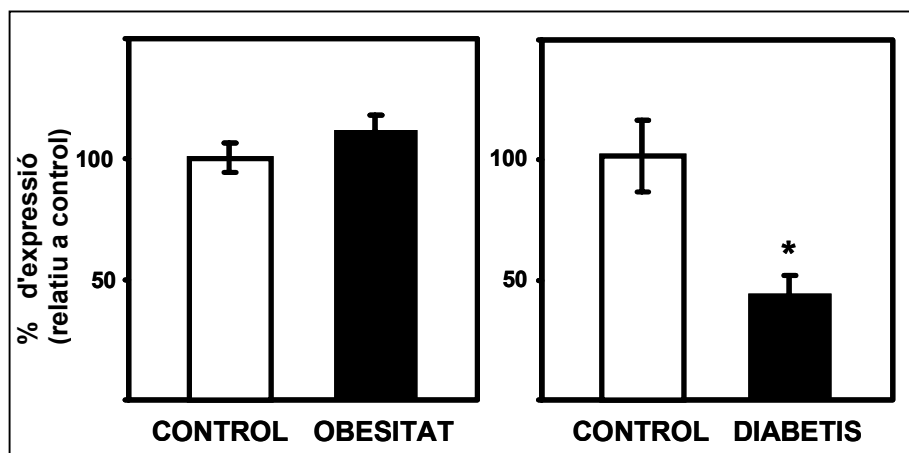


Figura 35. Expressió del gen P311 en múscul esquelètic de rates obeses Zucker i diabètiques ZDF. Es va purificar RNA total a partir de múscul esquelètic (gastrocnemius) de rates obeses Zucker i diabètiques ZDF. Es van aplicar 20 µg d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de P311 es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. Es va fer anàlisi densitomètric de la senyal corresponent a P311 corregint amb la intensitat de la subunitat 28S del RNA ribosòmic. Es mostren les mitges±ES de quatre experiments independents, expressades com a percentatge d'expressió respecte el grup control. Les diferències són estadísticament significatives, *P<0,05.

V. Resultats

transferits. Com a control de càrrega es considerarà la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosomal, prèviament fotografiada sobre el gel d'agarosa. El resultat es presenta a la figura 35.

L'expressió del gen P311 es manté igual en el múscul de les rates *fa/fa* Zucker que en les rates controls *fa/+*, mentre que disminueix dràsticament en el múscul esquelètic de les rates ZDF (Zucker Diabetic Fatty) respecte els seus controls (reducció del $66\pm 8\%$ en l'expressió, associada a la diabetis).

V.3.4 Distribució tissular de P311 en la rata

A continuació, amb la intenció de fer una primera aproximació a la funció d'aquest gen vam voler saber quin era el seu patró d'expressió en diferents teixits de la rata. Es van fer assajos de Northern Blot fent servir el mateix cDNA com a sonda marcada radioactivament que s'ha comentat

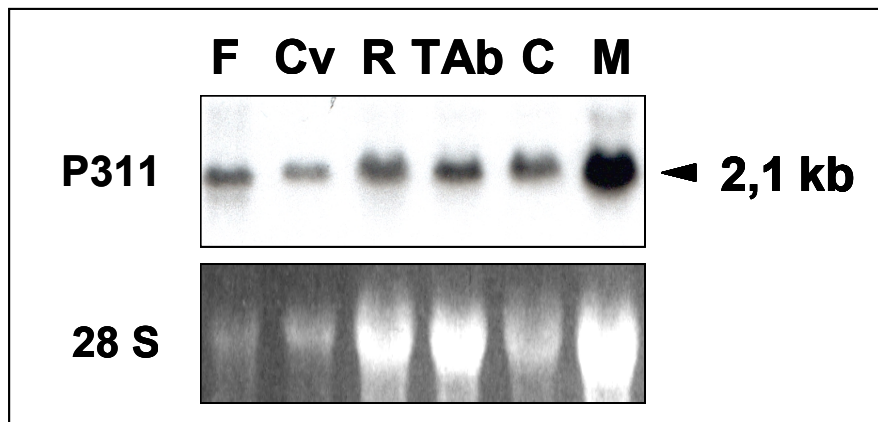


Figura 36. Expressió de P311 en diferents teixits en la rata. Es va purificar RNA total a partir de diferents teixits de rata Wistar. Es van aplicar 20 µg d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de P311 es va detectar després de la hibridació amb el fragment de 316 pb corresponents a l'extrem 3'UTR del mRNA (veure figura 32). La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. Es mostra un experiment representatiu. F: fetge; Cv: cervell; R: ronyó; TAb: teixit adipós blanc; C: cor; M: múscul esquelètic.

en els dos apartats anteriors. Es va hibridar contra RNA total extret de diversos teixits de rata: fetge, cervell, ronyó, teixit adipós blanc, cor i múscul esquelètic. Com a control de càrrega es va prendre la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosomal. El resultat es mostra en la figura 36.

Podem constatar com l'mRNA de P311 presenta una elevada expressió en tots els teixits estudiats. És per tant un gen que s'expressa en molts altres teixits a part del sistema nerviós central, on va ser descrit primerament (Studler *et al.*, 1993; Kajiwara *et al.*, 1995). A diferència d'altres gens estudiats en aquesta tesi, l'expressió de P311 tot i ser màxima en múscul esquelètic no sembla restringida a teixits sensibles a insulina.

V.3.5 Expressió de P311 en la diabetis i l'obesitat humana

Un cop analitzat què passava amb l'expressió de P311 en diferents situacions de resistència a la insulina en rates, i comprovar que efectivament hi havien diferències d'expressió segons l'estat fisiològic de l'animal, vam estudiar quin era el comportament del gen en individus humans. Ho vam fer a partir de les mateixes biòpsies dels pacients que ja hem estudiat en la secció "Estudis sobre Mitofusina-2" anteriorment. Les característiques d'aquests pacients ja s'han mostrat abans en la Taula 1,2 i 3, i aquí només parlarem d'allò que es refereix específicament al patró d'expressió del gen P311.

En tots els casos es va aplicar el mateix protocol de PCR competitiva quantitativa per mesurar els nivells d'mRNA de P311, tal com es descriu en "Materials i mètodes". En la figura 37 es mostra un experiment representatiu amb un dels pacients que dóna una mesura de la linealitat de la tècnica en el rang de concentracions d'estàndard que es va fer servir per P311.

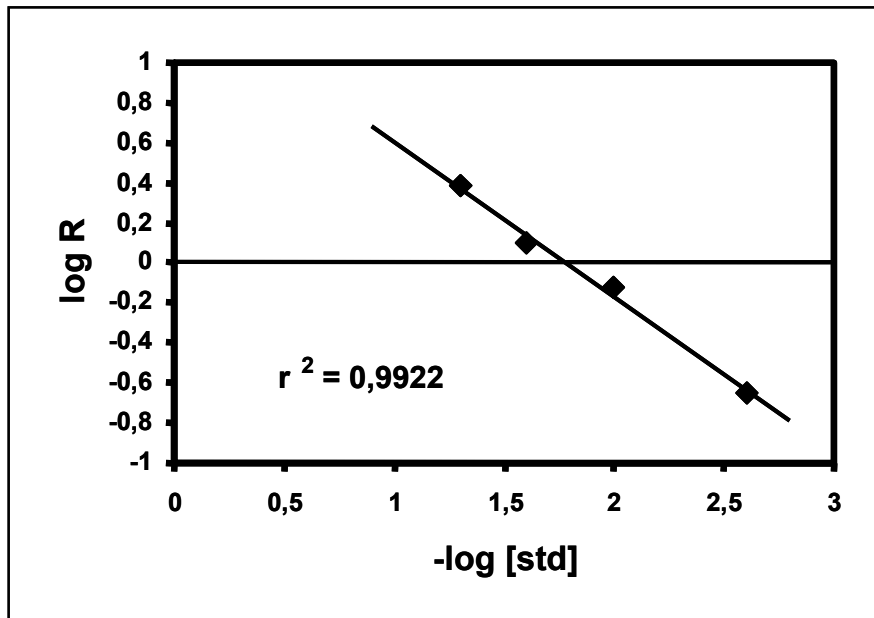


Figura 37. Experiment representatiu de PCR competitiva quantitativa per la mesura de l'expressió de P311. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic humà (vastus lateralis), i es va sintetitzar a partir d'ell cDNA. Es va dissenyar i sintetitzar un estàndard amplificable amb el mateix parell de "primers" que P311, però donant un producte lleugerament diferent en mida (200 pb en lloc de 300 pb), i es va coamplificar cada mostra de cDNA amb diferents concentracions d'estàndard. Es va mesurar la intensitat de les bandes amplificades per densitometria òptica o per fluorescència (veure "Materials i mètodes"). Sobre l'eix x es projecta el valor negatiu del logaritme de les concentracions d'estàndard usades (que oscil·len entre 0,001 i 1 amols/ μ l), i sobre l'eix y el logaritme d'R, essent R el quocient entre la intensitat de la banda corresponent a l'amplificació de l'estàndard i la intensitat de la banda corresponent a l'amplificació de P311. Allà on la recta talla el punt 0 de l'eix y (R=1; idèntica intensitat de banda d'amplificació dels dos productes), s'extrapola la concentració d'estàndard en aquell punt. Suposant idèntica eficiència d'amplificació per P311 i per l'estàndard usat, aquesta serà la concentració de P311 en la mostra problema de cDNA. La linealitat de la mesura en aquest rang de concentracions va ser molt bona ($r^2=0,9922$).

V.3.5.1 Estudi de l'expressió de P311 en pacients diabètics de tipus 2 no obesos

El grup suec (taula 3) estava format per nou voluntaris sans i vuit voluntaris diabètics de tipus dos no obesos (exceptuant dos individus que sí ho eren), dels que es va extreure una biòpsia muscular en el Karolinska Institute (Stockholm, Suècia). Breument, de les biòpsies de múscul esquelètic (vastus lateralis) es va purificar RNA total i es va procedir a la quantificació dels nivells d'mRNA del gen P311 mitjançant la tècnica de PCR competitiva quantitativa, (veure "Materials i mètodes"). El resultat apareix en la figura 38 expressat com a percentatge d'expressió respecte el grup control.

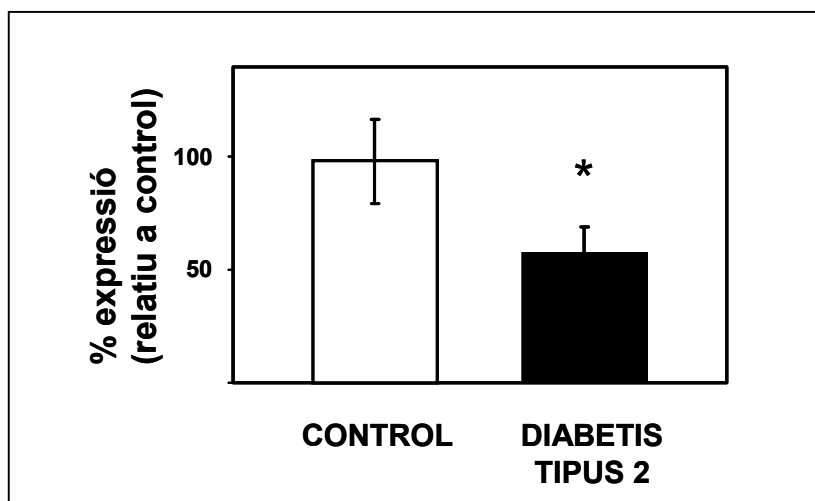


Figura 38. Expressió de P311 en pacients diabètics de tipus 2 no obesos. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 2 no obesos. L'mRNA de P311 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES, de nou i vuit observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte al grup control. * indica una diferència estadísticament significativa entre els subjectes control i els diabètics de tipus 2, a $P < 0,05$.

Els nivells d' mRNA del gen P311 estan reduïts en un 43 ± 10 % en el grup de diabètics de tipus 2, essent aquesta diferència estadísticament significativa ($P < 0,05$). Com és conegut, els subjectes amb diabetis de tipus 2 presenten una disminuïda sensibilitat a la insulina en comparació amb els individus control. En el cas d'aquests pacients s'els va mesurar la seva sensibilitat a

V. Resultats

insulina amb un "clamp" euglicèmic hiperinsulinèmic. L'indicador de sensibilitat a insulina és en aquests casos el valor M, essent aquest aquella quantitat de glucosa infosa en el pacient per quilogram de pes i per minut, durant el "clamp", en condicions en que la hiperinsulinèmia inhibeix la producció de glucosa hepàtica i activa l'absorció de glucosa en teixits perifèrics. Recordem, que quanta més glucosa absorbeix el pacient, més alt és aquest valor M, essent indicador de més sensibilitat a insulina quan més alt és el seu valor. En concret per aquests pacients, com es mostra a la taula 3 les mitges eren pel grup control $M = 41,7 \pm 5,8$ mg/kg/min, i pel grup diabètic $M = 28,9 \pm 5,7$ mg/kg/min. Donat que variacions en l'expressió de P311 podrien estar associades amb la resistència a la insulina, vam correlacionar les dades d'expressió del mRNA de P311 i les dades de sensibilitat a insulina d'aquests pacients. El resultat es mostra en la figura 39.

Hi ha una bona correlació ($r=0,656$; $P<0,05$) entre els nivells d'expressió del missatger de P311 i el grau de sensibilitat a insulina (valor M), tot i que la manca d'informació sobre sensibilitat a insulina de quatre dels pacients obligava a reduir el nombre dels que entraven en la correlació

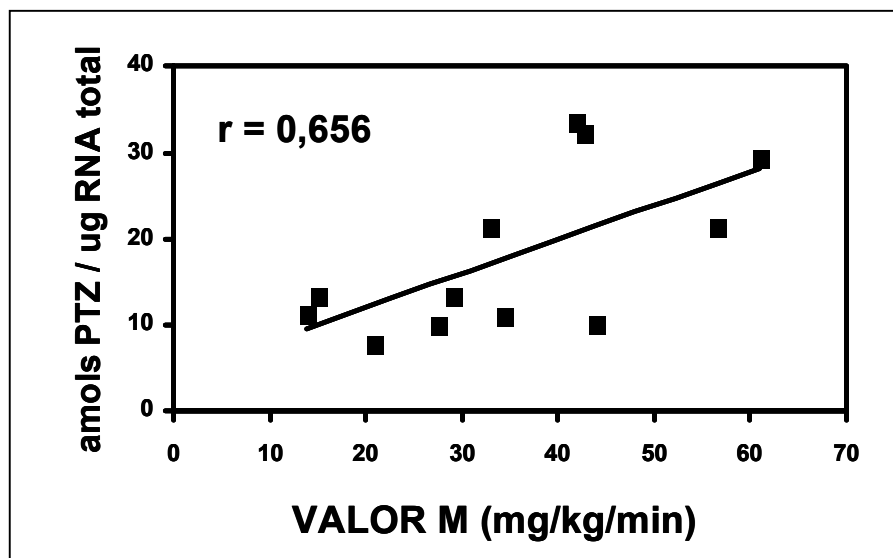


Figura 39. Correlació de l'expressió de P311 amb la sensibilitat a insulina (valor M). Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 2 no obesos. L'mRNA de P311 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"), i expressat com amols d'mRNA de P311 per μ g d'RNA total. Es mostra la correlació entre els nivells d'mRNA de P311 en múscul esquelètic i la sensibilitat a insulina (valor M) en pacients controls i diabètics de tipus 2. Les dades s'ajusten a una funció lineal de manera estadísticament significativa ($P<0,05$) essent el coeficient de correlació $r=0,656$.

(n=13). Tot i així, les dades indiquen que una disminuïda expressió del missatger de P311 s'associa a la resistència a la insulina (baixos valors de M) en el cas de considerar junts pacients controls i pacients diabètics no obesos. Aquesta observació s'adiu amb les dades obtingudes anteriorment en rates velles i diabètiques.

V.3.5.2 Expressió de P311 en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos

El grup de pacients procedent de Lyon d'edats mitjanes entre 44 i 52 anys (veure dades a la taula 1) estava format per 7 voluntaris sans, 18 voluntaris diabètics de tipus dos i 6 voluntaris obesos. S'els hi va extreure una biòpsia muscular en el Centre de Recherche en Nutrition Humaine (Lyon, França). El personal del Centre ja havia purificat RNA total de les biòpsies i es va procedir a la quantificació dels nivells d'mRNA del gen P311 mitjançant la tècnica de PCR competitiva

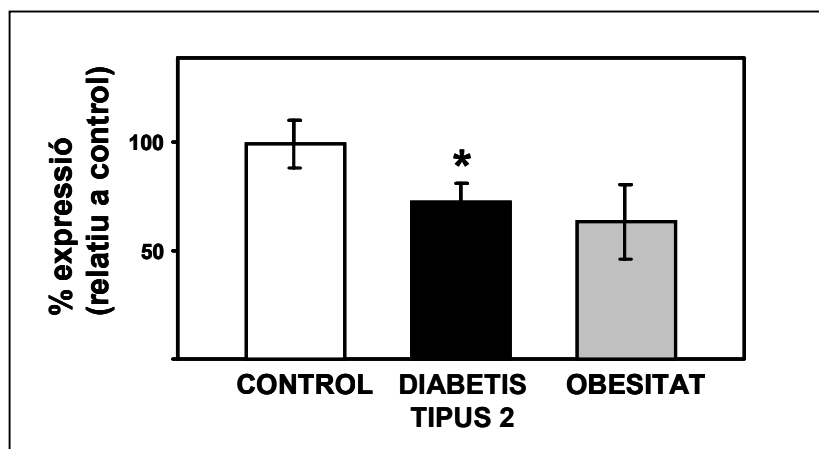


Figura 40. Expressió del mRNA de P311 en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls, de pacients diabètics tipus 2 obesos, i de pacients obesos no diabètics. L'mRNA de P311 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES, de set, divuit, i sis observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte al grup control. * indica una diferència estadísticament significativa respecte els subjectes control, a $P < 0,05$.

V. Resultats

quantitativa, (veure "Materials i mètodes"). El resultat apareix en la figura 40 expressat com a percentatge d'expressió respecte el grup control.

La caiguda en l'expressió de P311 en el grup obès respecte els controls no és significativament estadística ($37\pm 20\%$), però l'expressió del missatger de P311 està reduïda significativament en pacients diabètics de tipus 2, en un $28\pm 14\%$ ($P < 0,05$), respecte els controls, unes dades que confirmen les observades pels individus diabètics de tipus 2 de Suècia. Però a diferència d'aquells, en els pacients de Lyon, no va ser possible establir una bona correlació entre l'expressió de P311 i la sensibilitat a insulina mesurada pel "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic. En canvi, tant si consideràvem només els pacients de la taula 1 (d'edat més elevada) com els pacients de les taules 1 i 2 barrejats (d'edats diferents), observàvem sistemàticament una bona correlació entre els nivells d'expressió de P311 i la taxa d'oxidació de lípids durant el "clamp", en condicions de hiperinsulinèmia. Aquests resultats es mostren en la figura 41, i s'observa en el

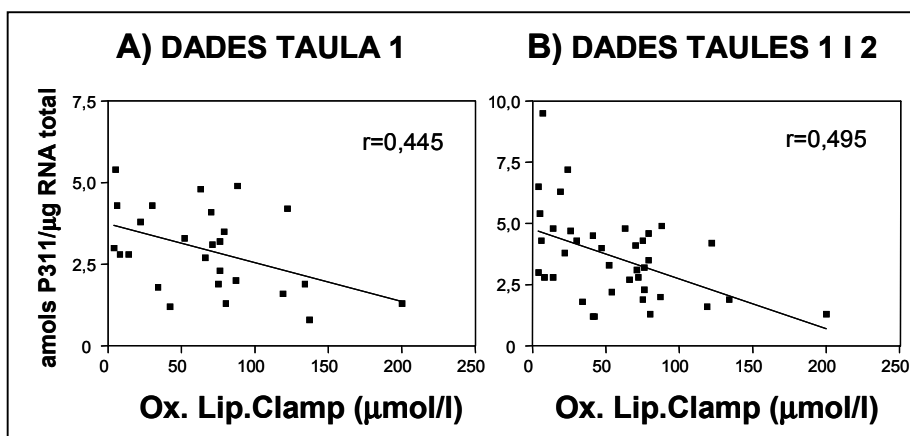


Figura 41. Correlació de l'expressió de P311 amb oxidació de lípids durant "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients (veure taules 1 i 2) després d'un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic en que es va perfundir insulina a una taxa de 12 pmols/kg/min durant 3 hores. L'mRNA de P311 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"), i expressat com amols d'mRNA de P311 per μg d'RNA total. En el panell A es mostra la correlació entre els nivells d'mRNA de P311 en múscul esquelètic i la taxa d'oxidació de lípids durant el "clamp" en pacients controls, obesos i diabètics de tipus 2 (veure taula 1 per les característiques dels pacients). En el panell B s'hi ha afegit les dades dels pacients control i diabètics de tipus 1 de la taula 2. Les dades s'ajusten a una funció lineal de manera estadísticament significativa ($P < 0,05$) essent el coeficient de correlació $r=0,445$, en el panell A i de $r=0,495$ en el panell B.

panell A, amb les mostres de la taula 1, controls, obesos i diabètics de tipus 2 d'edats mitges entre 44 i 52 anys, una correlació lineal estadísticament significativa ($r=0,445$; $P<0,05$); mentre que en el panell B, en que s'afegeixen els pacient control i diabètics de tipus 1 d'edat més jove (taula 2), la correlació amb la taxa d'oxidació de lípids durant el "clamp" es manté ($r=0,495$; $P<0,05$), i s'observen noves correlacions no mostrades (amb el BMI, $r=0,308$; amb nivell de triglicèrids, $r=0,394$ i amb la taxa d'oxidació de lípids basal, $r=0,320$), que possiblement només reflexen l'associació que hi ha entre diferents paràmetres fisiològics.

V.3.5.3 Estudi de l'expressió de P311 en pacients diabètics de tipus 1.

Disposàvem també de les biòpsies de múscul esquelètic (vastus lateralis) de 11 voluntaris controls joves (edat: 24 ± 1 anys) i 8 voluntaris diabètics de tipus 1 de la mateixa edat (edat: 34 ± 3 anys; per més dades veure taula 2). L'origen de les biòpsies i de l'RNA total purificat era el mateix que en el grup anterior, i també vam aplicar la tècnica de PCR competitiva quantitativa per mesurar els nivells d'mRNA de P311 en aquests pacients. El resultat s'expressa com a percentatge d'expressió respecte el grup control, en la figura 42.

En els pacients diabètics de tipus 1 s'observa un increment de l'expressió del $73\pm 6\%$ per sobre dels nivells del grup control, diferència estadísticament significativa ($P< 0,01$). És a dir, just l'efecte contrari a l'observat en els pacients diabètics de tipus 2.

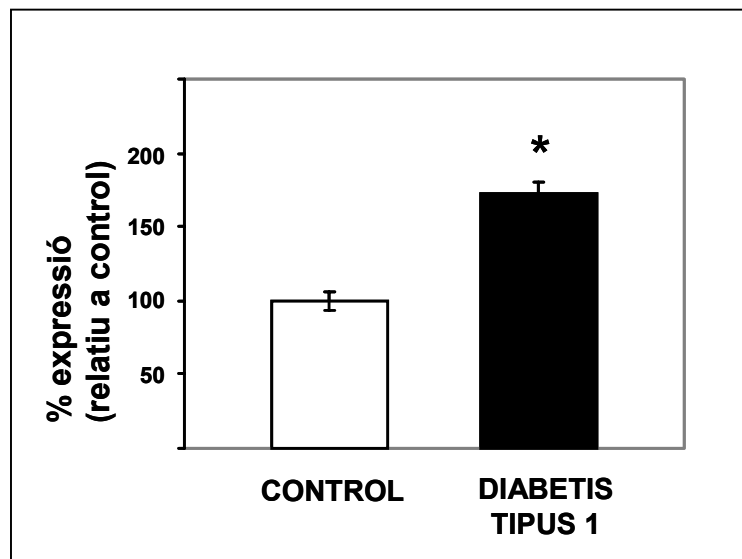


Figura 42. Expressió de P311 en pacients diabètics de tipus 1. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 1. L'mRNA de P311 va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES, d'onze i vuit observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte al grup control. * indica una diferència estadísticament significativa entre els subjectes control i els diabètics de tipus 1, a $P < 0,01$.

V.4 ESTUDIS SOBRE DOR

El nom del gen : DOR, acrònim de "Diabetes and Obesity Regulated gene", se li va posar en base a les dades sobre la seva regulació que quedaran detallades en aquesta secció de resultats. Ens estem referint amb aquest nom al gen del qual forma part el clon identificat per hibridació sostractiva, en la posició G3 del "Differential Screening" (figura 5).

V.4.1 Expressió de DOR en diabetis de tipus 2 en la rata

El fragment clonat per hibridació sostractiva, va ser usat com a sonda en Northern Blot per confirmar la caiguda l'expressió del gen en el múscul esquelètic de la rata obesa Zucker. Per això es va marcar radioactivament amb ^{32}P -dATP (veure "Materials i Mètodes"), i es va hibridar contra 20 µg d'RNA total extrets de múscul esquelètic (gastrocnemius), de la rata Zucker. Igualment es va fer Northern Blot usant la mateixa sonda contra RNA total extret de múscul esquelètic de la rata ZDF, Zucker Diabetic Fatty, obesa i diabètica. L'expressió de DOR en aquestes condicions es mostra en la figura 43. Com a control de càrrega es va prendre la imatge de la tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic.

El revelat del film deixava veure la senyal d'una sola banda discreta, corresponent a un mRNA d'uns 4,7 kb. Es va fer anàlisi densitomètric de quatre experiments independents, i el resultat es presenta com a mitges±ES com a percentatge d'expressió respecte el grup control. Com es pot apreciar en la figura la caiguda de l'expressió en la rata obesa Zucker és petita (20 ± 7 % de reducció) però estadísticament significativa ($P<0,01$), mentre que l'expressió en la rata ZDF està força disminuïda (reducció del 77 ± 13 % respecte al control) i de manera estadísticament significativa ($P<0,005$). Estem davant un gen l'expressió del qual està reduïda en obesitat però molt més en diabetis. Recordem que les dues línies de rates, Zucker i ZDF, tenen un "background"

V. Resultats

genètic molt similar, i que només es diferencien en la capacitat de la cèl·lula β per compensar la resistència a la insulina amb hipersecreció d'insulina, amb les conseqüències que això comporta.

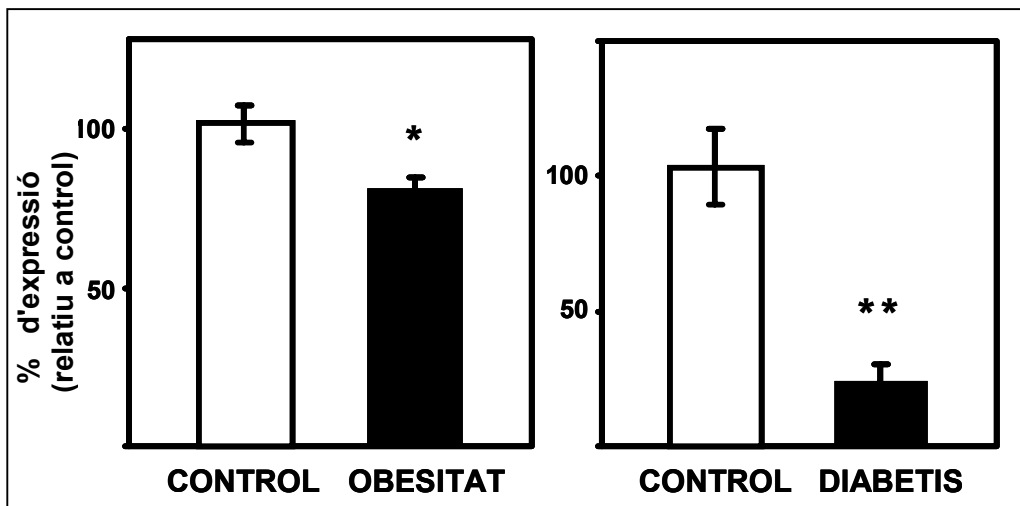


Figura 43. Expressió del gen DOR en múscul esquelètic de rates obeses Zucker i diabètiques ZDF. Es va purificar RNA total a partir de múscul esquelètic (gastrocnemius) de rates obeses Zucker i diabètiques ZDF. Es van aplicar 20 μ g d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de DOR es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. Es va fer anàlisi densitomètric de la senyal corresponent a DOR corregint amb la intensitat de la subunitat 28S del RNA ribosòmic. Es mostren les mitges \pm ES de quatre experiments independents, expressades com a percentatge d'expressió respecte el grup control. Les diferències són estadísticament significatives, * $P < 0,01$; ** $P < 0,005$.

V.4.2 Distribució tissular de DOR en la rata

A continuació, amb la intenció de fer una primera aproximació a la funció d'aquest gen vam voler saber quin era el seu patró d'expressió en diferents teixits de la rata. Es van fer de nou assajos de Northern Blot fent servir el mateix fragment de cDNA com a sonda marcada radioactivament que s'ha comentat en l'apartat anterior. Es va hibridar contra RNA total extret de

diversos teixits de rata: múscul esquelètic, cor, teixit adipós blanc, ronyó, cervell i fetge. Com a control de càrrega es va prendre la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosomal. El resultat es mostra en la figura 44.

Podem constatar com l'mRNA de DOR presenta una bona expressió en cor i múscul, i una expressió no tant forta en ronyó. Però també s'expressa en la resta de teixits estudiats. En tots ells s'aprecia una única banda discreta, coincident amb una mida d'uns 4,7 kb.

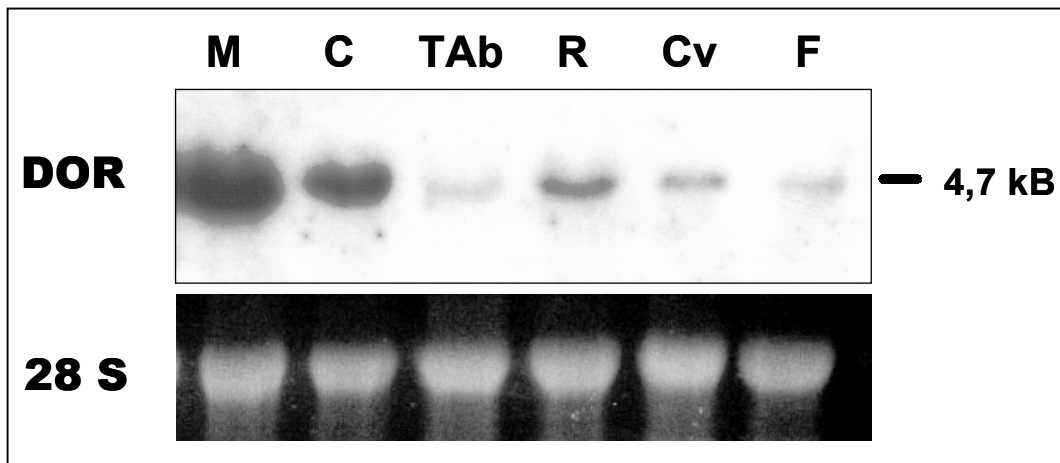


Figura 44. Expressió de DOR en diferents teixits en la rata. Es va purificar RNA total a partir de diferents teixits de rata Wistar. Es van aplicar 20 µg d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de DOR es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. M: múscul esquelètic; C: cor; TAb: teixit adipós blanc; R: ronyó; Cv: cervell; F: fetge.

V.4.3 Expressió de DOR en diferents línies cel·lulars

També vam considerar interessants, especialment de cara a futurs estudis sobre la funció d'aquest gen, estudiar quin era el seu patró d'expressió en les línies cel·lulars més habitualment utilitzades al laboratori. Per fer-ho de nou vam fer servir el fragment clonat en la hibridació

V. Resultats

sostractiva i el vam hibridar contra 20 µg d'RNA total extrets de diferents línies cel·lulars (veure "Materials i mètodes") i correguts en un gel d'agarosa. Vam fer servir per aquest experiment RNA de cèl·lules tumorals humanes HeLa, de fibroblasts de mico verd africà COS, de fibroblasts murins 10T1/2, de fibroblasts murins 3T3-L1 capaços de diferenciar a adipòcits, i de cèl·lules musculars mioblasts de rata L6E9, capaces de diferenciar a miotubs. Com a control de càrrega vam fer servir la imatge de la tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic. El resultat es presenta a la figura 45.

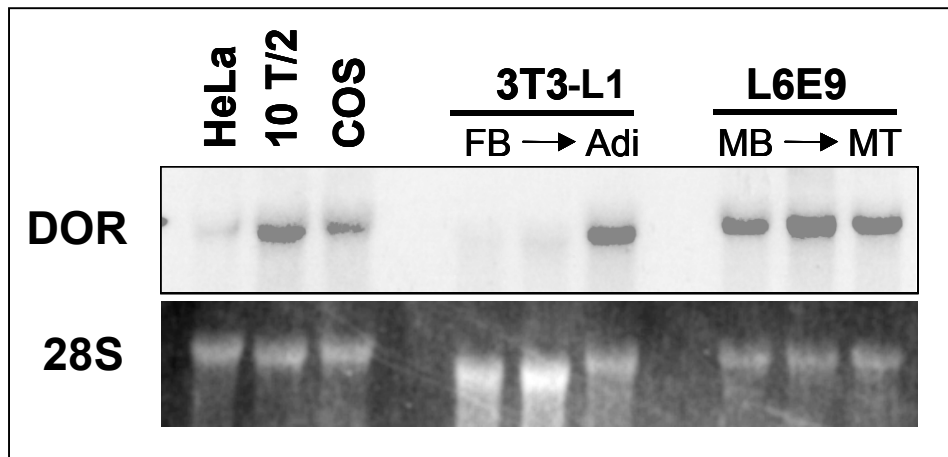


Figura 45. Expressió de DOR en diferents línies cel·lulars. Es va purificar RNA total a partir de diferents línies cel·lulars. Es van aplicar 20 µg d'RNA a cada carril d'un gel d'agarosa per anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de DOR es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La integritat del RNA i la càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la imatge de tinció de bromur d'etidi de la subunitat 28S del RNA ribosòmic en el mateix gel d'agarosa. FB: fibroblasts; Adi: adipòcits; MB: mioblasts; MT: miotubs.

Com es pot apreciar en la figura 45, DOR no s'expressa gaire en cèl·lules HeLa humanes, mentre que presenta una bona expressió en fibroblasts COS (de mico verd africà) i 10T1/2 (de ratolí). Les cèl·lules fibroblasts 10T1/2 i COS són molt similars i era esperable que el patró d'expressió de DOR fos similar en ambdues.

És destacable la inducció en l'expressió que es dona en les cèl·lules murines 3T3-L1 durant el procés de diferenciació entre l'estat fibroblàstic i l'estat adipocític. En aquest procés de diferenciació, que ocorre al deplecionar el medi de cultiu de sèrum, els fibroblasts deixen de dividir-se i s'arrodoneixen, tot acumulant grans quantitats de lípids en el seu interior, formant grans gotes de greix que ocupen gairebé tot el citosol. Com es mostra en la figura 44, DOR s'expressa en teixit adipós blanc en la rata tot i que no ho fa a un nivell molt elevat com en altres teixits.

V.4.4 Distribució tissular de DOR en humans

A continuació vam afrontar l'estudi d'expressió de DOR en humans, i el primer pas va ser determinar en quins teixits humans s'expressava DOR. Per fer-ho vam utilitzar el mateix fragment de cDNA clonat per hibridació sostractiva com a sonda, i el vam hibridar contra una membrana comercial de Clontech, que contenia 2µg d'RNA poli-A transferit a cada carril, de diferents teixits humans. Aquestes membranes són de gran qualitat per la puresa de les preparacions d'RNA que utilitzen (sense RNA ribosòmic, que representa un 75% del RNA total), per possibilitat de ser reutilitzades varies vegades amb sondes diferents, mantenint la qualitat de les hibridacions. Presentem el resultat en la figura 46. Com a control es presenta la hibridació amb una sonda contra la β -actina.

Es pot apreciar en la figura com DOR s'expressa sobretot en cervell, cor i múscul esquelètic en humans. La banda principal apareix a 4,7 kb, com ja havíem vist en la rata. Tanmateix en humans apreciem dos bandes de mida menor, especialment a cor, d'uns 1,2 kb i 2,0 kb. Aquestes bandes podrien ser inespecífiques o altres formes d'mRNA del mateix gen producte d'un "splicing" alternatiu. No es mostra en la figura 46 l'expressió en teixit adipós blanc, però

V. Resultats

Northern Blots recents fets al nostre laboratori demostren que DOR s'expressa també en aquest teixit en humans.

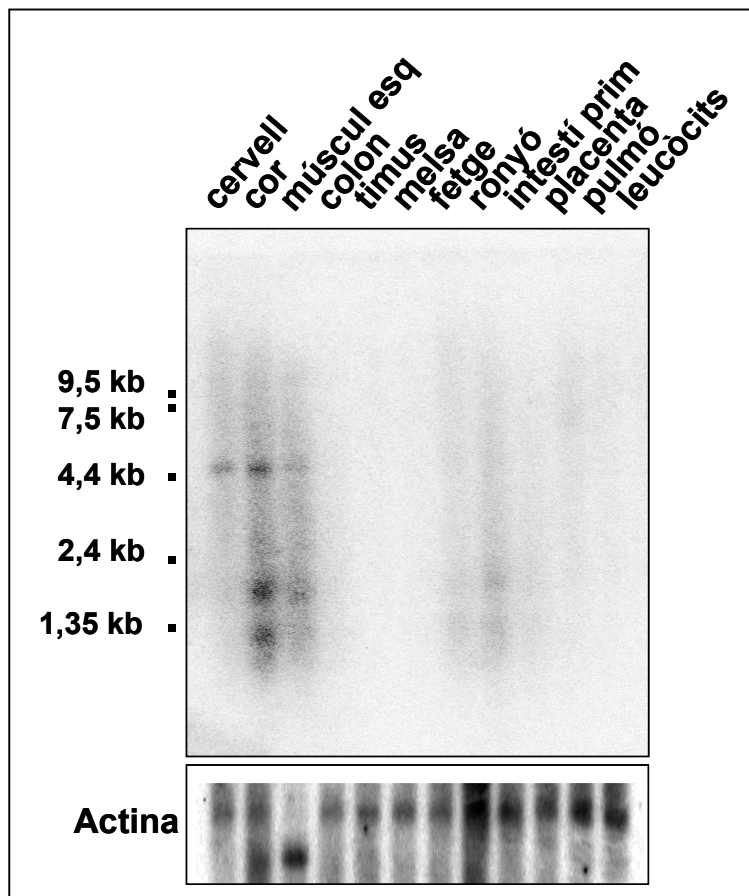


Figura 46. Expressió de DOR en diferents teixits humans. Es va utilitzar una membrana comercial (Clontech) que tenia 2 µg d'mRNA poli-A a cada carril per un anàlisi de Northern Blot. L'mRNA de DOR es va detectar després de la hibridació amb el fragment clonat per hibridació sostractiva. La càrrega en cada carril van ser comprovades a partir de la hibridació de la membrana amb una sonda contra la β -actina.

V.4.5 Expressió de DOR en la diabetis i l'obesitat humana

Un cop analitzat què passava amb l'expressió de DOR en diferents situacions de resistència a la insulina en rates, i comprovar que efectivament hi havien diferències d'expressió segons l'estat fisiològic de l'animal, vam estudiar quin era el comportament del gen en individus humans. Per fer-ho comptàvem amb les mostres de múscul esquelètic (vastus lateralis), procedents d'individus control, obesos, diabètics de tipus 2 obesos i no obesos, i diabètics de tipus 1. Les característiques d'aquests pacients ja s'han mostrat abans en les taula 1, 2 i 3, i aquí només parlarem d'allò que es refereix específicament al patró d'expressió del gen DOR en aquests pacients.

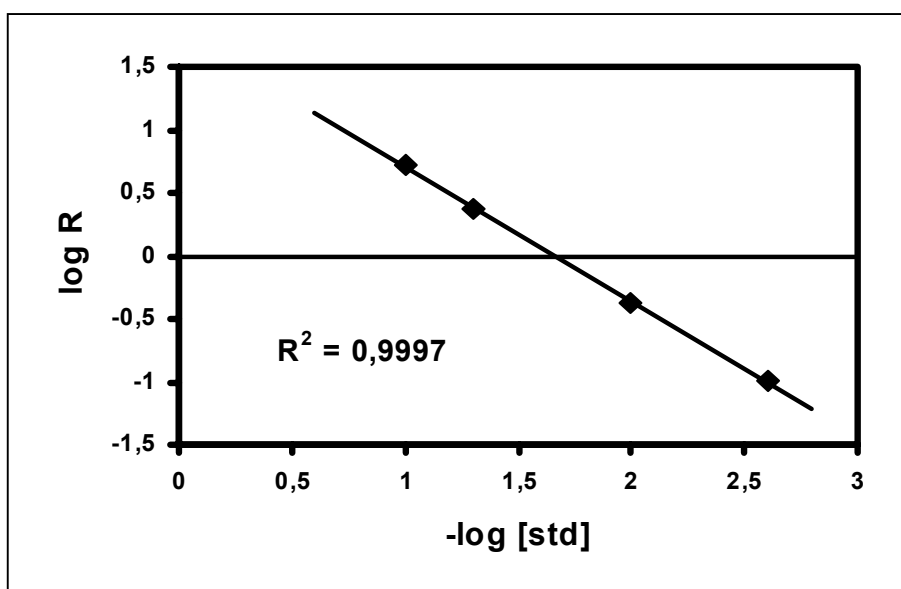


Figura 47. Experiment representatiu de PCR competitiva quantitativa per la mesura de l'expressió de DOR. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic humà (vastus lateralis), i es va sintetitzar a partir d'ell cDNA. Es va dissenyar i sintetitzar un estàndard amplificable amb el mateix parell de "primers" que DOR, però donant un producte lleugerament diferent en mida (200 pb en lloc de 300 pb), i es va coamplificar cada mostra de cDNA amb diferents concentracions d'estàndard. Es va mesurar la intensitat de les bandes amplificades per densitometria òptica o per fluorescència (veure "Materials i mètodes"). Sobre l'eix x es projecta el valor negatiu del logaritme de les concentracions d'estàndard usades (que oscil·len entre 0,001 i 1 amols/ μ l), i sobre l'eix y el logaritme d'R, essent R el quocient entre la intensitat de la banda corresponent a l'amplificació de l'estàndard i la intensitat de la banda corresponent a l'amplificació de DOR. Allà on la recta talla el punt 0 de l'eix y ($R=1$; idèntica intensitat de banda d'amplificació dels dos productes), s'extrapola la concentració d'estàndard en aquell punt. Suposant idèntica eficiència d'amplificació per DOR i per l'estàndard usat, aquesta serà la concentració de DOR en la mostra problema de cDNA. La linealitat de la mesura en aquest rang de concentracions va ser excel·lent ($r^2=0,9997$).

En tots els casos es va aplicar el mateix protocol de PCR competitiva quantitativa per mesurar els nivells d'mRNA de DOR, tal com es descriu en "Materials i mètodes". En la figura 47 es mostra un experiment representatiu amb un dels pacients que dóna una mesura de la linealitat de la tècnica en el rang de concentracions d'estàndard que es va fer servir per DOR.

V.4.5.1 Estudi de l'expressió de DOR en pacients diabètics de tipus 2 no obesos

Ja hem comentat abans la composició del grup suec (taula 3), que estava format per nou voluntaris sans i vuit voluntaris diabètics de tipus dos no obesos (amb l'excepció de dos individus). De nou, com en els apartats anteriors d'aquesta tesi, vam aprofitar l'RNA extret de les biòpsies de que disposàvem, per mesurar els nivells d'mRNA de DOR mitjançant la tècnica de PCR competitiva quantitativa. El resultat apareix en la figura 48 expressat com a percentatge d'expressió respecte el grup control.

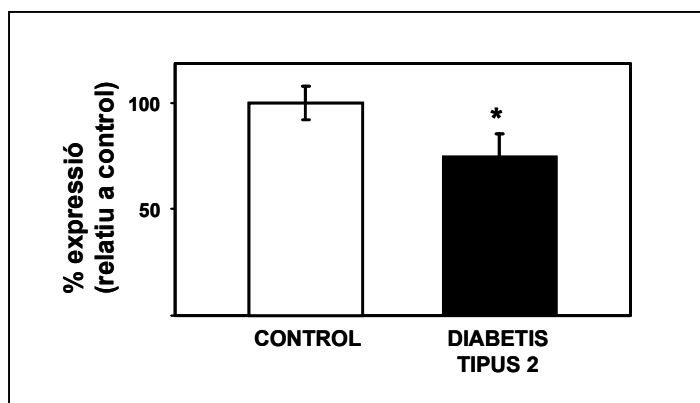


Figura 48. Expressió de DOR en pacients diabètics de tipus 2 no obesos. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 2 no obesos. L'mRNA de DOR va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES, de nou i vuit observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte al grup control. Les diferències són estadísticament significatives. * $P < 0,05$.

Com es pot apreciar en la figura l'mRNA del gen DOR està reduït en un $25\pm 13\%$ en el grup de diabètics de tipus 2, de manera estadísticament significativa ($P < 0,05$). Com hem comentat anteriorment el grup de diabètics de tipus 2 de Suècia, tot i incorporar dos individus obesos, no presenta com a grup un fenotip clarament obès. És per això que valors alts i baixos d'índex de massa corporal (BMI), quedaven repartits entre el grup control i el diabètic. Per tant, tot i que en les rates obeses Zucker l'expressió de DOR es veu poc reduïda, vam pensar que en el grup de pacients humans fóra interessant d'intentar establir correlacions amb paràmetres fisiològics, com ara el grau d'obesitat, barrejant totes les dades. En la figura 49 es mostra com hi ha una molt bona correlació negativa ($r = 0,670$) estadísticament significativa ($P < 0,005$), entre els nivells d'expressió de DOR i el grau d'obesitat dels individus suecs. De manera que nivells baixos d'mRNA de DOR s'associen a un alt grau d'obesitat en aquest grup de pacients.

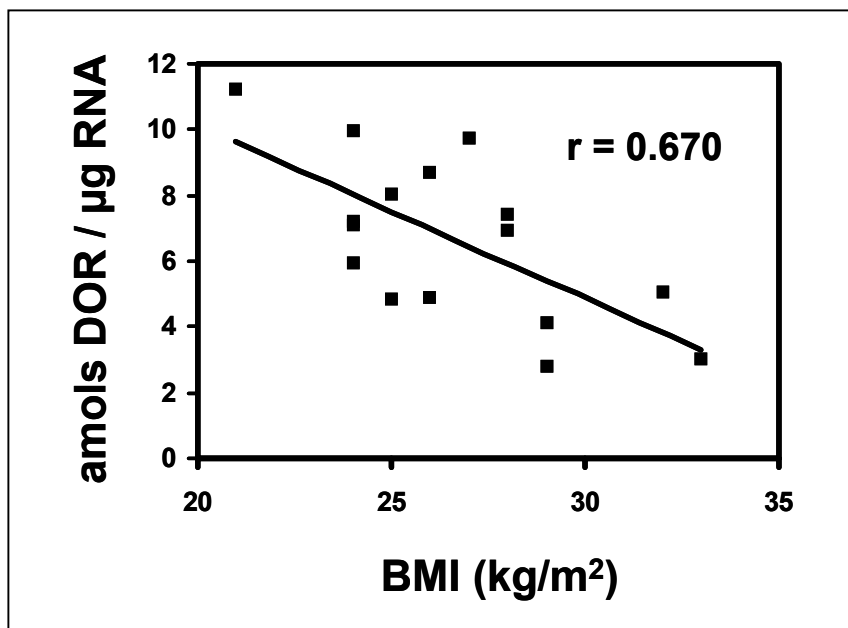


Figura 49. Correlació de l'expressió de DOR amb grau d'obesitat (BMI) en pacients control i diabètics de tipus 2 no obesos. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 2 no obesos. L'mRNA de DOR va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"), i expressat com amols d'mRNA de DOR per µg d'RNA total. Es mostra la correlació entre els nivells d'mRNA de DOR en múscul esquelètic i el grau d'obesitat (BMI) en pacients controls i diabètics de tipus 2. Les dades s'ajusten a una funció lineal de manera estadísticament significativa ($P < 0,005$) essent el coeficient de correlació $r = 0,670$.

V. Resultats

V.4.5.2 Expressió de P311 en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos

Vam estudiar l'expressió del mRNA de DOR en el grup de pacients de Lyon d'edats compreses entre 44 i 52 anys (taula 1) del que ja hem parlat en apartats anteriors, mitjançant la tècnica de PCR competitiva quantitativa, (veure "Materials i mètodes"). En el cas de DOR vam poder mesurar també els nivells d'mRNA de les biòpsies que s'havien extret després de 3 hores de "clamp" euglucèmic i hiperinsulinèmic, i per tant calibrar quin era l'efecte de la hiperinsulinèmia sobre l'expressió de DOR. Els resultats apareixen en la figura 50 expressats com a percentatge d'expressió respecte el grup control.

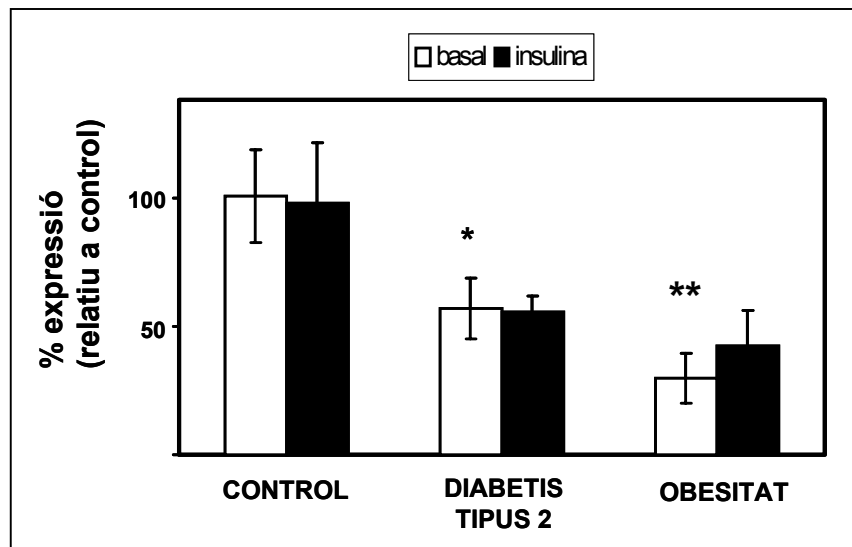


Figura 50. Expressió del mRNA de DOR en pacients obesos i pacients diabètics de tipus 2 obesos abans i després del "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic . Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls, de pacients diabètics tipus 2 obesos, i de pacients obesos no diabètics abans (basal; columnes buides) i després (insulina; columnes plenes) d'un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic en que es va infondre insulina a una taxa de 12 pmol/kg/min. L'mRNA de DOR va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES, de set, divuit, i sis observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte al grup control. * indica una diferència estadísticament significativa respecte els subjectes control, a $P < 0,05$, i per ** $P < 0,01$.

Així doncs, l'expressió del missatger de DOR està reduïda en pacients diabètics de tipus dos, en el grup de francesos adults grans, en un $44\pm 26\%$ ($P<0,05$), respecte els controls, i en els obesos està reduït en un $70\pm 25\%$ ($P<0,01$). Unes dades que corroboren la reducció d'expressió no significativa observada pels individus diabètics de tipus dos de Suècia, però que no estan d'acord amb el model d'obesitat de rata estudiat (Zucker). En cap dels grups vam veure diferències significatives d'expressió causades per l'acció de la insulina tres hores després del "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic.

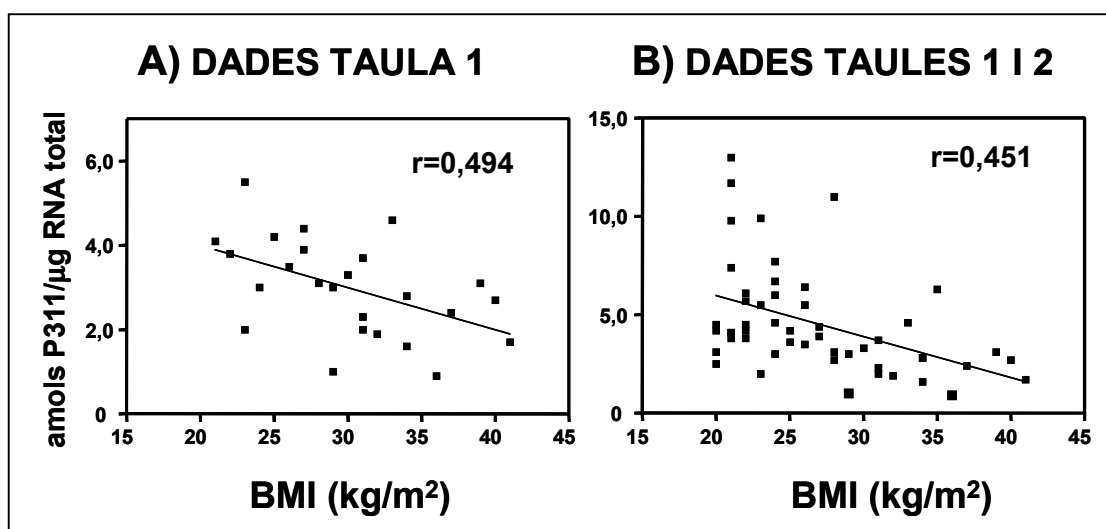


Figura 51. Correlació de l'expressió de DOR amb grau d'obesitat (BMI) en pacients procedents de Lyon (França). Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) dels pacients (veure taules 1 i 2) procedents de Lyon. L'mRNA de DOR va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"), i expressat com amols d'mRNA de DOR per μg d'RNA total. En el panell A es mostra la correlació entre els nivells d'mRNA de DOR en múscul esquelètic i el grau d'obesitat (BMI) en pacients controls, obesos i diabètics de tipus 2 (veure taula 1 per les característiques dels pacients). En el panell B s'hi han afegit les dades dels pacients control i diabètics de tipus 1 de la taula 2. Les dades s'ajusten a una funció lineal de manera estadísticament significativa essent el coeficient de correlació $r=0,494$ ($P<0,01$) en el panell A i de $r=0,451$ ($P<0,001$) en el panell B.

De manera semblant als pacients del grup suec, en els pacients de Lyon també va ser possible establir una bona correlació entre l'expressió de DOR el grau d'obesitat. La correlació negativa entre l'expressió de DOR i el grau d'obesitat es va mantenir quan consideràvem conjuntament aquestes dades ($r=0,494$; $P<0,01$), i quan afegíem les dades de la taula 2 corresponents als pacients control i diabètics de tipus 1 més joves ($r=0,051$; $P<0,001$), com es

V. Resultats

mostra en la figura 51. Així que en condicions en que el grau d'obesitat és major, l'expressió de DOR es veu més disminuïda.

V.4.5.3 Estudi de l'expressió de DOR en pacients diabètics de tipus 1.

També disposàvem de les biòpsies de múscul esquelètic (vastus lateralis) de 11 voluntaris controls joves i 8 voluntaris diabètics de tipus 1 de la mateixa edat (taula 2), abans i després del "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic. L'origen de les biòpsies i de l'RNA total purificat era el mateix que en el grup anterior, i també vam aplicar la tècnica de PCR competitiva quantitativa per mesurar els nivells d'mRNA de DOR en aquests pacients. El resultat s'expressen com a percentatge d'expressió respecte el grup control, en la figura 52.

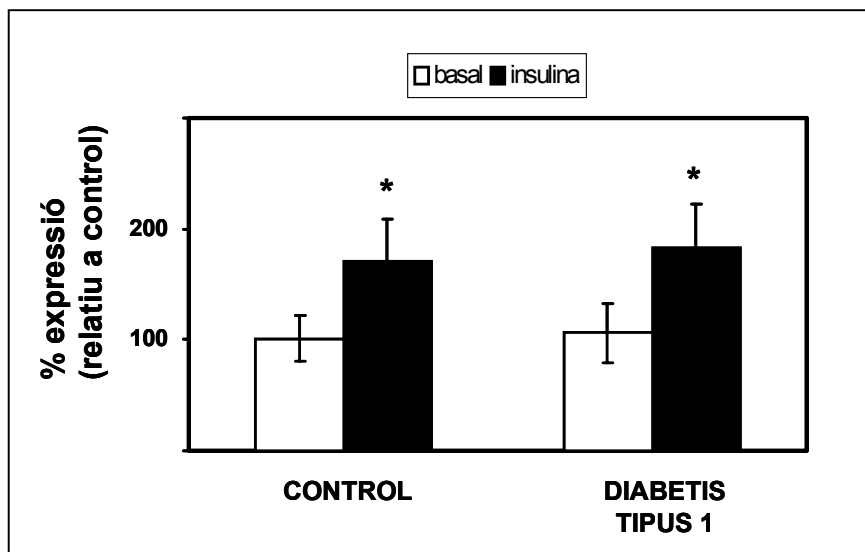


Figura 52. Expressió de DOR en pacients diabètics de tipus 1 abans i després d'un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic. Es va purificar RNA total de múscul esquelètic (vastus lateralis) de pacients controls i de pacients diabètics tipus 1 abans (basal; columnes buides) i després (insulina; columnes plenes) d'un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic en que es va infondre insulina a una taxa de 12 pmol/kg/min. L'mRNA de DOR va ser quantificat per PCR competitiva quantitativa (veure "Materials i mètodes"). Les dades són les mitges \pm ES, d'onze i vuit observacions independents, respectivament, i estan expressades com a tant per cent d'expressió respecte al grup control. * indica una diferència estadísticament significativa entre abans i després del "clamp" a $P < 0,05$.

En els pacients diabètics de tipus 1 no s'observa variació de l'expressió de DOR respecte els nivells del grup control en estat basal, a diferència del que passa durant la diabetis de tipus 2. En canvi, tant en el grup control com en el grup diabètic de tipus 1 s'observa un marcat increment en l'expressió del mRNA de DOR en resposta a la insulina, després de 3 hores de hiperinsulinèmia. L'increment és del 70 ± 26 % en el grup control i del 73 ± 25 % en el grup diabètic de tipus 1, essent les diferències estadísticament significatives en ambdós casos ($P < 0,05$).

VI Discussió

VI.1 PAPER DE MITOFUSINA-2 EN LA FISIOPATOLOGIA DE L'OBESITAT

Com hem vist en l'apartat de "Resultats", Mitofusina-2 és un gen que es troba menys expressat en múscul esquelètic d'humans obesos (un 40% respecte els individus sans; figura 13) i de rates obeses Zucker (un 44% respecte les rates control; figura 8), i es dona una bona correlació negativa entre els seus nivells d'expressió i el grau d'obesitat en humans (mesurat com a índex de massa corporal), de manera que individus amb major grau d'obesitat tenen una expressió de Mitofusina-2 menor, i a la inversa. Aquesta correlació es veu tant si analitzem les dades de pacients procedents del Karolinska Institute ($r=0,539$; $P<0,05$; veure figura 16), com si ens fixem en els pacients procedents del Centre de Recherche en Nutrition Humaine ($r=0,445$; $P<0,05$; veure figura 14). També en el cas d'aquests darrers pacients, dels quals tenim diversos subgrups (control, diabètics de tipus 1, diabètics de tipus 2 obesos, i obesos no diabètics), i de diferents edats, es manté la correlació amb el BMI tant si considerem conjuntament totes les dades com si estudiem els subgrups per separat. De manera que l'observació de que l'expressió de Mitofusina-2 es troba disminuïda quant més alt és el grau d'obesitat és ferma i consistent en humans.

Tanmateix d'aquestes dades no podem concloure que la caiguda en l'expressió de Mitofusina-2 sigui causa o efecte del fenotip obès. O si pot ser una o altra, depenent del cas. Fins aquí només tenim una observació d'associació entre els dos fenòmens. Igualment veiem en humans que nivells baixos de Mitofusina-2 s'associen de manera estadísticament significativa a resistència a la insulina (baix valor M en "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic), a elevats nivells de triglicèrids en sèrum, i a elevats nivells d'oxidació de lípids en estat basal (veure figures 14 i 16). Aquestes observacions també han estat consistents i reiterades en tots els grups de pacients estudiats. Cal dir de bon començament que totes aquestes característiques metabòliques estan molt relacionades i apareixen sempre conjuntament en els subjectes humans. Així un individu amb un elevat grau d'obesitat (alt BMI), normalment presentarà resistència a la insulina, elevats nivells de triglicèrids en sèrum i una taxa basal anormalment elevada d'oxidació lipídica, i en aquestes

VI. Discussió

condicions els pacients presenten baixos nivells d'mRNA de Mitofusina-2, com es mostra a "Resultats". Per tant el fet que Mitofusina-2 s'associï a diversos trets fenotípics que alhora estan associats entre ells no ens confirma cap relació causal de Mitofusina-2 però crida l'atenció que entre tots els paràmetres estudiats s'estableixin relacions especialment amb aquells que tenen a veure amb el metabolisme lipídic.

Els estudis amb els pacients procedents de Lyon (França), també ens han permès observar quin era l'efecte de l'administració aguda d'insulina sobre l'expressió de Mitofusina-2, mercès a les biòpsies de que disposaven i que havien estat preses abans i després de sotmetre el pacient a un "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic durant 3 hores. D'aquest estudis (figura 18) es desprèn que la regulació de Mitofusina-2 per acció de la insulina és depenent de l'edat, de manera que individus controls joves (24 ± 1 anys) presenten un increment significatiu (un 22 %) de l'expressió en resposta a la insulina, mentre que individus control més grans (52 ± 2 anys) veuen reduïda l'expressió de Mitofusina-2 per acció de la insulina (un 36%). No es fàcil explicar aquesta diferència en la regulació de Mitofusina-2 per acció de l'edat. Potser la clau està en la funció de Mitofusina-2 com a proteïna associada a la despesa energètica basal, aspecte del qual en parlarem àmpliament més endavant. Però avançarem en aquest punt que potser un més alt nivell de Mitofusina-2 provoca una major oxidació de substrats per un increment en la termogènesi. Si això fos cert, en estat postpandrial (després del "clamp"), la insulina provocaria un increment de l'expressió de Mitofusina-2 en aquells individus més sensibles a la insulina, i que per tant captaran unes elevades quantitats de glucosa en múscul. Un increment en la termogènesi per causa d'uns nivells elevats de Mitofusina-2, ajudaria a oxidar l'excés de glucosa incorporada un cop saturada la via de síntesi de glucògen. En els individus control més grans, i no tant sensibles a la insulina, la incorporació de glucosa durant el "clamp" no seria tant alta i convindria mantenir una termogènesi baixa per tal de garantir la màxima acumulació de substrats. Això explicaria la correlació estadísticament significativa ($r=0,684$; $P<0,05$) que també s'aprecia entre el nivell de sensibilitat a insulina i el sentit de la regulació de Mitofusina-2 per insulina (inducció de l'expressió en casos de gran sensibilitat a la insulina o inhibició en casos de baixa sensibilitat). En qualsevol cas és evident

que Mitofusina-2 es regula per acció de la insulina i que en els individus que presenten resistència a la insulina (obesos i diabètics de tipus dos obesos) això no passa. Però a part d'aquesta observació, també és destacable que la regulació de Mitofusina-2 en resposta a insulina, correlaciona especialment bé ($P < 0,001$, veure figura 19 i apartat V.2.7) amb paràmetres que de nou tenen a veure amb el metabolisme lipídic, com són els nivells d'àcids grassos lliures ($r=0,772$) i els nivells de glicerol ($r=0,783$) i la taxa basal d'oxidació de lípids ($r=0,622$). De nou entre tots els paràmetres fisiològics, són els relacionats amb lípids els que millor correlacionen amb l'expressió de Mitofusina-2 en múscul de pacients. En el futur, doncs, serà d'interès l'estudi del promotor de Mitofusina-2, tot cercant elements que puguin ser susceptibles de dirigir la regulació de l'expressió per acció de la insulina o bé en resposta a canvis en el metabolisme lipídic.

Per estudiar la funció de la proteïna la primera eina que ens va ajudar va ser la comparació de les seqüències de Mitofusina-2 en diferents espècies i amb la proteïna FZO (figura 23). FZO ja es coneixia en *D. melanogaster* i en *S. cerevisiae* per ser una proteïna de membrana mitocondrial externa implicada en la fusió de mitocòndries (Hales and Fuller, 1997; Rapaport *et al.*, 1998). De l'estudi de la seva seqüència i dels resultats posteriors obtinguts ja podem proposar que Mitofusina-2 s'ancora a la membrana mitocondrial mitjançant el seu domini hidrofòbic situat a C-terminal, de manera similar a FZO. Aquest llarg domini hidrofòbic, amb una zona polar al mig, ben bé podria travessar les dues membranes mitocondrials o bé podria travessar dues vegades la membrana mitocondrial externa, deixant la petita zona polar en l'espai intermembrana. L'anàlisi de la seva seqüència també permet predir que Mitofusina-2 unirà GTP i tindrà activitat GTPasa, i que probablement serà aquesta la via per la qual s'alliberarà energia que donarà lloc a canvis conformacionals en la proteïna, com passa amb multitud de proteïnes amb activitat GTPasa. Mitofusina-2 presenta els cinc motius G1-G5 que conformen típicament el domini GTPasa (Sprang, 1997). G1, G2 i G3 estan implicats en la interacció amb els tres fosfats de la molècula de GTP i conformen el lloc catalític, que és comú a dominis GTPasa i ATPasa; els motius G4 i G5 són específics de la unió a GTP, i per impediments estèrics impedeixen l'acomodament d'una molècula d'ATP. A part del domini transmembrana i del domini GTPasa, en la seqüència de Mitofusina-2

VI. Discussió

apareixen altres regions, com la regió rica en prolines, adjacent al segment transmembrana, o les regions "coiled coil" susceptibles d'unir altres proteïnes. Regions riques en prolines amb la repetició del motiu PXX s'ha descrit que estan involucrades en la interacció proteïna-proteïna (Kay *et al.*, 2000). Les dues regions "coiled coil" que apareixen a Mitofusina-2 poden interaccionar entre sí, si es donés el cas de que els dos extrems de Mitofusina-2 s'orientessin cap al citosol. Si és només l'extrem N-terminal el que està al citosol, Mitofusina-2 podria unir-se per aquesta regió a una altra proteïna Mitofusina-2 o diferent, formant la doble hèlix alfa típica dels dominis "coiled coil", mentre que l'extrem C-terminal que quedaria a l'espai intermembrana podria estar interaccionant amb alguna altra proteïna, mitjançant la seva regió "coiled coil". Sigui com sigui si Mitofusina-2 està implicada en la fusió de mitocòndries o en la seva interacció, probablement estarà actuant amb altres proteïnes, i la unió i la hidròlisi de GTP pot subministrar l'energia necessària perquè es produeixin canvis de conformació o altres esdeveniments necessaris per a la funció de Mitofusina-2. En el cas de FZO en *D. melanogaster* i de *S. cerevisiae* la funcionalitat del domini GTPasa és necessària per mantenir la funció de la proteïna (Hales and Fuller, 1997; Hermann *et al.*, 1998), i el mateix s'ha demostrat en el cas de Mitofusina-2 humana (Santel and Fuller, 2001). Molts són els exemples de proteïnes que utilitzen l'energia alliberada de la hidròlisi del GTP que uneixen, per dur a terme la seva activitat. Algunes d'elles, com la Dnm-1, s'han implicat en la fissió de mitocòndries (Bleazard *et al.*, 1999). Potser Mitofusina-2 s'uneix a una altra proteïna Mitofusina-2 d'una mitocòndria veïna, o a proteïnes intermediàries, i mitjançant la hidròlisi de GTP força l'acostament o la fusió de les membranes mitocondrials externes, per iniciar un procés de contacte o fusió mitocondrial.

En qualsevol cas Mitofusina-2 es localitza en mitocòndria (figura 24), i les mitocòndries, en molts teixits, com el cor i el múscul esquelètic, així com en diverses línies cel·lulars (10T1/2, COS, 3T3-L1, L6E9...) s'organitzen formant una intricada xarxa que s'estén per tot el citosol. Com es mostra en "Resultats" (figura 26) la sobreexpressió de Mitofusina-2 en cèl·lules 10T1/2 provoca un col·lapse de la xarxa mitocondrial en regions perinuclears, que vist al microscopi confocal de fluorescència semblen com dos o tres mitocòndries gegants al voltant del nucli. Lluny d'això, quan

s'observen les mateixes preparacions al microscopi electrònic de transmissió es confirma que no hi ha hagut fusió de mitocòndries i que els "clusters" observats al microscopi de fluorescència no corresponen a mitocòndries "gegants" (figura 27), sinó que són conglomerats de mitocòndries unides entre si, però que conserven una mida i una ultraestructura idèntica a les mitocòndries observades a les cèl·lules no transfectades, o transfectades amb un plàsmid buit. Això no descarta en absolut que Mitofusina-2 estigui implicat en la fusió de mitocòndries, però sí que sigui l'única proteïna responsable. S'ha observat que en punts d'interacció entre dos mitocòndries apareixen punts d'alta densitat electrònica observables al microscopi electrònic que podrien correspondre a grans complexos proteics (Bakeeva *et al.*, 1983; Amchenkova *et al.*, 1988), FZO a *S. cerevisiae* es troba formant part d'un complex proteic d'uns 800 kDa (Rapaport *et al.*, 1998) i cal pensar que realment per arribar a completar un procés com el de fusió de dues mitocòndries (on entren en joc quatre membranes), caldrà la intervenció de diverses proteïnes. És per això que difícilment la sobreexpressió d'una d'elles podrà conduir a l'observació en massa de tot el procés, però el que ens diuen els experiments de sobreexpressió de Mitofusina-2 és que incrementant el nombre de molècules de Mitofusina-2 a la mitocòndria n'hi ha prou per incrementar el nombre d'interaccions entre mitocòndries.

No oblidem que Mitofusina-2 no és l'homòloga humana de FZO, que seria Mitofusina-1, i per tant no hem de pensar que la funció de Mitofusina-2 estarà forçosament relacionada directament amb la fusió o interacció de mitocòndries. No podem descartar que Mitofusina-2 per exemple, no estigui permetent la interacció de les mitocòndries a elements del citoesquelet o a proteïnes que es mouen sobre el citoesquelet per garantir la correcta organització dels orgànuls, com les quinesines. En aquest sentit els efectes de la sobreexpressió de Mitofusina-2 sobre la xarxa mitocondrial es podrien explicar sobre la base d'un exagerat moviment retrògrad de les mitocòndries cap a nucli. De fet, un patró similar al de la sobreexpressió de Mitofusina-2 s'observa amb el "knock-out" cel·lular de la cadena pesada de la quinesina KIF5B, que uneix les mitocòndries al citoesquelet permeten el seu moviment anterògrad cap a la perifèria (Tanaka *et al.*, 1998). Quan aquesta proteïna no hi és, les mitocòndries realitzen només moviment retrògrad i es concentren en

VI. Discussió

regions perinuclears. A la inversa, si Mitofusina-2 estigués implicada en el moviment retrògrad de les mitocòndries, la seva sobreexpressió també les concentraria al voltant del nucli. Però un model com aquest no explicaria bé els resultats obtinguts amb els clons "antisense". Aquestes cèl·lules en que l'expressió de Mitofusina-2 està reduïda per transfecció estable d'un constructe "antisense", recuperen pitjor la xarxa mitocondrial després d'un xoc osmòtic (figura 29), i no estableixen interaccions entre mitocòndries per formar els túbuls mitocondrials a la mateixa velocitat que les cèl·lules que expressen Mitofusina-2 de manera normal. La hipòtesi de que Mitofusina-2 propicia el moviment retrògrad de les mitocòndries mitjançant la unió a elements del citoesquelet no explica perquè en les cèl·lules "antisense" hi ha una distribució homogènia de les mitocòndries pel citosol, però sense formar els túbuls mitocondrials. Aquesta observació, junt amb les observacions de l'efecte de sobreexpressió de Mitofusina-2 apunten a que Mitofusina-2 està implicada en l'establiment de la xarxa mitocondrial típica de les cèl·lules 10T1/2 i de molts altres teixits, afavorint les interaccions mitocòndria-mitocòndria.

Segons Vladimir Skulachev, l'investigador que més ha estudiat l'organització de les mitocòndries en forma de xarxa, aquesta estructura permet optimitzar i donar velocitat a l'aprofitament dels substrats, especialment en teixits de metabolisme molt elevat i on l'accessibilitat del substrat podria comprometre la generació de treball, com en el cas de la fibra muscular. Segons Skulachev (Skulachev, 1990), l'existència de llargs filaments mitocondrials que connecten la perifèria de la fibra muscular amb l'interior, permet que el potencial de membrana generat per l'oxidació de substrats en la perifèria sigui immediatament transmès al llarg de tota la xarxa mitocondrial, per poder servir a la síntesi d'ATP allà on calgui. Així doncs, els filaments que conformen la xarxa mitocondrial actuarien com a "cables transmissors" de potencial de membrana mitocondrial per a tot el citosol, fins i tot allà on l'oxidació de substrats no es pot donar a la mateixa velocitat per la seva inaccessibilitat, donat que la transmissió del potencial al llarg de la membrana és pràcticament immediata, mentre que la difusió de metabòlits pel citosol seria molt més lenta. Si això és així, l'existència d'aquesta xarxa mitocondrial permetrà una velocitat de consum de substrats més elevada, en els casos en que aquesta sigui necessària, com per exemple durant

l'exercici. Efectivament s'ha observat com la xarxa mitocondrial en múscul es desenvolupa en resposta a l'exercici (Skulachev, 1990). A la inversa, una menor capacitat de generar aquesta xarxa mitocondrial, (per exemple per una deficiència en l'expressió de Mitofusina-2), podria conduir a una menor capacitat metabòlica, i per què no, a una menor taxa metabòlica basal. Sabut és que aquest és un fet desencadenant d'obesitat, (Ravussin *et al.*, 1988; Ravussin and Gaultier, 1999; Seidell *et al.*, 1992).

Sigui com sigui, en les rates obeses Zucker, que presenten una reduïda taxa metabòlica basal (Keeseey and Corbett, 1990; Moore, 1985) i una reduïda expressió de Mitofusina-2, els estudis estereològics realitzats durant aquesta tesi demostren que la morfologia de les mitocòndries no és igual que en les rates control (figura 25). Es van escollir aquesta mena d'estudis sobre imatges de microscopia electrònica perquè havien demostrat la seva utilitat per quantificar amb fiabilitat estadística canvis en la morfologia d'objectes tridimensionals sense forma determinada, a partir d'imatges en dos dimensions (Baddeley *et al.*, 1983). Els resultats demostren que sense haver canvis en el volum total de mitocòndries en els músculs de rates control i obeses, sí que hi ha un increment del 32% en la superfície de la membrana mitocondrial externa en les rates obeses, la qual cosa s'explica per una organització mitocondrial més "atomitzada", amb més mitocòndries, més petites, i suggerint un menor grau de fusió en forma de reticle mitocondrial.

Les evidències experimentals apunten, d'una banda, que la proteïna Mitofusina-2 juga un paper en la generació i l'establiment de la xarxa mitocondrial en cèl·lules 10T1/2 i múscul; i de l'altra, ens parlen de l'associació de nivells baixos d'mRNA de Mitofusina-2 amb l'obesitat, la resistència a la insulina, i la dislipidèmia (elevats nivells de triglicèrids, anormalment elevada taxa d'oxidació de lípids...). Fins aquí manca encara el lligam que relacioni la biologia molecular de Mitofusina-2 amb el metabolisme. Per trobar-ho vam generar les línies "antisense", que expressen de manera estable Mitofusina-2 (tant cDNA com proteïna) a nivells reduïts. Alguns dels resultats amb aquestes línies cel·lulars ja els hem comentat abans i tenen a veure amb la reduïda capacitat de regenerar la xarxa mitocondrial després de destruir-la mitjançant un xoc osmòtic (figura 29).

VI. Discussió

Però no menys interessant és el particular metabolisme d'aquestes cèl·lules. Malgrat créixer i duplicar-se a la mateixa velocitat que les cèl·lules normals, oxiden menys de la meitat de glucosa, essent aquest l'únic substrat present en el medi (figura 30). Quan vam estudiar la velocitat de consum d'oxigen aquesta era un 30 % menor que en les cèl·lules control, i especialment revelador va ser el fet que aquestes cèl·lules mostraven un consum d'oxigen lligat a respiració desacoblada ("proton leak"), d'un 50% respecte les cèl·lules control (figura 31). Ja hem vist a la "Introducció" com la respiració desacoblada (que condueix a termogènesi) és la principal variable en la despesa metabòlica basal total, i que representa un 20% del consum d'oxigen total en mamífers (Rolfe and Brand, 1996; Rolfe *et al.*, 1999). Diversos estudis han descrit que una disminuïda taxa metabòlica basal condueix a obesitat (Ravussin *et al.*, 1988; Seidell *et al.*, 1992, Ravussin and Gautier, 1999), i per això se cerquen els determinants moleculars de la despesa energètica. Fins ara només la proteïna UCP-1 ha estat implicada directament en l'increment de la termogènesi mitjançant la dissipació del gradient de protons a través de la membrana mitocondrial interna, mentre que les proteïnes homòlogues UCP-2 i UCP-3 són objecte de múltiples investigacions per determinar el possible mecanisme regulador sobre la taxa de respiració desacoblada. UCP-1 s'expressa a teixit adipós marró, que és el principal termorregulador en rosegadors, però la importància d'aquest teixit en mamífers més grans, com l'home, és molt reduïda, i cal pensar en mecanismes al múscul esquelètic que regulin la despesa energètica basal. Com hem comentat en la "Introducció" aquests mecanismes poden tenir a veure amb proteïnes desacobladores tipus UCP-2 o UCP-3, o bé amb altres mecanismes que modifiquin la velocitat de la cadena respiratòria o les propietats intrínseques de la membrana mitocondrial interna.

En les cèl·lules "antisense", que expressen menys Mitofusina-2, es dona una reducció del consum d'oxigen total com a conseqüència d'una reducció important del "proton leak" (respiració desacoblada). En paral·lel, estudis recents en el nostre laboratori, duts a terme per Francesc X. Soriano, demostren que quan sotmetem rates normals al fred o a agonistes β -adrenèrgics, condicions en que es dona un increment en la termogènesi (respiració desacoblada), s'observa un increment en l'expressió de Mitofusina-2 en múscul esquelètic. En conjunt aquestes dades

suggereixen que l'expressió de Mitofusina-2 està íntimament lligada a la regulació de la respiració desacoblada, de manera que nivells baixos de Mitofusina-2 provoquen una disminució en la respiració desacoblada (en el "proton leak"), mentre que nivells alts de Mitofusina-2 s'associen a una elevada taxa de respiració desacoblada (o termogènesi).

En resum, dels resultats obtinguts dels estudis de Mitofusina-2 s'en deriven tres conclusions. (1) Que baixos nivells d'mRNA de Mitofusina-2 s'associen a obesitat, resistència a la insulina i dislipidèmia. (2) Que Mitofusina-2 està implicat en l'establiment de la xarxa mitocondrial, afavorint les interaccions mitocòndria-mitocòndria. (3) Que Mitofusina-2 és important en la regulació de la termogènesi, de manera que una disminució de l'expressió de Mitofusina-2 provoca una davallada en els nivells de respiració desacoblada, de consum d'oxigen total, de consum de substrats i per tant, de la despesa energètica basal.

Aquestes troballes apunten a que Mitofusina-2 és capaç de regular la termogènesi, i per tant la taxa metabòlica basal, modulant la morfologia de la xarxa mitocondrial. Això suposa un mecanisme totalment nou en la regulació de la despesa energètica, que com sabem té un paper central en la fisiopatologia de l'obesitat.

S'ha postulat que la manca d'una adequada xarxa mitocondrial pot limitar la velocitat d'oxidació de substrats (Skulachev, 1990) i que una baixa taxa metabòlica basal condueix a obesitat (Ravussin *et al.*, 1988; Seidell *et al.*, 1992; Ravussin and Gautier, 1999). Per tant podem proposar que si un individu expressa Mitofusina-2 a nivells anormalment baixos, veurà compromesa la seva capacitat de generar una extensa xarxa mitocondrial en múscul esquelètic; veurà reduïda la seva taxa metabòlica basal per una reduïda termogènesi (baixos nivells de Mitofusina-2 comporten un reduït "proton leak" o respiració desacoblada); i tindrà una major probabilitat de desenvolupar obesitat per acumulació de l'excedent de substrats no oxidats.

VI. Discussió

Les causes d'una menor expressió de Mitofusina-2 o d'una menor funció de la proteïna poden ser múltiples, però una d'elles és la possible existència de mutacions en el gen, sigui en el promotor que dirigeix la seva expressió, en zones del missatger no traduïdes que puguin afectar l'estabilitat d'aquest, o en zona codificant que pugui afectar la seqüència de la proteïna. En qualsevol cas, si la relació de causalitat que hem suggerit abans és certa, el gen Mitofusina-2 s'hauria de localitzar en algun locus genòmic susceptible de ser responsable d'obesitat, si més no en una certa proporció de casos. Efectivament això és així, i el locus genòmic de Mitofusina-2, en la regió 1p36.2 o polimorfismes de gens a prop d'aquests locus han estat associats en diversos estudis amb un elevat grau d'obesitat o amb altres trets fenotípics relacionats (Brockman *et al.*, 1998; West *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1991; Stern *et al.*, 1986).

Els resultats sobre Mitofusina-2 presentats en aquesta tesi, i altres dades que anem coneixent sobre aquest gen, ens indiquen que estem davant d'un nou gen d'obesitat, i ens aporten llum sobre nous mecanismes que poden ser importants en el desenvolupament d'aquesta malaltia. Des d'un punt de vista estrictament científic, el paper de Mitofusina-2 en l'establiment de la xarxa mitocondrial, i la possible implicació en un nou mecanisme de termogènesi, ja és interessant per si mateix. Però la possible implicació de Mitofusina-2 en la fisiopatologia de l'obesitat, atesa la importància creixent d'aquesta malaltia, fa que l'estudi d'aquest gen sigui de gran interès.

VI.2 EXPRESSIÓ DE P311/PTZ-17 EN ENVELLIMENT, OBESITAT I DIABETIS

P311 és un gen que va ser identificat per Studler *et al.* (1993) i que s'expressa a alts nivells durant la migració neuronal típica del desenvolupament embrionari de ratolí. En període postnatal es continua expressant en bulb olfatori, cerebel i hipocamp, que són àrees de neurogènesi i d'intensa plasticitat sinàptica. Dos anys més tard Kajiwara *et al.* (1995,1997), van veure com la seva expressió disminuïa en còrtex cerebral en resposta al pentineletetrazol injectat intraperitonealment, un fàrmac que provoca episodis epilèptics en ratolí. Aquesta observació la van repetir *in vitro* administrant pentineletetrazol a cultius primaris neuronals. En el seu treball mostren com la injecció del mRNA de P311 en oòcits de *X. laevis* provoca una entrada de calci extracel·lular al citosol, i el conseqüent increment de les concentracions de calci intracel·lular, fet que se sap relacionat amb la resposta a pentilenetetrazol (Sugaya and Onozuka, 1978a,b). En un procés a la inversa, Roshier *et al.* (1998), van descriure com en cultius neuronals la deprivació de potassi en el medi extracel·lular conduïa a una davallada de les concentracions de calci intracel·lulars i a apoptosi associades a un increment en els nivells d'mRNA de P311. Fins aquí sembla que variacions en l'expressió de P311 s'associen a variacions en les concentracions de calci intracel·lulars en cèl·lules neuronals, però més recentment diversos estudis han aportat dades a favor d'altres possibles funcions. Per exemple, Taylor *et al.* (2000) han transformat cèl·lules neuronals i de múscul llis mitjançant cotransfecció del receptor Met i el seu lligand HGF/SF ("hepatocyte growth factor/scatter factor"), com a model de carcinogènesi *in vitro*. En aquestes condicions s'observa una davallada considerable en l'expressió del mRNA de P311. Han vist que la proteïna codificada pel cDNA de P311 transfectat en aquestes cèl·lules, d'uns 8 kDa, té una vida mitja molt curta (5 min), i han estat capaços de detectar la proteïna endògena per immunocitoquímica en nucleols i plaques d'adhesió focal d'astròcits humans, implicant P311 en la mobilitat cel·lular. En la mateixa línia Mariani *et al.* (2001), han descrit recentment com P311

VI. Discussió

s'expressa en les cèl·lules invasives de glioblastoma, mentre que no ho fa en les cèl·lules no invasives del nucli del tumor. En cultius de cèl·lules de glioma han observat que la inhibició de l'expressió de P311 mitjançant oligonucleòtids "antisense" provoca una disminució en la taxa de migració d'aquestes cèl·lules, i a la inversa, que cèl·lules activades per migrar incrementen l'expressió de P311. Però en cèl·lules de glioma, a diferència dels astròcits estudiats per Taylor *et al.* (2000), la proteïna P311 no es troba en nucli ni en plaques d'adhesió focal, sinó formant un patró de punts discrets en citoplasma al voltant del nucli.

Del repàs a la bibliografia publicada sobre P311 s'en desprenen diverses conclusions. Per una part sembla ser important en la funció neuronal, associat a l'homeostasi del calci, i potser en processos de control de cicle cel·lular. D'altra banda sembla ser important en la mobilitat cel·lular, tant de cèl·lules normals, com de cèl·lules transformades.

Nosaltres hem trobat que l'mRNA de P311 redueix la seva expressió durant l'envelliment en cor (un 76% de reducció) i en múscul esquelètic de rata (un 50% de reducció; veure figura 34). També hem vist que P311 es redueix un 66% (veure figura 35) en múscul esquelètic en la diabetis de tipus 2 associada a obesitat, en les rates ZDF. Les rates ZDF són obeses i resistents a la insulina per una mutació en el gen del receptor de la leptina, i en afegit, una fallada en la cèl·lula beta condueix a diabetis. També hem observat que l'mRNA de P311 s'expressa en tots els teixits, però de manera especialment intensa a múscul esquelètic i cor (figura 36).

La seqüència del mRNA de P311, de 2,2 kb (figura 33), presenta una petita ORF que codifica per una proteïna de 68 aminoàcids, (probablement la proteïna de 8 kDa detectada per Taylor *et al.* (2000)). Aquesta proteïna no presenta cap domini conegut ni s'assembla a cap altra proteïna coneguda. Tan sols una repetició de quatre aminoàcids es presenta com quelcom digne de menció.

A part de les dades fins ara esmentades, ens interessa l'estudi d'aquest gen perquè la seva expressió s'ha vist reduïda en múscul esquelètic de pacients diabètics de tipus 2, tant obesos (28% de reducció respecte el grup control; figura 40) com no obesos (43% de reducció; figura 38). Aquestes dades són consistents amb els estudis duts a terme amb rates diabètiques i apunten a que P311 deu jugar algun paper en l'especial metabolisme que es dona en el múscul esquelètic en aquest pacients. En aquest sentit cal destacar que la reducció observada en els nivells d'mRNA de P311 en pacients obesos (un 37%; tot i no ser estadísticament significativa, figura 40) és semblant a la dels pacients diabètics tipus 2, quan comparem respecte el grup control. Per contra, hi ha un increment notable (del 73%; figura 42) de l'expressió de P311 en individus diabètics de tipus 1. En el grup de pacients procedents de Suècia es va observar una correlació directa entre l'expressió de P311 en múscul i la sensibilitat a insulina ($r=0,656$, figura 39), però això no es va reproduir amb els pacients procedents de França. En canvi en aquests pacients vàrem observar una correlació negativa entre l'expressió de P311 i la taxa d'oxidació de lípid durant el "clamp" euglucèmic hiperinsulinèmic ($r=0,495$, figura 41). Aquesta és una magnitud que d'alguna manera té a veure amb la sensibilitat a insulina, mesurada com a valor M. Aquest és la quantitat de glucosa absorbida pel pacient durant el "clamp", i és inversament proporcional a la taxa d'oxidació de lípids, ja que, en condicions de hiperinsulinèmia, s'incrementa la taxa d'oxidació de glucosa al mateix temps que s'inhibeix l'oxidació lipídica. Malauradament no disposàvem d'aquesta dada per als pacients procedents de Suècia, però el fet que en els pacients de França la correlació sigui amb la taxa d'oxidació de lípids però no amb el valor M o amb la taxa d'oxidació de glucosa, ens indica que la correlació amb valor M (sensibilitat a insulina), detectada en el grup de pacients de Suècia, deu ser secundària a algun altre aspecte associat a P311 que desconeixem.

L'expressió de P311 la trobem disminuïda en obesitat, diabetis de tipus 2 i envelliment. Què tenen en comú les possibles funcions de P311 i aquestes condicions fisiològiques? En els tres casos es dona resistència a la insulina. Està ben documentat que la regulació de les concentracions de calci intracel·lular juga un paper en la mediació de l'acció de la insulina. Així s'ha demostrat que un determinat rang de concentracions de calci intracel·lular és determinant per una

VI. Discussió

màxima resposta a la insulina (Draznin *et al.*, 1987), i que bloquejant l'entrada de calci en obesos s'incrementa la seva sensibilitat a insulina (Byyny *et al.*, 1992). Les concentracions de calci intracel·lular en múscul esquelètic correlacionen positivament amb el grau d'obesitat (Zemel *et al.*, 1995) de manera que en individus obesos són anormalment elevades (Resnick *et al.*, 1991). En aquestes condicions veiem una disminuïda expressió de P311, que se sap regula l'entrada de calci al citosol en experiments en oòcits de *X. laevis* (Kajiwara *et al.* 1995, 1997).

P311 no seria el primer cas d'un gen implicat en la regulació de les concentracions de calci intracel·lular, que juga un paper important en la fisiopatologia de l'obesitat i de la resistència a la insulina. Certes mutacions dominants del gen *agouti* provoquen obesitat i resistència a la insulina en ratolins associada a elevades concentracions de calci intracel·lular en múscul. Aquest gen codifica per una petita proteïna que és secretada (131 aminoàcids) i que en afegir-la en el medi de cultiu de les cèl·lules musculars L6E9 provoca un marcat increment de la concentració de calci intracel·lular (Zemel *et al.*, 1995)

Altres patologies de les quals l'obesitat, la diabetis i l'envelliment són factors de risc també tenen a veure amb anormalitats en l'homeostasi del calci, com ara la disfunció cardíaca (Dhalla *et al.*, 1993). És per tant possible que canvis en l'expressió de gens comuns a les tres condicions fisiològiques citades, i que tinguin a veure amb els moviments de calci, estiguin implicats en la disfunció cardíaca. No hem d'oblidar que P311 s'expressa de manera molt intensa en múscul cardíac i que la seva expressió en aquest teixit decau dràsticament (un 76%) durant l'envelliment.

Les darreres publicacions insisteixen en la importància de P311 en la motilitat cel·lular, però és difícil establir quina relació pot haver entre aquestes dades i l'elevada expressió de P311 en teixits rics en cèl·lules postmitòtiques com múscul i cor. En qualsevol cas les dades disperses i aparentment inconnexes de que disposem fins ara, junt amb el que aporta la bibliografia, no ens permeten formular hipòtesis consistents, i caldrà abordar properament estudis dirigits a determinar quin paper juga P311 en la fisiopatologia de l'obesitat i la diabetis de tipus 2. Per fer-ho, al

laboratori comptem amb un anticòs el qual ens està servint com a eina d'estudi i treballem amb transfeccions transitòries de la proteïna en cultius cel·lulars, per tal de saber més sobre la seva funció. Esperem que l'estudi de la biologia cel·lular d'aquesta proteïna ens permeti discernir quin pot ser el seu paper, i si s'escau, quina importància té en la regulació del metabolisme.

VI.3 EXPRESSIÓ DE DOR EN OBESITAT, DIABETIS I RESPOSTA A INSULINA

Amb aquest, hem identificat un gen nou, que no apareixia a les bases de dades i que hem batejat com a DOR ("Diabetes and Obesity Regulated").

DOR mostra una expressió reduïda en les rates obeses (20% menys que en les rates control) i diabètiques ZDF (77% de reducció, figura 43). També en pacients obesos i en pacients diabètics de tipus 2 s'observa una reduïda expressió del mRNA (70% de reducció en el grup obès i 44% en el grup diabètic de tipus 2 respecte el grup control; figura 50), associada al grau d'obesitat, amb una correlació negativa dels seus nivells d'expressió amb l'índex de massa corporal ($r=0,494$, figura 51). En els dos grups de diabètics de tipus 2 estudiats s'han repetit les mateixes observacions (veure també figures 48 i 49). De manera que queda ben establert que nivells baixos de DOR s'associen a un major grau d'obesitat, essent l'expressió en obesos menor que en diabètics de tipus 2, i en aquest grup menor que en els individus control. Això és només una observació d'associació, i per tant, no permet establir relacions de causalitats, però ens indica que la regulació de l'expressió d'aquest gen pot ser interessant pel que fa a l'obesitat.

El gen DOR s'expressa en humans de forma específica en múscul, cor i teixit adipós blanc (figura 46), tots ells teixits especialment sensibles a l'acció de la insulina i la seva expressió en múscul esquelètic humà es veu incrementada després de l'administració aguda de l'hormona en individus joves control i diabètics de tipus 1 (70% i 73% d'increment respectivament; figura 52). Per tant serà interessant l'estudi del promotor per tal de veure si conté elements propis de la regulació de l'expressió per acció de la insulina.

En cèl·lules 3T3-L1 la insulina indueix la diferenciació de fibroblasts cap a adipòcits i en aquestes condicions l'expressió de DOR s'indueix considerablement (figura 45). D'aquesta darrera observació es desprèn que DOR pot ser un gen efector de l'acció de la insulina durant

l'adipogènesi, o que pot ser important per dur a terme algunes de les accions de la insulina sobre aquestes cèl·lules, com ara l'activació de la lipogènesi o de la síntesi de glucògen. Aquesta darrera possibilitat explicaria l'alta expressió de DOR a múscul i permetria hipotetitzar que una elevada expressió de DOR incrementaria el flux de glucosa cap a síntesi de glucògen en múscul, disminuint el flux de glucosa cap a síntesi de lípids en el teixit adipós. Això explicaria que quan més alts són els nivells de DOR en múscul esquelètic menor és el grau d'obesitat, i a la inversa.

Si es donés el cas, DOR no seria la primera proteïna d'expressió regulada en l'adipogènesi i per la insulina que juga un paper en la fisiopatologia de l'obesitat i la diabetis. Conegut és el cas de PPAR- γ , que indueix la generació de teixit adipós, i que la seva activació, mitjançant tiazolidinadiones (TZD), és una de les estratègies farmacològiques més exitoses per la sensibilització a la insulina. Curiosament PPAR- γ també s'expressa a múscul, i en resposta a TZD sensibilitza aquest teixit a l'acció de la insulina.

Les dades que fins ara tenim no permeten suggerir amb consistència cap paper concret de DOR en la fisiopatologia de l'obesitat o la diabetis, però al laboratori ja estem treballant amb aquest gen en diversos fronts, per tractar d'elucidar la seva funció, i els mecanismes que regulen la seva expressió.

VII Conclusions

1. L'aplicació de les tècniques de "Differential Display" i d'Hibridació Sostractiva en múscul de rates resistents a la insulina ens ha permès aïllar tres gens de funció poc o gens coneguda, i fins ara mai relacionats amb l'obesitat o la diabetis: Mitofusina-2, DOR i P311.
2. L'expressió dels gens Mitofusina-2, DOR i P311 està disminuïda en múscul esquelètic en condicions de resistència a la insulina, com ara l'obesitat i la diabetis de tipus 2 en humans. L'expressió dels gens Mitofusina-2 i DOR correlaciona inversament amb el grau d'obesitat.
3. La insulina regula l'expressió de Mitofusina-2 i DOR en múscul esquelètic, i per tant aquestes dues proteïnes podrien jugar un paper en la resposta del múscul a l'hormona.
4. Mitofusina-2 participa en la generació de la xarxa mitocondrial i un dèficit en la seva expressió provoca una davallada en l'oxidació de glucosa, en el consum d'oxigen, i en la taxa de respiració desacoblada ("proton leak"). La modulació de la morfologia mitocondrial mitjançant Mitofusina-2 és un nou mecanisme de regulació de la despesa energètica rellevant en la fisiopatologia de l'obesitat.

VIII Abreviatures

AMV: Acrònim anglès de "virus de mieloblastoma d'au"

ATP: Adenosina trifosfat.

BLAST: "Basic Alignment Search Tool". Programa que permet la cerca en bases de dades a partir de la comparació de seqüències.

BrEt: Bromur d'etidi.

BSA: Acrònim anglès d'"albúmina de sèrum boví".

cDNA: DNA complementari a una seqüència d'RNA sintetitzada a partir d'una reacció de retrotranscripció.

CTP: Citidina trifosfat.

d: desoxi.

DD-PAGE: "Differential Display- PoliAcrylamide Gel Electrophoresis". Electroforesi en gel de poliacrilamida d'alta resolució associada a la tècnica d'expressió diferencial de cDNA's.

DD-PCR: "Differential Display- Polymerase Chain Reaction". Reacció de la polimerasa en cadena associada a la tècnica d'expressió diferencial de cDNA's.

DMSO: Dimetilsulfòxid. Solvent orgànic de múltiples utilitats, entre elles, com a crioprotector.

VIII. Abreviatures

DNA: Acrònim anglès d'"àcid desoxirribonucleic".

dNTP: Abreviatura que designa qualsevol desoxinucleòtid o la barreja de dATP, dCTP, dGTP, dTTP a parts iguals.

DTT: Ditiotreitòl. Agent reductor i antioxidant, capaç de trencar els ponts disulfur.

ds: doble cadena

EDTA: Agent quelant de cations de doble càrrega. Protegeix els àcids nucleics de l'acció de nucleases.

EGTA: Agent quelant de cations semblant al EDTA.

ES: Error estàndard.

"et al.": llatí abreviat que significa "i col·laboradors".

FBS: Acrònim anglès de "sèrum fetal boví".

GTC: Isotiocianat de guanidina.

GTP: Guanosina trifosfat.

HEPES: Reactiu tamponador de pH.

LSB: Acrònim anglès de "tampó de mostra de Laemmli".

MMLV: Acrònim anglès de "virus de la leucèmia del mico de Moloney".

NCBI: "National Center for Biotechnology Information". Organisme públic del govern U.S.A. per centralitzar tota la informació de seqüències biològiques.

"Nested" PCR: PCR secundària que amplifica el producte d'una PCR anterior, mitjançant "primers" interns.

OMS: Organització Mundial de la Salut.

ORF: Acrònim anglès de "pauta oberta de lectura".

³²P: isòtop 32 del fòsfor.

PAGE: Acrònim anglès d'"electroforesi en gel de poliacrilamida".

PCR: Acrònim anglès de "reacció en cadena de la polimerasa". Reacció que permet l'amplificació de fragments de DNA.

"Primer": Encebador. Oligonucleòtid utilitzat per l'amplificació per PCR.

"proton leak": Pas de protons a través de la membrana mitocondrial interna que provoca una pèrdua del gradient electroquímic de manera no acoblada a la síntesi d'ATP.

VIII. Abreviatures

PSA: Persulfat d'amoni.

RNA: Acrònim anglès d'"àcid ribonucleic".

RT: Retrotranscriptasa. Enzim que permet la síntesi de cDNA a partir de fragments d'RNA.

SN: Sobrenedant després d'una centrifugació.

SNC: Sistema nerviós central.

ss: cadena senzilla.

TEMED: Agent catalitzador de la polimerització dels gels d'acrilamida.

TRIS: Reactiu tamponador de pH.

TTP: Timidina trifosfat.

U.B.: Universitat de Barcelona.

UCP: Proteïna desacobladora.

ZDF: "Zucker Diabetic Fatty". Fa referència a la soca de rates ZDF/Drt fa/fa.

IX Referències

Almind K., Bjoerbaek C., Vestergaard H., Hansen T., Echwald S., Pedersen O. (1993) Amino acid polymorphism of the insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342: 828–832.

Altshuler D., Hirschhorn J.N., Klannemark M., Lindgren C.M., Vohl M.C., Nemesh J., Lane C.R., Schaffner S.F., Bolk S., Brewer C., Tuomi T., Gaudet D., Hudson T.J., Daly M., Groop L., Lander E.S. (2000) The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 26(1): 76-80.

Amchenkova A.A., Bakeeva L.E., Chentsov Y.S., Skulachev V.P., Zorov D.B. (1988). Coupling membranes as energy-transmitting cables I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *The Journal of Cell Biology* 107: 481-495.

Arsenijevic D., Onuma H., Pecqueur C., Raimbault S., Manning B.S., Miroux B., Couplan E., Alves-Guerra M.C., Goubern M., Surwit R. *et al.* (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature Genetics* 26: 435-439.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Simth J.A., Struhl K. (2001) *Current Protocols In Molecular Biology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc (USA).

Baddeley A.J., Gundersen H.J.G., Cruz-Orive L.M. (1986) Estimation of surface area from vertical sections. *Journal of Microscopy* 142: 259-276.

Baier L.J., Permana P.A., Yang X., Pratley R.E., Hanson R.L., Shen G.Q., Mott D., Knowler W.C., Cox N.J., Horikawa Y. (2000) A calpain 10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 106:R69-R73.

Bakeeva L.E., Chentsov Yu.S., Skulachev V.P. (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 501(3): 349-369.

IX.Referències

Bakeeva L.E., Chentsov Yu.S., Skulachev V.P. (1981) Ontogenesis of mitochondrial reticulum in rat diaphragm muscle. *European Journal of Cell Biology* 25(1): 175-181.

Bakeeva L.E., Chentsov Yu.S., Skulachev V.P. (1983) Intermitochondrial contacts in myocardiocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 15(7): 413-420.

Banerji M., Chaiken R., Gordon D., Kral J., Lebovitz H. (1995) Does intra-abdominal adipose tissue in black men determine whether NIDDM is insulin-resistant or insulin-sensitive? *Diabetes* 44(2): 141-146.

Barroso I., Gurnell M., Crowley V.E., Agostini M., Schwabe J.W., Soos M.A., Maslen G.L., Williams T.D., Lewis H., Schafer A.J., Chatterjee V.K., O'Rahilly S. (1999) Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402: 860-861.

Baumann C.A., Ribon V., Kanzaki M., Thurmond D.C., Mora S., Shigematsu S., Bickel P.E., Pessin J.E., Saltiel A.R. (2000) CAP defines a second signalling pathway required for insulin stimulated glucose transport. *Nature* 407: 147-148.

Beck-Nielsen H., Groop L. (1994) Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 94(5): 1714-21.

Benson D.A, Boguski M.S., Lipman D.J., Ostell J., Ouellette B.F. (1998) GeneBank. *Nucleic Acids Research* 26(1): 1-7.

Berg A.H., Combs T.P., Du X., Brownlee M., Scherer P.E. (2001) The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine* 7(8): 887-888.

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

Bleazard W., McCaffery J.M., King E.J., Bale S., Mozdy A., Tieu Q., Nunnari J., Shaw J.M. (1999) The dymanim-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature Cell Biology* 1: 298-304.

Boguski M.S., Lowe T.M., Tolstoshev C.M. (1993) dbEST database for "expressed sequence tags". *Nature Genetics* 4(4): 332-333.

Borecki I.B., Province M.A., Rao D.C. (1994) Power of segregation analysis for detection of major gene effects on quantitative traits. *Genetic Epidemiology*, 11(5):409-418.

Boss O., Bachman E., Vidal-Puig A., Zhang C.Y., Peroni O., Lowell B.B. (1999) Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262: 870-876.

Boss O., Hagen T., Lowell B.B. (2000) Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes*, 49:143-156.

Bouchard C., Perusse L., Leblanc C., Tremblay A., Theriault G. (1988) Inheritance of the amount and distribution of human body fat. *International Journal of Obesity* 12: 205–215.

Bouchard C., Tremblay A., Despres J.P., Nadeau A., Lupien P.J., Theriault G., Dussault J., Moorjani S., Pinault S., Fournier G. (1990) The response to long-term overfeeding in identical twins. *New England Journal of Medicine* 322(21):1477-82.

IX.Referències

Bouchard C., Rice T., Lemieux S., Despres J., Perusse L., Rao D. (1996) Major gene for abdominal visceral fat area in the Quebec Family Study. *International Journal of Obesity* 20: 420–427.

Bouchard C. (1997) Genetics of human obesity: recent results from linkage studies. *Journal of Nutrition* 127(9): 1887S-1890S.

Brady M.J., Nairn A., Saltiel A.R. (1997) The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3–L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *Journal of Biological Chemistry* 272: 29698-29703.

Brand M.D., Couture P., Else P.L., Whithers K.W., Hulbert A.J. (1991) Evolution of energy metabolism. Proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria is greater in a mammal than in a reptile. *Biochemical Journal* 275: 81-86.

Brand M.D., Chien L.F., Ainscow E.K., Rolfe D.F.S., Porter R.K. (1994) The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochimica et Biophysica Acta* 1187:132-139.

Brand M.D., Brindle K.M., Buckingham J.A., Harper J.A., Rolfe D.F., Stuart J.A. (1999) The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *International Journal of Obesity and Metabolic Disorders* 23(Suppl 6): S4-S11.

Brand M.D. (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* 35: 811-820.

Brockmann G.A., Haley C.S., Renne U., Knott S.A., Schwerin M. (1998) Quantitative trait loci affecting body weight and fatness from a mouse line selected for extreme high growth. *Genetics* 150, 369-381

Bruning J.C., Gautam D., Burks D.J., Gillette J., Schubert M., Orban P.C., Klein R., Krone W., Muller-Wieland D., Kahn C.R. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122-2125.

Burks C. (1999) Molecular Biology Database List. *Nucleic Acids Research* 27(1): 1-9.

Byyny R.L., LoVerde M., Lloyd S., Mitchell W., Draznin B. (1992) Cytosolic calcium and insulin resistance in elderly patients with essential hypertension. *American Journal of Hypertension* 5(7): 459-64.

Carpentier A., Mittelman S.D., Lamarche B., Bergman R.N., Giacca A., Lewis G.F. (1999) Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *American Journal of Physiology* 276: E1055-E1066.

Chagnon Y., Chen W., Perusse L., Chagnon M., Nadeau A., Wilkinson B., Bouchard C. (1997) Linkage and association studies between the melanocortin receptor-4 and receptor-5 genes and obesity-related phenotypes in the Quebec family study. *Molecular Medicine* 3: 663-673.

Chen H., Charlat O., Tartaglia L.A., Woolf E.A., Weng X., Ellis S.J., Lakey N.D., Culpepper J., Moore K.J., Breitbart R.E. (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84: 491-495.

Chen X., Chen S.M., Powell B.S., Court D.L., and Ji X. (1999a) Purification, characterization and crystallization of ERA, an essential GTPase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. 445: 425-430.

Chen X., Court D.L., and Ji X. (1999b). Crystal structure of ERA: A GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 8396-8401.

IX.Referències

Chiang S.H., Baumann C.A., Kanzaki M., Thurmond D.C., Neudauer C.L., Macara I.G., Pessin J.E., Saltiel A.R. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of the small GTP-binding protein TC10. *Nature* 410: 944-948.

Chung W., Luke A., Cooper R.S, Rotini C., Vidal-Puig A., Rosenbaum M., Chua M., Solanes G., Zheng M., Zhao L., LeDuc C., Eisberg A., Chu F., Murphy E., Schreier M., Aronne L., Caprio S., Kahle B., Gordon D., Leal S.M., Goldsmith R., Andreu A.L., Bruno C., DiMauro S., Leibel R.L., *et al.* (1999) Genetic and physiologic analysis of the role of uncoupling protein 3 in human energy homeostasis. *Diabetes* 48, 1890–1895.

Clapham J.C., Arch J.R., Chapman H., Haynes A., Lister C., Moore G.B., Piercy V., Carter S.A., Lehner I., Smith S.A. *et al.* (2000) Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406:415-418.

Clausen J., Hansen T., Bjoerbaek C., Echwald S., Urhammer S., Rasmussen S., Andersen C., Hansen L., Almind K., Winther K., Haraldsdottir J., Borch-Johnsen K., Pedersen O. (1995) Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 346(8972): 397-402.

Clément K., Vaisse C., Manning B., Basdevant A., Guy-Grand B., Ruiz J., Silver K., Shuldiner A., Froguel P., Strosberg A. (1995) Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *New England Journal of Medicine* 333: 352–354.

Clément K., Vaisse C., Lahlou N., Cabrol S., Pelloux V., Cassuto D., Gormelen M., Dina C., Chambaz J., Lacorte J.M., Basdevant A., Bougneres P., Lebouc Y., Froguel P., Guy-Grand B (1998) A mutation in the leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398–401.

Cohen S.N., Chang A.C., and Hsu L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences.U.S.A* 69: 2110-2114.

Coligan J.E., Dunn B.M., Ploegh H.L., Speicher D.W., Wingfield P.T. (2001). *Current Protocols In Protein Sciences*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. (USA).

Comuzzie A., Hixson J., Almasy L., Mitchell B., Mahaney M., Dyer T., Stern M., MacCluer J., Blangero J. (1997) A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nature Genetics* 15: 273–276.

Considine R.V., Considine E.L., Williams C.J., Nyce M.R., Magosin S.A., Bauer T.L., Rosato E.L., Colberg J., Caro J.F. (1995) Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *Journal of Clinical Investigation* 95(6): 2986-88.

Corbett S.W., Kaufman L.N., Keeseey R.E. (1983) Effectc of beta-adrenergic blockade on lateral hypothalamic lesion-induced thermogenesis. *American Journal of Physiology* 246(6): E535-541.

Cross D.A., Alessi D., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789.

De Fronzo R.A. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Reviews* 5(3):177-269.

Deeb S., Fajas L., Nemoto M., Laakso M., Fujimoto W., Auwerx J. (1998) A Pro 12Ala substitution in the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 is associated with decreased receptor activity, improved insulin sensitivity and lowered body mass index. *Nature Genetics* 20: 284–287.

IX.Referències

Dhalla N.S., Afzal N., Beamish R.E., Naimark B., Takeda N., Nagano M. (1993) Pathophysiology of cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Canadian Journal of Cardiology* 9(10): 873-887.

Draznin B., Sussman K., Kao M., Lewis D., Sherman N. (1987) The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 262(30): 14385-14388.

Dresner A., Laurent D., Marcucci M., Griffin M.E., Dufour S., Cline G.W., Slezak L.A., Andersen D.K., Hundal R.S., Rothman D.L. *et al.* (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation* 103: 253-259.

Ek J., Urhammer S., Sorensen F., Anderson T., Auwerx J., Pedersen O. (1999) Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxi-some proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean men of Caucasian origin. *Diabetologia* 42: 892–895.

El-Haschimi K., Pierroz D.D., Hileman S.M., Bjorbaek C., Flier J.S. (2000) Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation* 105: 1827-1832.

Elias C.F., Aschkenasi C., Lee C., Kelly J., Ahima R.S., Bjorbaek C., Flier J.S., Saper C.B., Elmquist J.K. (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775-786.

Elmquist J.K., Elias C.F., Saper C.B. (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232.

Emilsson V., Summers R.J., Hamilton S., Liu Y.L., Cawthorne M.A. (1998) The effects of the β 3-adrenoceptor agonist BRL 35135 on UCP isoform mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252: 450-454.

Farooqi I.S., Yeo G.S., Keogh J.M., Aminian S., Jebb S.A., Butler G., Cheetham T., O'Rahilly S. (2000) Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *Journal of Clinical Investigation* 106: 271-279.

Fernández-Real J., Gutierrez C., Ricart W., Casamitjana R., Fernandez-Castaner M., Vendrell J., Richart C., Soler J. (1997) The TNF-alpha gene NcoI polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 46(9):1468-72.

Fernández-Real J.M, Vendrell J., Ricart W., Broch M., Gutierrez C., Casamitjana R., Oriola J., Richart C. (2000) Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 23: 831-837.

Friedman J.M., Halaas J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.

Fujisawa T., Ikegami H., Kawaguchi Y., Ogihara T. (1998) Meta-analysis of the association of the Trp64Arg polymorphism of the beta-3-adrenergic receptor gene with body mass index. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83: 2441-2444.

Gagnon J., Mauriege P., Roy S., Sjostrom D., Chagnon Y., Dionne F., Oppert J.M., Perusse L., Sjostrom L., Bouchard C. (1996) The Trp64Arg mutation of the beta-3-adrenergic receptor gene has no effect on obesity phenotypes in the Quebec family study and Swedish obese subjects cohort. *Journal of Clinical Investigation* 98: 2086-2093.

IX.Referències

Ghosh S., Watanabe R., Hauser E., Valle T., Magnuson V.L., Erdos M.R., Langefeld C.D., Balow J. Jr, Ally D.S., Kohtamaki K., Chines P., Birznieks G., Kaleta H.S., Musick A., Te C., Tannenbaum J., Eldridge W., Shapiro S., Martin C., Witt A., So A., Chang J., Shurtleff B., Porter R., Boehnke M., *et al.* (1999) Type 2 diabetes: evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finnish affected sib pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 2198–2203.

Gong D.W., Monemdjou S., Gavrilova O., Leon L.R., Marcus-Samuels B., Chou C.J., Everett C., Kozak L.P., Li C., Deng C. *et al.* (2000) Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *Journal of Biological Chemistry* 275: 16251-16257.

Groop L., Kankuri M., Schalin-Jantti C., Ekstrand A., Nikula-Ijas P., Widen E., Kuismanen E., Eriksson J., Franssila-Kallunki A., Saloranta C., Koskimies S. (1993) Association between polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 328: 10–14.

Groop L., Forsblom C., Lehtovirta M., Tuomi T., Karanko S., Nissen M., Ehrnstrom B.O., Forsen B., Isomaa B., Snickars B., Taskinen M.R. (1996) Metabolic consequences of a family history of NIDDM (The Botnia Study). *Diabetes* 45: 1585–1593.

Groop L., Tuomi T. (1997) Non-insulin-dependent diabetes mellitus – a collision between thrifty genes and an affluent society. *Annals of Medicine* 29: 37–53.

Hager J., Dina C., Francke S., Dubois S., Houari M., Vatin V., Vaillant E., Lorentz N., Basdevant A., Clement K., Guy-Grand B., Froguel P. (1998) A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nature Genetics* 20(3): 304-8.

Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K., Friedman J.M. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.

Hales K.G., Fuller M.T. (1997) Developmentally Regulated Mitochondrial Fusion Mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90: 121-129.

Hani E.H., Stoffers D.A., Chevre J.C., Durant E., Stanojevic V., Dina C., Habener J.F., Froguel P. (1999) Defective mutations in the insulin promoter factor (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 104(9): R41-48.

Hanis C.L., Boerwinkle E., Chakraborty R., Ellsworth D.L., Concannon P., Stirling B., Morrison V.A., Wapelhorst B., Spielman R.S., Gogolin-Ewens K.J. *et al.* (1996) A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genetics* 13: 161-166.

Hermann G.J., Thatcher J.W., Mills J.P., Hales K.G., Fuller M.T., Nunnari J., Shaw J.M. (1998) Mitochondrial Fusion in Yeast Requires the Transmembrane GTPase Fzo1p. *The Journal of Cell Biology* 143:359-373.

Horikawa Y., Oda N., Cox N.J., Li X., Orho-Melander M., Hara M., Hinokio Y., Lindner T.H., Mashima H., Schwarz P.E. *et al.* (2000) Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 26: 163-175.

Hotamisligil G., Shargill N., Spiegelman B. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91.

Hotamisligil G., Arner P., Caro J., Atkinson R., Spiegelman B. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 95(5): 2409-15.

Hotamisligil G.S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B.M. (1996) IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271: 665-668.

IX.Referències

Hotamisligil G.S. (1999) The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *Journal of Internal Medicine* 245: 621-625.

Jackson R., Creemers J., Ohagi S., Raffin-Sanson M.L., Sanders L., Montague C., Hutton J., O'Rahilly S. (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nature Genetics* 16: 303–306.

Kahn B.B., Flier J.S. (2000) Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 106: 473-481.

Kajiwara K., Sugaya E., Kimura M., Katsuki M., Nagasawa H., Yuyama N., Tsuda T., Sugaya A., Motoki M., Ookura T., Shimizu-Nishikawa K. (1995). Cloning and characterization of pentylentetrazol-related cDNA, PTZ-17. *Brain Research* 671: 170-174.

Kajiwara K., Sugaya E., Yuyama N., Nagasawa H., Tsuda T., Sugaya A., Motoki M., Shimizu-Nishikawa K., Kimura M. (1997) Molecular mechanism of regulation of pentylentetrazol-induced calcium entry by 3'-untranslated region of a seizure-related cDNA, PTZ-17, in *X. laevis* oocytes. *Molecular Brain Research* 47: 49-58.

Katsanis N., Beales P.L., Woods M.O., Lewis R.A., Green J.S., Parfrey P.S., Ansley S.J., Davidson W.S., Lupski J.R. (2000). Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated to Bardet-Biedl syndrome. *Nature Genetics* 26(1): 67-70.

Kay B.K., Williamson M.P., Sudol M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB Journal* 14:231-41.

Keesey R.E., Corbett S.W.. (1990) Adjustments in daily energy expenditure to caloric restriction and weight loss by adult obese and lean Zucker rats. *International Journal of Obesity* 14:1079-84.

Klannemark M., Orho M., Groop L. (1998) No relationship between variants in the uncoupling protein 2 gene and energy expenditure. *European Journal of Endocrinology* 139: 217–221.

Krude H., Biebermann H., Luck W., Horn R., Brabant G., Grueters A. (1998) Severe early-onset obesity adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics* 19(2): 155-7.

Kuczmarski R.J., Flegal K.M., Campbell S.M., Johnson C.L.(1994) Increasing prevalence of overweight among U.S. adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA* 272: 205-211.

Large V., Hellstrom I., Reynisdottir S., Lonngqvist F., Eriksson P., Lannfelt L., Arner P. (1997) Human beta-2-adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2-adrenoceptor function. *Journal of Clinical Investigation* 100: 3005–3013.

Lehto M., Stoffel M., Groop L., Espinosa III R., LeBeau M., Bell G. (1993) Assignment of the gene encoding glycogen synthase to human chromosome 19 band q13.3. *Genomics* 15: 460–461.

Liang P., Pardee A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-71.

Loftus T.M., Jaworsky D.E., Frehywot G.L., Townsend C.A., Ronnett G.V., Lane M.K., Kuhajda F.P. (2000) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288: 2379-2381.

Lowell B.B., Flier J.S. (1997) Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annual Review in Medicine*. 48: 307-316.

IX.Referències

Macfarlane W.N., Frayling T.M., Ellard S., Evans J.C., Allen L.I., Bullman M.P., Ayres S., Sheperd M., Clark P., Millward A., Demaine A., Wilkin T., Docherty K., Hattersley A.T. (1999) Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 104(9): R33-39.

Maddux B., Sbraccia P., Kumakura S., Sasson S., Youngren J., Fisher A., Spemcer S., Grupe A., Henzel W., Stewart T., Reaven G., Goldfine I. (1995) Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 373: 448–451.

Maffei M., Halaas J., Ravussin E., Pratley R., Lee G., Zhang Y., Fei H., Kim S., Lallone R., Ranganathan S., Kern P., Friedman J. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1: 1155–1161.

Magre J. *et al.* (BSCL Working Group) (2001) Identification of the gene altered in Berardelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nature Genetics* 28(4): 365-370.

Mahtani M.M., Wide`n E., Lehto M. *et al.* (1996) Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nature Genetics* 14: 90–94.

Majer M., Mott D., Mochizuki H., Rowles J., Pedersen O., Knowler W., Bogardus C., Prochazka M. (1996) Association of the glycogen synthase locus 19q13 with NIDDM in Pima Indians. *Diabetologia* 39: 314–321.

Malecki M.T., Jhala U.S., Antonellis A., Fields L., Doria A., Orban T., Saad M., Warram J.H., Montminy M., Krolewski A.S. (1999) Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 23(3): 323-328.

Mariani L., McDonough W.S., Hoelzinger D.B., Beaudry C., Kaczmarek E., Coons S.W., Giese A., Moghaddam M., Seiler R.W., Berens M.E. (2001) Identification and validation of P311 as a glioblastoma invasion gene using laser capture microdissection. *Cancer Research* 61: 4190-4196.

Mitchell B., Cole S., Comuzzie A., Almasy L., Blangero J., MacCluer J., Hixson J. (1999) A quantitative trait locus influencing BMI maps to the region of beta-3-adrenergic receptor. *Diabetes* 48: 1863–1867.

Montague C., Farroqi S., Whitehead J., Soos M., Rau H., Wareham N., Sewter C., Digby J., Mohammed S., Hurst J., Cheetham C., Earley A., Barnett A., Prins J., and O'Rahilly S. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903–908.

Moore B.J., Armbruster S.J., Horwitz B.A., Stern J.S.. (1985) Energy expenditure is reduced in preobese 2-day Zucker fa/fa rats. *American Journal of Physiology* 249:R262-5.

Moran T.H. (2000) Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 16:858-865.

Morris G.J., Coulson G.E., Leeson E.A. (1985) Changes in the shape of mitochondria following osmotic stress to the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cell Science* 76: 145-153.

Mykytin K., Braun T., Carmi R., Haider N.B., Searby C.C., Shastri M., Beck G., Wright A.F., Iannaccone A., Elbedour K., Riise R., Baldi A., Raas-Rothschild A., Gorman S.W., Duhl D.M., Jacobson S.G., Casavant T., Stone E.M., Sheffield V.C. (2001) Identification of the gen that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4. *Nature Genetics* 28(2): 188-191.

Naggert J., Fricker L., Varlamov O., Nishina P., Roille Y., Steiner D., Carroll R., Paigen B., Leiter E. (1995) Hyperproinsulinemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genetics* 10: 135–142.

Neel V. (1962) Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by progress? *American Journal of Human Genetics* 14, 352–362.

IX.Referències

Nishimura D.Y., Searby C.C., Carmi R., Elbedour K., Van Maldergem L., Fulton A.B., Lam B.L., Powell B.R., Swiderski R.E., Bugge K.E., Haider N.B., Kwitek-Black A.E., Ying L., Duhl D.M., Gorman S.W., Heon E., Iannaccone A., Bonneau D., Biesecker L.G., Jacobson S.G., Stone E.M., Sheffield V.C. (2001) Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). *Human Molecular Genetics* 10(8): 865-874.

Norman R., Thompson D., Foroud T., Garvey W., Bennett P., Bogardus C., Ravussin E. (1996) Genome-wide search for genes influencing percent body fat in Pima Indians: suggestive linkage at chromosome 11q21–q22. *American Journal of Human Genetics* 60: 166–173.

Orho M., Nikula-Ijas P., Schalin-Jantti C., Permutt M., Groop L. (1995) Isolation and characterization of the human muscle glycogen synthase gene. *Diabetes* 44: 1099–1105.

Perusse L., Chagnon Y.C., Weisnagel S.J., Rankinen T., Snyder E., Sands J., Bouchard C. (2001) The human obesity gene map: the 2000 update. *Obesity Research* 9(2): 135-69.

Pessin J.E., Thurmond D.C., Elmendorf J.S., Coker K.J., Okada S. (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! location! location! *Journal of Biological Chemistry* 274: 2593-2596.

Petersen K., Hendler R., Price T.B., Perseghin G., Rothman D.L., Held N., Amatruda J.M., Shulman G.I. (1998) ¹³C/³¹P NMR studies on the mechanism of insulin resistance in obesity. *Diabetes* 47: 381-386.

Pick A., Clark J., Kubstrup C., Levisetti M., Pugh W., Bonner-Weir S., Polonsky K.S. (1998) Role of apoptosis in failure of β -cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47: 358-364.

Pizzuti A., Frititta L., Argiolas A., Baratta R., Goldfine I., Bozzali M., Ercolino T., Scarlato G., Iacovello L., Vigneri R., Tassi V., Trischitta V. (1999) A polymorphism (K12Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 48: 1881–1884.

Porter R.K., Hulbert A.J., Brand M.D. (1996) Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *American Journal of Physiology* 271: R1550-1560

Rapaport D., Brunner M., Neupert W., Westermann B. (1998) Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 20150-20155.

Ravussin E., Lillioja S., Knowler W.C., Christin L., Freymond D., Abbott W.G., Boyce V., Howard B.V., Bogardus C. (1988) Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. *New England Journal of Medicine* 318(8): 467-72.

Ravussin E., Gautier J.F. (1999) Metabolic predictors of weight gain. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 23 (Suppl 1):37-41.

Rebrin K., Steil G.M., Mittelman S.D., Bergman R.N. (1996) Causal linkage between insulin suppression of liver glucose output in dogs. *Journal of Clinical Investigation*, 98:741-749.

Resnick L.M., Gupta R.K., Bhargava K.K., Gruenspan H., Alderman M.H., Laragh J.H. (1991) Cellular ions in hypertension, diabetes, and obesity. A nuclear magnetic resonance spectroscopic study. *Hypertension* 17(6 Pt 2): 951-7.

Ribon V., Saltiel A.R. (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Journal* 324: 839-845.

IX.Referències

Ristow M., Muller-Wieland D., Pfeiffer A., Krone W., Kahn C. (1998) Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *New England Journal of Medicine* 339: 953–959.

Rizzo W.B., Avigan J., Chemke J., Schulman J.D. (1984) Adrenoleukodystrophy: Very long-chain fatty acid metabolism in fibroblasts. *Neurology* 34:163-169

Roden M., Price T.B., Perseghin G., Petersen K.F., Rothman D., Cline G.W., Shulman G.I. (1996) Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *Journal of Clinical Investigation* 97: 2859-2865.

Rolfe D.F., Brand M.D. (1996) Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *American Journal of Physiology* 271: C1380-C1389.

Rolfe D.F., Newman J.M., Buckingham J.A., Clark M.G., Brand M.D. (1999) Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *American Journal of Physiology* 276: C692-C699.

Roshier M., Kuusisto E., Kyrilenko S., Salminen A. (1998) Expression of seizure-related PTZ-17 is induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252: 10-13.

Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, 2nd ed. CSH Laboratory Press. USA..

Santel A., Fuller M.T. (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science* 114: 867-874.

Savontaus E., Pesonen U., Rouru J., Huupponen R., Koulu M. (1998) Effects of ZD7114, a selective beta3-adrenoceptor agonist, on neuroendocrine mechanisms controlling energy balance. *European Journal of Pharmacology* 347(2-3): 265-274.

Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D. Jr., Seeley R.J., Baskin D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671.

Seidell J.C., Muller D.C., Sorkin J.D. *et al.* (1992). Fasting respiratory exchange ratio and resting metabolic rate as predictors of weight gain: the Baltimore longitudinal study on ageing. *International Journal of Obesity* 16:667-674.

Shimabukuro M., Koyama K., Chen G., Wang M.Y., Trieu F., Lee Y., Newgard C.B., Unger R.H. (1997) Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94: 4637-4641.

Shimomura I., Hammer R.E., Ikemoto S., Brown M.S., Goldstein J.L. (1999) Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401: 73-76.

Shulman G.I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106:171-176.

Simonsen I., Bulow J., Madsen J., Christensen N.J. (1992) Thermogenic response to epinephrine in the forearm and abdominal subcutaneous adipose tissue. *American Journal of Physiology* 263: E850-E855.

Sipilainen R., Uusitupa M., Heikkinen S., Rissanen A., Laakso M. (1997) Polymorphism of the beta-3-adrenergic receptor gene affects basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetes* 46: 77-80.

IX.Referències

Skulachev V.P. (1990) Power transmission along biological membranes. *Journal of membrane biology* 114:97-112.

Slavotinek A.M., Stone E.M., Mykytyn K., Heckenlively J.R., Green J.S., Heon E., Musarella M.A., Parfrey P.S., Sheffield V.C., Biesecker L.G. (2000) Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nature Genetics* 26(1): 15-16.

Sprang R.S. (1997) G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annual Review in Biochemistry* 66: 639-678.

Steppan C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312.

Stern M.P., Ferrell R.E., Rosenthal M., Haffner S.M., Hazuda H.P. (1986). Association between NIDDM, RH blood group, and haptoglobin phenotype. Results from the San Antonio Heart Study. *Diabetes* 35, 387-391.

Stoffers D.A., Stanojevic V., Habener J.F. (1998) Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *Journal of Clinical Investigation* 102(1): 232-241.

Street J.M., Singh H., and Poulos A. (1990) Metabolism of saturated and polyunsaturated very-long-chain fatty acids in fibroblasts from patients with defects in peroxisomal β -oxidation. *Biochemical Journal* 269:671-677

Studler J-M., Glowinski J., Lévi-Strauss M. (1993) An abundant mRNA of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood. *European Journal of Neuroscience* 5: 614-623.

Sugaya E., Onozuka M. (1978a). Intracellular calcium: its movement during pentylentetrazole-induced bursting activity. *Science* 202: 797-799.

Sugaya E., Onozuka M. (1978b). Intracellular calcium: its release from granules during bursting activity in snail neurons. *Science* 202: 1195-1197.

Tanaka Y., Kanai Y., Okada Y., Nonaka S., Takeda S., Harada A., Hirokawa N. (1998) Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93:1147-58.

Tartaglia L., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G., Campfield L., Clark F., Dees J., Muir C., Sanker S., Moriarty A., Moore K., Smutko J., Mays G., Woolf E., Monroe C., Tepper R. (1996) Identification and expression cloning of a leptin receptor ob-R. *Cell* 83: 1263–1271.

Taylor G.A., Hudson E., Resau J.H., Vande Woude G.F. (2000) Regulation of P311 expression by Met-Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor and the Ubiquitin/Proteasome system. *Journal of Biological Chemistry* 275 (6): 4215-4219.

Tokuyama Y., Sturis J., DePaoli A.M., Takeda J., Stoffel M., Tank J., Sun X., Polonsky K.S., Bell G.I. (1995) Evolution of β -cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 44: 1447-1457.

Troiano and Flegal, R.P., Flegal, K.M. (1999). Overweight prevalence among young in the United States. Why so many different numbers? *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2:S22-S27.

Tschop M., Smiley D.L., Heiman M.L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-913.

IX.Referències

Unger R.H., Zhou Y.T., Orci L. (1999) Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 2327-2332.

Vidal-Puig A.J., Grujic D., Zhang C.Y., Hagen T., Boss O., Ido Y., Szczepanik A., Wade J., Mootha V., Cortright R. *et al.* (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *Journal of Biological Chemistry* 275: 16258-16266.

Walder K., Hanson R.L., Kobes S., Knowler W.C., Ravussin E. (2000) An autosomal genomic scan for loci linked to plasma leptin concentration in Pima Indians. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 24(5): 559-65.

Walston J., Seibert M., Jen-Yen C., Cheskin L., Andersen R. (1999) Tumor necrosis factor-alpha-238 and -308 polymorphisms do not associate with traits related to obesity and insulin resistance. *Diabetes* 48: 2096–2098.

Walston J., Silver K., Bogardus C., Knowler W., Celi F., Austin S., Manning B., Strosberg D., Stern M., Raben N., Sorkin J., Roth J., Shuldiner A.(1995) Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta3-adrenergic receptor gene. *New England Journal of Medicine* 333: 343–347.

West D.B., Waguespack J., York B., Goudey-Lebevre J., Price R.A. (1994) Genetics of dietary obesity in AKR/J x SWR/J mice: segregation of the trait and identification of a linked locus on chromosome 4. *Mammalian Genome* 5, 546-552.

Widen E., Lehto M., Kanninen T., Walston J., Shuldiner A., Groop L. (1995) Association of a polymorphism in the beta-3-adrenergic receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *New England Journal of Medicine* 333: 348–351.

Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R., Urlaub G., and Chasin L. (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences.U.S.A 76: 1373-1376.

Wilson A.F., Elston R.C., Tran L.D., Siervogel R.M. (1991).Use of the robust sib-pair method to screen for single-locus, multiple-locus, and pleiotropic effects: application to traits related to hypertension. American Journal of Human Genetics 48, 862-872.

Withers D.J., Gutierrez J.S., Towery H., Burks D.J., Ren J.M., Previs S., Zhang Y., Bernal D., Pons S., Shulman G.I. *et al.* (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature 391: 900-904.

Yamada K., Ishiyama-Shigemoto S., Ichikawa F., Yuan X., Koyanagi A., Koyama W., and Nonaka K. (1999) Polymorphism in the 5'-leader cistron of the beta2-adrenergic receptor gene associated with obesity and type 2 diabetes. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 84(5): 1754-7.

Zemel M.B., Kim J.H., Woychik R.P., Michaud E.J., Kadwell S.H., Pater I.R., Wilkison W.O. (1995) Agouti regulation of intracellular calcium: Role in the insulin resistance of viable yellow mice. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 4733-4737.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-432.

Zouali H., Hani E., Philippi A., Vionnet N., Beckmann J., Demenais F., Froguel P. (1997) A susceptibility locus for early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus maps to chromosome 20q proximal to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. Human Molecular Genetics 6: 1401-1408.