



Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

## **Caracterització del gen Acetoacetil-CoA sintetasa**

Francesca M. Aguiló Payeras

Barcelona, 2008



**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de doctorat de Biomedicina

Bienni 2003-2005

## **Caracterització del gen Acetoacetil-CoA sintetasa**

Memòria presentada per Francesca M. Aguiló Payeras per optar al títol de doctor per  
la Universitat de Barcelona

Dr. Diego Haro Bautista

Francesca M. Aguiló Payeras



A en David

*Our greatest glory consists not in never  
falling, but in rising every time we fall.*

Oliver Goldsmith

La nostra major glòria no està en no haver  
caigut mai, sinó en aixecar-nos cada cop  
que caiem.

Oliver Goldsmith



# AGRAÏMENTS

El dia que vaig decidir que volia formar part d'un col·lectiu de gent capaç de canviar el curs natural de la vida fou quan vaig prendre consciència de la mort del meu germà. Volia ser metge, després biòloga per passar a ser bioquímica i, finalment, científica. No sé si he aportat el meu granet d'arena però al manco ho he intentat. Tampoc sé fins quan, però aquí comença el meu camí.

Primer de tot voldria donar les gràcies a en Diego, que ha sigut molt més que un director de tesi, *por tu manera de ver la ciencia, tan bonita y tan sencillita, y por tu ayuda incondicional, tanto a nivel profesional como a nivel personal*. I a en Pedro, *por tu entusiasmo y por tus consejos dolorosos que con el tiempo he llegado a entender. Tantas frases para recordar... Muchísimas gracias a los dos!*

A la gent del *lab*, aquest "ramellet de nines" amb les que he compartit el millor de la tesi. Moltes gràcies als que ja no hi són: Carine, Agnes, William, Xavier, Rosa. Laura, per enviar-me mails d'ànims amb cançons de Mallorca. La meva amiga Cris, sempre fent "pessigolles" perquè la vida em somrigués. No em penedeixo d'haver vingut a Barcelona doncs ets de les millors coses que m'emporto d'aquesta ciutat...no pots imaginar-te el que t'he enyorat aquest darrer any. I a les que encara hi són: Nurieta, *por formar parte de mi equipo y hacer que esta tesis sea mejor, por identificarte en cada una de mis dudas y solucionarlas con tu experiencia*. Joana, has fet de germana gran, de sac de boxa (o era jo el teu sac?), mai oblidaré les nits de matança que acabaven sent nits de confessions. Mar, per l'*espai Mallorca* i tot el que això ha suposat, per la teva amistat, per donar-me un lloc en el teu cor, on riure i plorar. I les p. *Ruckies*, que han fet que en *lab* hi hagués un abans i un després. Marionetis, ets un sol enorme, tan ingènua i tan genial. És igual si no ens entenem, ens ho passem bé igual...No canviïs mai. Vilaneta, estic molt orgullosa de tu, no et deixis enfonsar perquè vals molt, moltíssim, i arribaràs molt lluny!. AnaLu, *la portuguesa de gran corazón, siento todas las veces que te he hecho llorar*. Joan Carles, gràcies per les discussions científiques i per ajudant-me en tot moment. Helena, *me encantaría haber coincidido más contigo y "adoptarte"*. Maria José, *por intentar facilitarnos el trabajo del lab*. Gràcies a tots els del Parc, a na Carme, pels bons consells i a en Joan, per presentar-me el futur de Nova York com a una opció immillorable.

Als professors del departament, especialment a n'Albert, per fer-me somniar amb els seus viatges. A na Mari Carmen i na Bragues, per la seva disponibilitat, eficiència i sobretot, la seva paciència. I a tots els becaris amb els qui he compartit tantes coses: David, Fernando, Basu, Albert, Toni, Benjamín, Marta, Miriam, Mari i un llarg etc. I a les meves nines: Lilia, *in ch Allah hubiera más gente como tú*. Lucía, *nunca olvidaré la alegría de verte cuando las noches de curro acudías a mi lab con una canción y algo para comer. Gracias a las dos por estar siempre allí, para lo bueno y para lo malo. Os quiero un montón!*

A n'Anna Proenza, *por darme la oportunidad de coger una pipeta por primera vez y explicarme la bioquímica con tanta ilusión. Gracias.* A na Joana Ramis, la meva mentora, amb qui he compartit molt més que ciència.

Vaig començar a fer la tesi al dia següent de venir a viure a Barcelona així que també m'agradaria donar les gràcies a tots els que han format part d'aquesta etapa, ajudant-me a tirar endavant: Oscar, *que suerte reencontrarte!* Jaume, Abel i Maria, Pep i Noemí. Gràcies per fer-me sentir com a casa.

Als de Mallorca: Clara, perquè el temps i la distància no mustien la nostra amistat. Als biòlegs, especialment, n'Alfons i na Laura, na Sílvia i en Miquel, en Gabi, na Maria i en Toni Frau, per mantenir viu el record, nostàlgia d'un temps que no tornarà. I en Miquel Àngel i na Miriam (*nunca te dije cuanto te he echado de menos...*), amb qui puc dir que ho he compartit absolutament tot, casa, viatges, festa i depressió, il·lusions i desil·lusions, gràcies per formar part del meu jo, aquí i allà, per sempre. En Joan, na Sandra i na Trini, per ser part d'aquell paradís tan enyorat anomenat Barcarès i per compartir mil i una nits al costat de la mar.

Aïda i Alberto, tan de bo us tinguéssim més a prop...lluny queden aquelles tardes de cartes, quan fumaven d'amagat. José Maria (*igualito a David*) i Maribel, *por vuestra nobleza y sinceridad*. Montse, pels *tuppers* (boníssims!!!), per tractar-me com a una filla, per rompre el mite de la sogra dolenta i perquè malgrat tot sempre tens un somriure.

A la meva família, pilar fonamental de la meva vida. A ses nines, Uxía i Auba, per la pau que em dona pensar amb voltros quan estic enfonsada. A na Mònica, *eres la hermana que siempre habría deseado tener*. I a en Pedro, que has fet de germà, pare i amic. Per la teva manera sempre optimista de veure les coses. Perquè sense tu jo no soc ningú i, probablement, no hagués arribat on he arribat. Als meus pares, que m'ho han donat tot. Gràcies papà per ensenyar-me a tirar pedres a la lluna i per ser com ets, generós, entusiasta, sensible i de les persones amb el cor més gran del món. Mamà, tan enyorada mamà, tan dolça, exemple de fortalesa, m'has ensenyat a posar il·lusió en les petites coses...Gràcies als dos perquè m'heu donat les ales i m'heu ensenyat a volar. I sobretot, per fer-me saber que sempre puc tornar al meu nieró.

A en David (el meu *Amore Preciós*), la millor cosa que m'ha passat en la vida. Perquè cada matí m'has despertat amb "*l'ildo*" i un enorme somriure. Perquè cada nit m'has abraçat. Perquè ho deixes tot per estar al meu costat. Perquè sempre has fet possible lo impossible. Perquè m'has estimat i has fet de la meva vida un món millor.

Xisca



## **PRESENTACIÓ I OBJECTIUS**



La cetogènesi és un procés mitocondrial a partir del qual es sintetitzen els cossos cetònics: acetona, acetoacetat i 3-hidroxibutirat, que són emprats com a font d'energia en el mitocondri dels teixits extrahepàtics a través de l'acció de la Succinil-CoA:3-cetoàcid-CoA transferasa (SCOT). Alternativament, en el citosol de teixits lipogènics, l'acetoacetat pot ser activat a acetoacetil-CoA, a través de l'enzim Acetoacetil-CoA sintetasa (AACS), proporcionant unitats acetil-CoA de manera independent i anàloga al citrat produït en el mitocondri, transferit al citosol i escindit per l'ATP-citrat liasa.

Clàssicament s'ha descrit el metabolisme dels cossos cetònics com un equilibri entre la cetogènesi hepàtica i la utilització perifèrica. Però la presència de l'activitat acetoacetil-CoA sintetasa en el citosol de fetge, demostra que tant la biosíntesi com la utilització de cossos cetònics poden tenir lloc a nivell hepàtic. El gen AACS també s'expressa, de manera abundant, en teixit adipós i en cervell, i en molts altres teixits com el pulmó, la melsa, el cor, el pàncrees i el ronyó. Els nivells d'expressió del gen AACS estan finament regulats en resposta a diferents estímuls o situacions metabòliques com ara el desenvolupament, l'administració de composts hipocolesterogènics, la diferenciació adipocitària o la diabetis. A més, la seva expressió està conservada al llarg de l'escala evolutiva i, en el nematode *Caenorhabditis elegans*, el seu ortòleg SUR-5, inhibeix la via de senyalització de Ras, contribuint al desenvolupament de la vulva. No obstant això, el paper fisiològic del gen AACS és totalment desconegut.

Els objectius d'aquesta tesi han estat:

- Estudi de la funcionalitat de la seqüència del cDNA del gen AACS humà predit.
- Estudi de les modificacions posttraduccionals de la proteïna AACS humana.
- Aportació al procés de la colesterogènesi del gen AACS humà.
- Estudi dels mecanismes de regulació transcripcional del gen AACS humà.
- Regulació de l'expressió del gen AACS de rata en diferents situacions fisiològiques: ritme circadiari.



**ÍNDEX**



<b>I. INTRODUCCIÓ</b>	1
<b>DE LA CETOGÈNESI A LA SÍNTESI LIPÍDICA</b>	3
1. La cetogènesi	3
2. Vies d'utilització de cossos cetònics	5
3. Biosíntesi lipídica a partir de cossos cetònics	6
<b>ACETOACETIL-CoA SINTETASA</b>	7
1. Generalitats	7
1.1. Purificació de l'enzim acetoacetil-CoA sintetasa	7
1.2. Predicció del cDNA de l'acetoacetil-CoA sintetasa	7
1.3. Organització gènica	8
2. Expressió	8
2.1. Fetge	8
2.2. Teixit adipós	9
2.3. Cervell	9
3. Activitat enzimàtica i característiques cinètiques	10
3.1. Putatius dominis importants per a l'activitat AACCS	11
3.1.1. Motiu d'unió a AMP	11
3.1.2. Regió rica en metionina i triptòfan	11
3.1.3. Identificació del motiu 2	12
3.1.4. Motiu PX4GK	12
3.2. Regulació de l'activitat enzimàtica	13
3.2.1. Regulació per substrat i producte de la reacció	13
3.2.2. Regulació per acil-CoAs	13
3.2.3. Regulació fisiològica	14
3.2.4. Diabetis	14
3.2.5. Regulació per composts hipocolesterogènics	14
4. Regulació transcripcional	15
5. Secreció d'insulina	15
6. Sur-5	16
<b>CONTROL TRANSCRIPCIONAL</b>	17
<b>FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN LA REGULACIÓ GÈNICA</b>	19
1. Factors de transcripció de la família Sp	19
1.1. La família de proteïnes Sp/KLF	19
1.2. Característiques estructurals de la família Sp	20
1.3 Sp1	21
1.4. Interaccions cooperatives entre Sp1 i altres proteïnes	22
2. <i>Sterol Regulatory element-binding proteins</i>	23
2.1. Regulació dels SREBPs	24
2.1.1. Control transcripcional	24
2.1.2. Activació per escissió proteolítica dels SREBPs	25

2.1.3. Modificacions posttraduccionals	28
2.2. Especificitat de les diferents isoformes per a l'activació de la transcripció	28
3. Receptors nuclears	29
3.1. Generalitats	29
3.1.1. Estructura	30
3.1.2. Mecanisme d'acció	31
4. <i>Liver-X-receptors</i> (LXR)	33
4.1. Regulació i control d'LXR	35
4.2. Funcions biològiques	36
4.2.1. Homeòstasi del colesterol	36
4.2.2. Lipogènesi	37
4.2.3. LXR en el metabolisme d'hidrats de carboni	38
5. Receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR)	38
5.1. Regulació i control	41
5.2. Patró d'expressió i principals funcions biològiques dels diferents isotips de PPAR	42
5.2.1. PPAR $\alpha$	42
5.2.2. PPAR $\delta$	44
5.2.2. PPAR $\gamma$	45
<b>EL TEIXIT ADIPÓS</b>	50
1. Diferenciació del teixit adipós	51
2. Control transcripcional de la diferenciació adipocitària	52
2.1. PPAR $\gamma$	52
2.2. Família C/EBP	53
2.3. ADD1/SREBP-1c	55
<b>RITMES CIRCADIARIS</b>	56
1. Mecanisme molecular del rellotge circadiari	56
2. L'estímul de llum en el nucli supraquiasmàtic (NSQ)	58
3. Oscil·ladors perifèrics	59
<b>II. MATERIALS I MÈTODES</b>	63
<b>MATERIALS</b>	65
1. Soques bacterianes	65
2. Línies cel·lulars establertes	66
3. Animals	66
4. Vectors	67
4.1. Vectors de subclonatge i anàlisi de DNA	67
4.2. Vectors d'expressió procariota	67
4.3. Vectors d'expressió eucariota	68
4.4. Vectors reporters	68



5. Oligonucleòtids	69
6. Anticossos	69
7. Reactius	70
7.1. Reactius utilitzats en cultius cel·lulars	70
7.2. Composts radioactius	72
7.3. Marcadors de pes molecular	72
7.4. Altres reactius	73
8. Eines informàtiques	73
<b>MÈTODES</b>	74
1. Obtenció de DNA	74
1.1. Cultius bacterians	74
1.2. Preparació de DNA plasmídic	74
1.3. Preparació de DNA genòmic de cultius cel·lulars	75
1.4. Extracció de proteïnes, precipitació i quantificació del DNA	75
1.4.1. Extracció de proteïnes	75
1.4.2. Precipitació del DNA	76
1.4.3. Quantificació del DNA	76
1.5. Resolució, identificació i purificació de fragments de DNA	76
1.5.1. Separació de fragments de DNA en gels d'agarosa/TAE/bromur d'etidi	76
1.5.2. Purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa	77
2. Modificació enzimàtica del DNA	77
2.1. Digestió de DNA	77
2.2. Desfosforilació del DNA	78
2.3. Generació d'extrems roms per ompliment ( <i>Fill-in</i> )	78
2.4. Lligació de DNA	78
2.5. Marcatge radioactiu de molècules de DNA: <i>Random Primed</i>	79
3. Construcció de molècules de DNA recombinant	79
3.1. Subclonatge de fragments de DNA	79
3.2. Transformació de cèl·lules <i>d'E.coli</i> : mètode del CaCl <sub>2</sub>	79
3.3. Selecció de plasmidis recombinants	80
4. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	80
4.1. Amplificació de DNA	81
4.2. PCR-prep	82
4.3. Mutagènesi dirigida de DNA mitjançant la tècnica de la PCR	83
4.3.1. Introducció de dianes de restricció	83
4.3.2. Introducció de mutacions puntuals	83
5. Seqüenciació automàtica de DNA	84
6. Preparació i anàlisi d'RNA	84
6.1. Preparació d'RNA total	84

6.2. Quantificació d'RNA total	85
6.3. <i>Northern blot</i> (hibridació DNA-RNA)	85
6.3.1. Separació electroforètica d'RNA en gel desnaturalitzant d'agarosa/formaldehid	85
6.3.2. Transferència a suport sòlid i immobilització	86
6.3.3. Marcatge i purificació de la sonda	87
6.3.4. Hibridació	87
6.4. RT-PCR	88
6.5. PCR en temps real	89
7. Obtenció i anàlisi de proteïnes	90
7.1. Obtenció d'extracte cru de proteïnes a partir de cèl·lules en cultiu	90
7.2. Quantificació de proteïnes: mètode de Bradford	91
7.3. Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	91
7.4. Anàlisi de proteïnes per tinció <i>Comassie Blue</i>	92
7.5. Anàlisi de proteïnes per immunotransferència: <i>Western Blot</i>	93
7.6. Immunoprecipitació de proteïnes	94
7.6.1. Immunoprecipitació de proteïnes a partir d'extractes totals	94
7.6.2. Assajos d'immunoprecipitació de cromatina ( <i>ChIPs</i> )	95
8. Obtenció d'anticossos	99
8.1. Síntesi de l'immunogen, inoculació i sagnat dels conills	99
8.2. Purificació de les Immunoglobulines	99
8.3. Anàlisi dels anticossos mitjançant la tècnica de <i>Western blot</i>	99
9. Expressió i purificació de proteïnes de fusió	100
9.1. Inducció dels cultius	101
9.2. Obtenció de proteïnes	101
10. Assaig AACS	102
10.1. $K_m$ per acetoacetat	102
10.2. $K_m$ per ATP	102
10.3. $K_m$ per CoA	103
11. Transcripció i traducció <i>in vitro</i>	103
12. Assaig de GST <i>pull-down</i>	103
12.1. Reacció d'unió	104
12.2. Recuperació dels complexos proteïna GST i detecció de la interacció	104
12.3. Fluorografia	104
13. Experiments de <i>pull-down</i> amb oligos biotinitats	105
13.1. <i>Annealing</i> dels oligonucleòtids biotinitats	105
13.2. Obtenció dels extractes proteics	105
13.3. Reacció d'unió de la proteïna al DNA biotinitat	106

13.4. Recuperació dels complexos proteïna-DNA biotinitat i identificació de les proteïnes implicades	106
14. Anàlisi de lípids: experiments d'incorporació de <sup>14</sup> C acetat a colesterol	106
14.1. Incubació de les cèl·lules amb [1- <sup>14</sup> C] àcid acètic	106
14.2. Extracció de lípids	107
14.3. Sistema cromatogràfic	107
15. Cultius cel·lulars	107
15.1. Línies cel·lulars establertes	107
15.1.1. Condicions de cultiu	107
15.1.2. Congelació de cèl·lules	108
15.1.3. Descongelació de cèl·lules	108
15.1.4. Línia cel·lular 3T3L1	108
15.2. Cultius primaris	109
15.2.1. Cultiu primari de teixit adipós	109
15.2.2. Obtenció d'hepatòcits	111
16. Transfeccions cel·lulars	113
16.1. Transfecció transitòria	113
16.1.1. Mètode del fosfat càlcic	114
16.1.2. Mètode de formació de liposomes	115
16.2. Transfecció estable: <i>BD<sup>TM</sup> Tet-On Gene Expression Systems</i>	116
16.3. Obtenció d'extractes nuclears i assaig dual d'activitat Luciferasa- <i>Renilla</i>	118
17. Experimentació animal	118
17.1. Estudi de l'expressió del gen Acetoacetyl-CoA sintetasa (AACS) durant el ritme circadiari en rates Sprague-Dawley adultes	118
17.2. Efecte de la realimentació	119
17.3. Efecte de l'administració d'insulina	119
17.4. Estudi de l'expressió del gen AACS en resposta al dejuni i realimentació en rates Sprague-Dawley adultes	119
17.4.1. Determinació de cossos cetònics en plasma	120
17.5. Estudi de la regulació del gen AACS pel factor de transcripció PPAR $\gamma$ en rates Sprague-Dawley	120
<b>III. RESULTATS</b>	123
<b>ESTUDIS AMB LA PROTEÏNA AACS HUMANA</b>	125
<b>DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES CINÈTICS DE LA PROTEÏNA AACS HUMANA</b>	127
1. Clonatge del cDNA del gen AACS humà	127
2. Expressió i purificació de l'AACS humana recombinant	127
3. Estudis cinètics amb la proteïna AACS humana	128
3.1. Determinació de la $K_m$ per l'acetoacetat	129

3.2. Determinació de la $K_m$ per l'ATP	130
3.3. Determinació de la $K_m$ pel CoA	130
UTILITZACIÓ DE COSSOS CETÒNICS PER A LA COLESTEROGÈNESI	132
4. Obtenció d'una línia estable induïble per Doxíciclina: <i>BD<sup>TM</sup> Tet-On</i>	
<i>Gene Expression system</i>	133
5. Efecte de la sobreexpressió del gen AACS en la síntesi d'esterols	134
6. Efecte de l'acetoacetat en la síntesi d'esterols	135
7. Efecte del 3-hidroxiubutirat en la síntesi d'esterols	137
ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE L'AACS I L'HMGCS1	139
8. Clonatge del cDNA del gen HMGCS1 de hàmsster	139
9. Expressió i purificació de la proteïna HMGCS1 de hàmsster recombinant	139
10. Anàlisi de la interacció directa entre les proteïnes AACS i HMGCS1	140
11. Estudi de la interacció a través d'un complex multiproteic	141
ACETILACIÓ REVERSIBLE DE LISINES	143
12. Estudi de l'acetilació de la proteïna AACS humana	143
13. Identificació de la Lys633 de l'enzim AACS humà com a putatiu lloc d'acetilació	145
14. Altres putatius llocs d'acetilació	147
<b>REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS HUMÀ</b>	149
CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN AACS HUMÀ	151
1. Clonatge del promotor del gen AACS humà	151
2. Activitat del promotor del gen AACS	152
3. Identificació de l'extrem 5' de l'mRNA de l'AACS humana	153
4. Descripció dels elements necessaris per a l'activitat basal del promotor AACS humà	154
5. Paper de les caixes GC en el promotor proximal del gen AACS humà	156
6. Caracterització dels llocs d'unió a Sp1	157
8. Efecte de la mitramicina en l'activitat basal	158
ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS PER LXR	159
9. Identificació d'un putatiu LXRE dins d'un element <i>A/u</i> en el promotor del gen AACS humà	159
10. Expressió del gen AACS en resposta al tractament amb un agonista sintètic d'LXR	161
ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS PER SREBP	163
11. Efecte de la depleció d'esterols en l'expressió de la AACS	164
12. Assajos de gen-reporter	166
ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS EN EL TEIXIT ADIPÓS	168
13. Anàlisi de l'expressió del gen AACS durant la diferenciació adipocitària	168
13.1. Estudis realitzats en la línia cel·lular 3T3L1	168
13.2. Estudis realitzats en cultiu primari de teixit adipós de rata	169
14. L'agonista de PPAR $\gamma$ , rosiglitazona, indueix l'expressió del gen AACS	171
14.1. Estudis realitzats en la línia cel·lular 3T3-F422A	171

14.2. Estudis realitzats <i>in vivo</i>	172
15. PPAR $\gamma$ promou l'expressió de l'AACS a nivell transcripcional	172
16. La regió rica en GC del promotor del gen AACS és responsable de l'activació transcripcional produïda per PPAR $\gamma$	173
17. Interacció directa proteïna-proteïna entre PPAR $\gamma$ i Sp1	174
18. Caracterització dels llocs d'unió a PPAR $\gamma$	175
19. La unió d'Sp1 a les caixes GC no és dependent de rosiglitazona	177
20. Efecte de la mitramicina en la transactivació del promotor del gen AACS per PPAR $\gamma$	178
<b>RITME CIRCADIARI</b>	179
1. Patró d'expressió del gen AACS en rates	181
2. Ritme circadiari	182
3. Estudi de la regulació del gen AACS per PGC1 $\alpha$	184
4. Estudi de la regulació del gen AACS pels receptors nuclears ROR $\alpha$ i Rev-erb $\alpha$	185
5. Restricció temporal del menjar i ritme circadiari	186
6. Insulina i ritme circadiari	187
7. Experiments de realimentació durant la fase lumínica	188
<b>IV. DISCUSSIÓ</b>	191
1. Determinació dels paràmetres cinètics de la proteïna AACS humana	193
2. Utilització de cossos cetònics per a la colesterolgènesi	195
3. Estudi de la interacció entre l'AACS i l'HMGCS1	196
4. L'acetilació reversible de lisines	197
5. Caracterització del promotor del gen AACS humà	199
6. Estudi de la regulació transcripcional del gen AACS per LXR	201
7. Estudi de la regulació transcripcional del gen AACS per SREBP	203
8. Estudi de la regulació transcripcional del gen AACS en el teixit adipós	205
9. Ritme circadiari	209
<b>V. CONCLUSIONS</b>	213
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	217
<b>VII. APÈNDIX</b>	263
1. Abreviatures	265
2. Oligonucleòtids	271
2.1. Oligonucleòtids que hibriden amb vectors	271
2.2. Homòlegs a la seqüència genòmica del gen AACS humà	271
2.3. Homòlegs a la seqüència del cDNA de l'AACS humà	272
2.4. Oligonucleòtids emprats en experiments de <i>ChIP</i>	272
2.5. Oligonucleòtids emprats en experiments de <i>pull-down</i>	272
2.6. Altres oligonucleòtids	273

3. Construccions	273
3.1. Plasmidis reporters luc amb el gen AACS humà	273
3.2. Altres plasmidis reporters luc	275
3.3. Construccions amb el cDNA de l'AACS humà	275
3.4. Altres plasmidis d'expressió	276
3.5. Sondes emprades en experiments de <i>Northern Blot</i>	277

## **INTRODUCCIÓ**



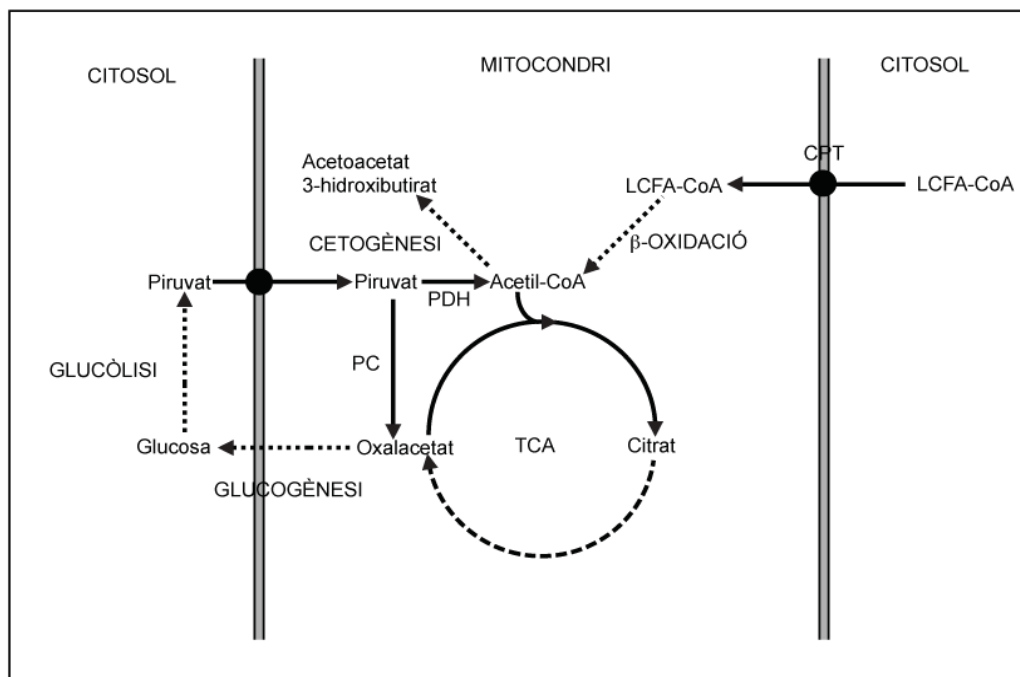


# DE LA CETOGÈNESI A LA SÍNTESI LIPÍDICA

## 1. LA CETOGÈNESI.

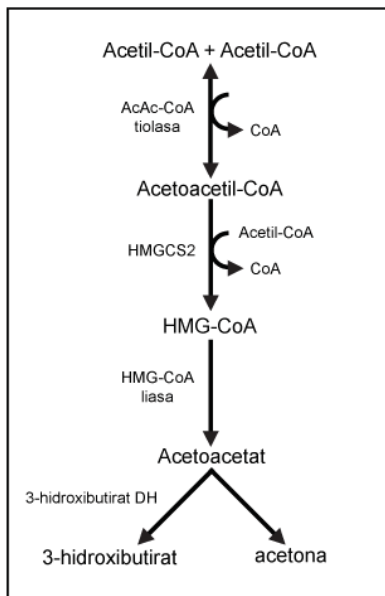
La cetogènesi és un procés mitocondrial a partir del qual es sintetitzen els cossos cetònics: acetona, acetoacetat i 3-hidroxibutirat. Te lloc principalment en el fetge i constitueix tant un mecanisme d'estalvi de glucosa com una via de substrats lipogènics.

En el fetge, quan la degradació d'hidrats de carboni i lípids es manté equilibrada, l'acetil-CoA procedent de l'oxidació d'àcids grassos, és incorporat al cicle de *Krebs* per a ser oxidat a  $\text{CO}_2$  i generar energia. En canvi, quan els nivells de glucosa són baixos i, per tant, predomina la degradació de greixos, l'oxalacetat del cicle de *Krebs* és reconduït cap a la gluconeogènesi per a la producció de glucosa. Això impedeix la incorporació de l'acetil-CoA al cicle de *Krebs*, llur destí metabòlic serà la via de síntesi dels cossos cetònics.



**FIGURA I-1. Metabolisme de la síntesi de cossos cetònics.** Quan la degradació d'hidrats de carboni i lípids es manté equilibrada, l'acetil-CoA procedent de la β-oxidació mitocondrial, és condensat amb l'oxalacetat procedent de la glucòlisi, per entrar en la via del cicle de *Krebs* i generar energia. Quan els nivells de glucosa són baixos, l'oxalacetat és canalitzat cap a la gluconeogènesi i l'acetil-CoA és emprat per a la síntesi de cossos cetònics. PC: Piruvat carboxilasa (6.4.1.1.); PDH: Piruvat deshidrogenasa (1.2.1.51.); CPT: Carnitina palmitoil transferasa (2.3.1.21.); LCFA: àcids grassos de cadena llarga; TCA: cicle dels àcids tricarboxílics (cicle de *Krebs*).

La cetogènesi a partir del *pool* mitocondrial d'acetil-CoA suposa la participació de quatre activitats enzimàtiques diferents (figura I-2):



**FIGURA I-2. Esquema de la via de síntesi de cossos cetònics.** La cetogènesi a partir de l'acetil-CoA mitocondrial te lloc en quatre reaccions seqüencials catalitzades pels enzims AcAc-CoA tiolasa (Acetoacetil-CoA tiolasa; E.C. 2.3.1.9.), HMGCS2 (HMG-CoA sintasa; E.C.(2.3.3.10.), HMG-CoA liasa (E.C.4.1.3.4.) i 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa; E.C.1.1.1.30).

En general, el terme de cossos cetònics s'empra per fer referència a l'acetoacetat i el D-3-hidroxiacetil-CoA ja que l'acetona, que es forma per ruptura no enzimàtica de l'acetoacetat, no te cap efecte fisiològic. La concentració de cossos cetònics en la sang representa el balanç entre la producció, principalment hepàtica, i la utilització en els teixits (inclòs el fetge). La concentració de cossos cetònics es veu incrementada tant en determinades situacions fisiològiques com ara el dejuni, l'alimentació amb dita rica en greix, l'exercici prolongat, l'embaràs i la lactància, com en determinades estats patològics, com per exemple la diabetis o la deficiència en l'enzim SCOT (Tildon *et al.*, 1972a) o l'acetoacetil-CoA tiolasa (Robinson *et al.*, 1979).

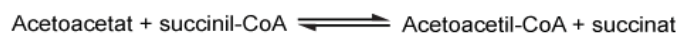
Situació	Concentració de cossos cetònics (mM)	
	Humà	Rata
Alimentat	~ 0.1	Fins a 0.3
Dejuni 12-24 h	Fins a 0.3	1-2
Dejuni 48-72 h	2-3	~ 2
Exercici	Fins a 2	Fins a 2
Embaràs	Fins a 1	Fins a 0.3
Nounat	0.5-1	0.5-1.5
Diabetis	Fins a 25	Fins a 10

**TAULA I-1. Concentració de cossos cetònics (acetoacetat i 3-hidroxiacetil-CoA) mesurats en sang.** Adaptat de Robinson *et al.*, 1980.

## 2. VIES D'UTILITZACIÓ DE COSSOS CETÒNICS.

Existeixen dues activitats enzimàtiques implicades en l'activació de l'acetoacetat: la succinil-CoA:3-cetoàcid coenzim A transferasa (E.C.2.8.3.5; SCOT) i l'acetoacetil-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.16; AACS).

En el mitocondri dels teixits extrahepàtics, l'SCOT transfereix el residu de CoA des del succinil-CoA a l'acetoacetat per produir acetoacetil-CoA, que serà emprat com a font d'energia (Tildon *et al.*, 1972b).

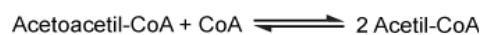


Per altra banda, en el citoplasma dels teixits lipogènics, l'acetoacetat és activat, per acció de l'enzim acetoacetil-CoA sintetasa (AACS), a acetoacetil-CoA, proporcionat unitats acetil-CoA per a la biosíntesi lipídica (Stern, 1971; Endemann *et al.*, 1982).



L'activitat de l'SCOT és superior a l'activitat de l'AACS en nombrosos teixits analitzats on s'expressen ambdós enzims, coincidint amb la funció principal dels cossos cetònics com a substrats energètics. No obstant això, l'afinitat de l'AACS per l'acetoacetat ( $K_m$  50  $\mu\text{M}$ ) és molt superior a la de l'SCOT ( $K_m$  0.3 mM). Ambdós enzims estan sotmesos a regulació per substrat però mentre que l'SCOT s'inhibeix per acetoacetat, l'AACS s'inhibeix per CoA (revisat per Robinson *et al.*, 1980).

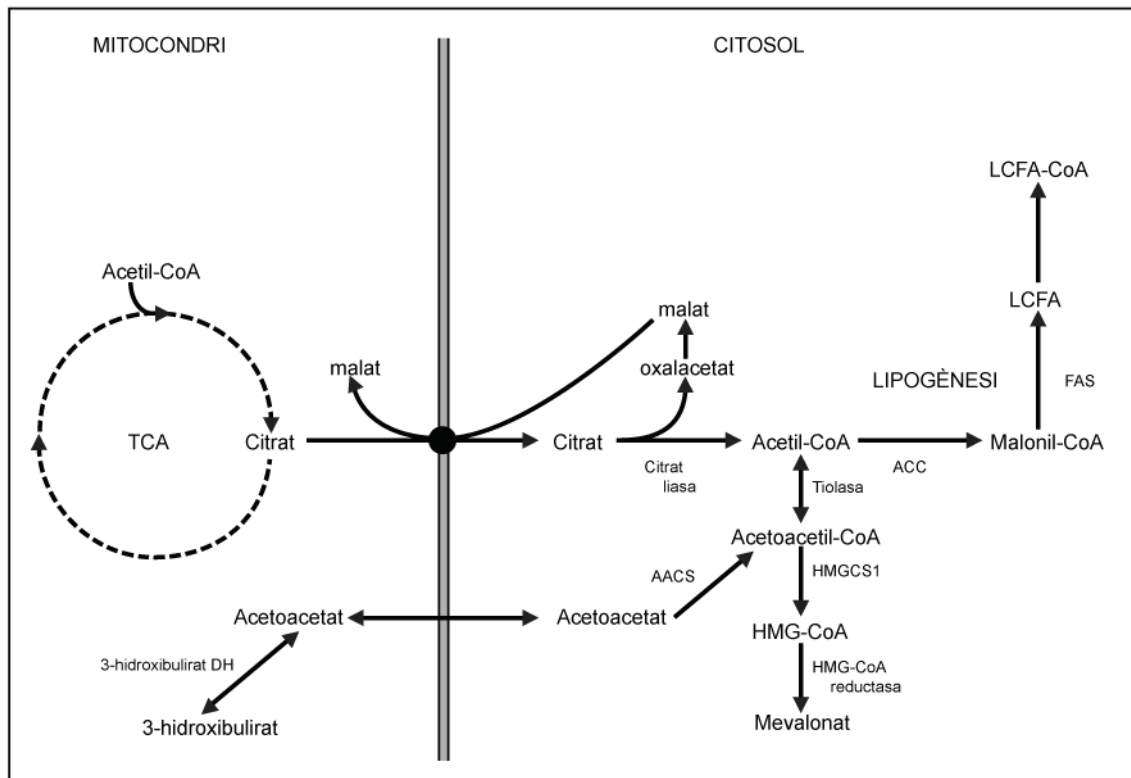
L'acetoacetil-CoA és escindit a acetil-CoA per la reacció catalitzada per l'acetoacetil-CoA tiolasa (E.C.2.3.1.9.) :



L'acetoacetil-CoA tiolasa es troba tant en el mitocondri com en el citosol de nombrosos teixits (Middleton *et al.*, 1973b). L'activitat mitocondrial és superior a la citosòlica i es correlaciona amb l'activitat de l'enzim SCOT (Williamson *et al.*, 1971). Ambdós formes, la citosòlica i la mitocondrial, tenen característiques cinètiques diferents; així, mentre que l'acetoacetil-CoA provoca inhibició per substrat de la forma mitocondrial, el CoA inhibeix l'enzim citosòlic (Middleton *et al.*, 1974; Clinkenbeard *et al.*, 1973; Huth *et al.*, 1975).

### 3. BIOSÍNTESI LIPÍDICA A PARTIR DE COSSOS CETÒNICS.

L'acetoacetyl-CoA, fruit de la reacció catalitzada per l'AACS, és un intermediari directe de la via de síntesi del mevalonat. A més, l'acetoacetyl-CoA també pot contribuir a la biosíntesi d'àcids grassos mitjançant l'acció seqüencial dels enzims acetoacetyl-CoA tiolasa i acetyl-CoA carboxilasa (ACC1) (figura I-3).



**FIGURA I-3. Biosíntesi lipídica a partir de cossos cetònics.** Un cop en el citosol, l'acetoacetyl-CoA és activat al seu tioèster per acció de l'acetoacetyl-CoA sintetasa. L'acetoacetyl-CoA és el primer intermediari de la síntesi del mevalonat. L'acetoacetyl-CoA, per acció de la tiolasa, pot ser escindit en dues unitats d'acetyl-CoA que poden contribuir a la biosíntesi d'àcids grassos. Per altra banda, el citrat procedent del cicle de *Krebs*, és transferit al citosol i a través de l'acció de l'enzim citrat liasa, es escindit a acetyl-CoA que contribuirà a la síntesi lipídica. ACC: acetyl-CoA carboxilasa (6.4.1.2.); FAS: àcid gras sintasa (2.3.1.85.); AACS: acetoacetyl-CoA sintetasa (E.C. 6.2.1.16); HMGCS1: HMG-CoA sintetasa citosòlica (2.3.3.10.); 3-hidroxiacetyl-CoA DH: 3-hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa (E.C.1.1.1.30); LCFA: àcids grassos de cadena llarga; TCA: cicle dels àcids tricarbòxics (cicle de *Krebs*).

# ACETOACETIL-CoA SINTETASA

Clàssicament s'ha descrit el metabolisme dels cossos cetònics com un equilibri entre la cetogènesi hepàtica i la utilització perifèrica. Però fa gairebé 4 dècades, Stern (1971) va descriure la presència de l'activitat acetoacetil-CoA sintetasa en el citosol de fetge, demostrant que tant la biosíntesi com la utilització de cossos cetònics poden tenir lloc a nivell hepàtic. En aquest treball es suggereix que l'acetoacetat podria estar actuant com un transportador d'unitats acetil-CoA des del mitocondri cap al citoplasma, de manera anàloga al citrat produït en el mitocondri, transferit al citoplasma i escindit per l'ATP citrat liasa (Watson *et al.*, 1970).

Aquesta hipòtesi fou corroborada en diferents estudis realitzats en la dècada dels 70s, en teixits com ara el fetge, cervell i el ronyó, a partir de cossos cetònics marcats radioactivament on es mostra que l'acetoacetat i el 3-hidroxibutirat són millors precursors per a la biosíntesi lipídica que no pas la glucosa (Edmond, 1974; Webber *et al.*, 1977; 1979; Patel *et al.*, 1977; Yeh *et al.*, 1977).

## 1. GENERALITATS.

### 1.1. Purificació de l'enzim acetoacetil-CoA sintetasa.

L'AACS es purificà l'any 1982 a partir del bacteri *Zoogloea ramigera* I-16-M (Fukui *et al.*, 1982) obtenint-se una proteïna de 70.000 Da. Poc després, el mateix grup investigador purificà l'enzim AACS a partir de fetge de rata (Ito *et al.*, 1984), obtenint una proteïna amb un pes molecular semblant (71.000 Da).

### 1.2. Predicció del cDNA de l'acetoacetil-CoA sintetasa.

L'any 2000 s'aïllà el cDNA de l'AACS a partir del bacteri *Sinorhizobium meliloti* (Cai *et al.*, 2000) predient una proteïna de 650 aminoàcids (71.370 Da). El cDNA de rata va aïllar-se poc després a partir d'una llibreria de cDNA de fetge de rates alimentades amb una dieta suplementada amb 0.4% pravastatina i 4% colestiramida (Iwahori *et al.*, 2000). En aquest cas es va predire una proteïna de 672 aminoàcids (75.039 Da). El cDNA humà s'aïllà l'any 2003 (Ohgami *et al.*, 2003) predient una proteïna d'igual pes que la de rata i amb un 89.3% d'identitat en la seqüència nucleotídica.

### 1.3. Organització gènica.

El gen AACS humà es localitza en el cromosoma 12q24.31. Presenta una març obert de lectura de 2018 pb organitzat en 18 exons separats per 17 introns de longituds molt diferents amb seqüències 5' i 3' no traduïdes (132 i 1096 pb, respectivament).

## 2. EXPRESSIÓ.

En rates, l'acetoacetil-CoA sintetasa s'expressa principalment en els teixits lipogènics encara que la seva expressió també ha sigut descrita en altres teixits com ara el pulmó, la melsa, el cor, el pàncrees i el ronyó (Ito *et al.*, 1986). En humans, a més d'observar-se elevats nivells d'expressió en teixits lipogènics, l'AACS també s'expressa de manera abundant en cor i ronyó (Ohgami *et al.*, 2003).

### 2.1. Fetge.

Malgrat que la via del citrat és la via predominant per a la translocació d'unitats acetil a través de la membrana mitocondrial en fetge, diferents estudis realitzats *in vitro* (Geelen *et al.*, 1983; Endemann *et al.*, 1982) i *in vivo* (Bergstrom *et al.*, 1984) mostren que l'acetoacetat, un cop activat a acetoacetil-CoA per acció de l'AACS, és emprat per a la biosíntesi lipídica, principalment per a la colesterogènesi.

L'expressió del gen AACS disminueix dràsticament després del naixement i continua disminuint durant el període de lactància en el fetge de rata. Quan els animals són deslletats, l'activitat enzimàtica s'incrementa ràpidament fins assolir els valors de l'animal adult (Buckley *et al.*, 1975; Nakamoto *et al.*, 1999). Aquest patró d'expressió de l'AACS durant el desenvolupament és semblant al descrit per altres enzims lipogènics (Volpe *et al.*, 1972; McNamara *et al.*, 1972) però contrasta amb l'elevada capacitat que té el fetge de l'animal lactant, comparat amb l'adult, per a produir cossos cetònics.

A més, l'activitat enzimàtica de l'AACS disminueix durant el dejuni (Stern, 1971; Buckley *et al.*, 1975) i està sotmesa a regulació diürna (Bergstrom *et al.*, 1982), observant-se una patró circadiari paral·lel al descrit per l'HMG-CoA reductasa (Edwards *et al.*, 1972).

## 2.2. Teixit adipós.

L'acetoacetil-CoA sintetasa s'expressa de manera abundant tant en el teixit adipós blanc (TAB) com en el teixit adipós marró (TAM), mostrant un patró d'expressió durant el desenvolupament semblant al descrit pel fetge (Williamson *et al.*, 1985; Yamasaki *et al.*, 2005). En el TAB, l'AACS s'expressa principalment en el dipòsit subcutani, on s'indueix durant la diferenciació adipocitària (Yamasaki *et al.*, 2005).

L'expressió del gen AACS es troba alterada per l'obesitat. Així, en rates genèticament obeses (*Zucker fatty*) tant els nivells de cossos cetònics en sang com l'expressió de l'AACS en TAB es veuen disminuïts. Al contrari, en rates a les que s'ha induït l'obesitat mitjançant alimentació amb una dieta rica en greix, s'incrementen tant els nivells de cossos cetònics circulants com l'expressió de l'AACS en TAB (Yamasaki *et al.*, 2007).

## 2.3. Cervell.

La rata lactant representa un model natural de cetosi degut a l'elevat contingut en àcids grassos presents en la llet materna. En el cervell immadur de la rata, els cossos cetònics són emprats per al metabolisme energètic i per a la biosíntesi d'aminoàcids i lípids (Patel *et al.*, 1977; Yeh *et al.*, 1977).

L'activitat de l'acetoacetil-CoA sintetasa en cervell és elevada en el naixement, disminueix gradualment durant la lactància, i ho fa molt ràpidament en rates deslletades, assolint uns nivells 3 vegades inferiors en l'adult que en el nouat (Buckley *et al.*, 1973). Aquest patró d'expressió del gen AACS durant el desenvolupament és paral·lel al descrit per a l'acetoacetil-CoA tiolasa citosòlica (Middleton, 1973a). L'elevada activitat d'ambdós enzims coincideix amb l'elevada taxa de síntesi d'esterols i d'àcids grassos que és necessària per a la formació de noves membranes cel·lulars i per al procés de mielogènesi que té lloc durant les primeres etapes del desenvolupament del cervell (Norton *et al.*, 1973; Lopes-Cardozo *et al.*, 1984; revisat per Nehlig, 2003).

Més recentment s'ha descrit que en humans el gen AACS s'expressa en cervell, concretament en l'hipocamp, l'amígdala i el tàlem, i que aquest patró d'expressió coincideix amb el descrit per l'HMG-CoA reductasa (Ohgami *et al.*, 2002).

### 3. ACTIVITAT ENZIMÀTICA I CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES.

Els estudis cinètics de l'acetoacetil-CoA sintetasa s'han dut a terme tant en l'enzim purificat com en extractes citosòlics, donant lloc, en aquest darrer cas, a valors molt dispersos entre els diferents autors.

L'assaig de l'activitat AACS en extractes citosòlics de teixits és complicat per la presència dels elevats nivells de l'acetoacetil-CoA tiolasa, que ràpidament escindeix l'acetoacetil-CoA a acetil-CoA. Així, l'assaig de l'activitat AACS en extractes citosòlics depèn de la quantificació de l'acetil-CoA produït (Buckley *et al.*, 1973).

La purificació de l'enzim AACS a partir de *Z. ramigera* (Fukui *et al.*, 1982) i, posteriorment, a partir de rata (Ito *et al.*, 1984) han permès la seva caracterització. Per això, s'han emprat diferents aproximacions, totes elles espectrofotomètriques, que consisteixen en la mesura de la producció d'acetoacetil-CoA, en la mesura de la conversió de NADH a NAD (quan s'acobla la producció d'acetoacetil-CoA a l'activitat L(+)-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) i en la mesura de la producció d'AMP.

Quan l'enzim purificat s'incuba amb acetoacetat, ATP i CoA, en presència de  $Mg^{2+}$  i  $K^+$ , els únics productes de la reacció formats són acetoacetil-CoA, AMP i  $PP_i$  en quantitats aproximadament equimolars. No es produeix ni ADP ni  $P_i$ , suggerint que l'enzim forma part de la família acil:CoA ligasa, *formador d'AMP*.

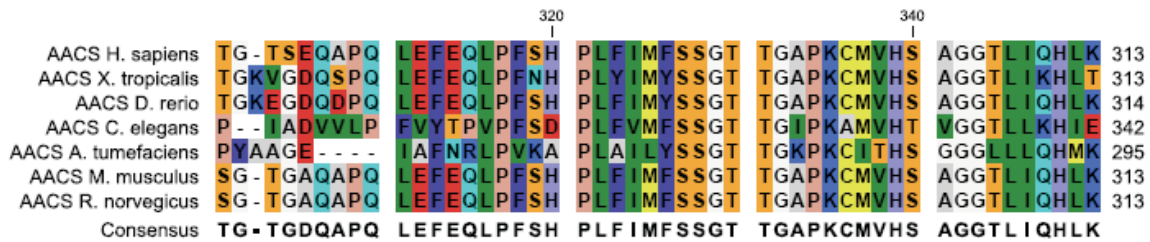
Els únics substrats que activen l'enzim purificat són l'acetoacetat i el L(+)-3-hidroxiacil-CoA. Els valors de  $K_m$  per l'enzim purificat a partir de *Z. ramigera* són de 76  $\mu M$ , 33  $\mu M$ , 9.1  $\mu M$  i 1.4 mM per l'acetoacetat, l'ATP, el CoA i el L(+)-3-hidroxiacil-CoA, respectivament. Per l'enzim purificat a partir de rata, els valors de  $K_m$  determinats són de 8  $\mu M$ , 60  $\mu M$ , 10  $\mu M$  i 75  $\mu M$  per l'acetoacetat, l'ATP, el CoA i el L(+)-3-hidroxiacil-CoA, respectivament. La determinació de la  $K_m$  per l'acetoacetat de l'enzim AACS de rata ha sigut determinada en altres treballs a partir d'extractes crus de fetge obtenint-se els valors de 54  $\mu M$  i 70  $\mu M$  (Bergstrom *et al.*, 1982; 1985). Aquestes diferències podrien ser degudes a diferències en el mètode i condicions d'assaig emprades.



### 3.1. Putatius dominis importants per a l'activitat AACS.

#### 3.1.1. Motiu d'unió a AMP.

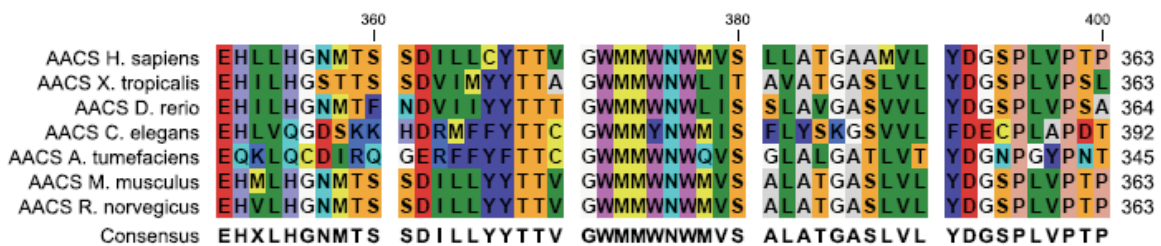
El domini d'unió a AMP es troba conservat en enzims de procariotes i eucariotes que catalitzen la reacció mitjançant la unió covalent d'AMP, dependent d'ATP, al seu substrat (Babbitt *et al.*, 1992; Conti *et al.*, 1996).



**FIGURA I-4. El motiu d'unió a AMP es troba conservat entre les diferents espècies.** Alineament de seqüències múltiple del motiu d'unió a AMP (substratllat) de l'acetoacetyl-CoA sintetasa de diferents espècies: *Rattus norvegicus* (gi:81906806); *Mus musculus* (gi:81904891); *Homo sapiens* (gi:74750446); *Xenopus tropicalis* (gi:123892212); *Danio rerio* (gi:166198270); *Caenorhabditis elegans* (sur-5; gi:74965144); *Agrobacterium tumefaciens* (gi: 15159138).

#### 3.1.2. Regió rica en metionina i triptòfan.

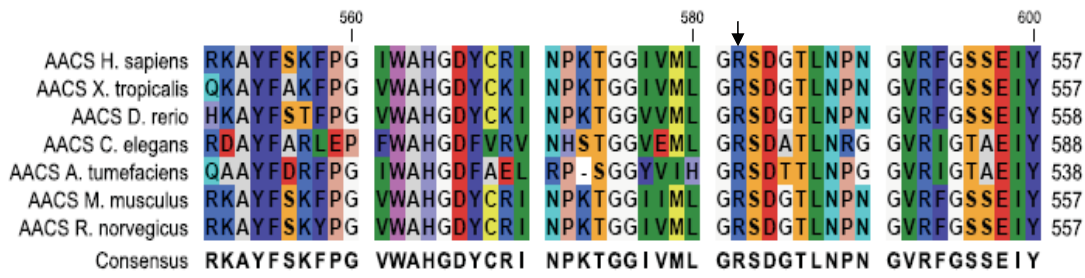
La regió rica en metionina i triptòfan es troba conservada en la proteïna AACS al llarg de l'evolució. Mitjançant la base de dades de proteïna *BLAST* únicament es troba una seqüència semblant en l'acetyl-CoA sintetasa (ACS) d'origen microbià (Ohgami *et al.*, 2003). Com la metionina i el triptòfan són aminoàcids poc comuns en les seqüències proteïques, és possible que aquesta regió jugui un paper important en la funció relacionada amb l'activació d'àcids grassos de cadena curta (Ohgami *et al.*, 2003).



**FIGURA I-5. La regió rica en Met i Trp de l'AACS es troba conservada entre les diferents espècies.** Alineament de seqüències múltiple de la regió rica en Met (M) i Trp (W) (substratllat) de l'acetoacetyl-CoA sintetasa de diferents espècies: *Rattus norvegicus* (gi:81906806); *Mus musculus* (gi:81904891); *Homo sapiens* (gi:74750446); *Xenopus tropicalis* (gi:123892212); *Danio rerio* (gi:166198270); *Caenorhabditis elegans* (sur-5; gi:74965144); *Agrobacterium tumefaciens* (gi: 15159138).

### 3.1.3. Identificació del motiu 2.

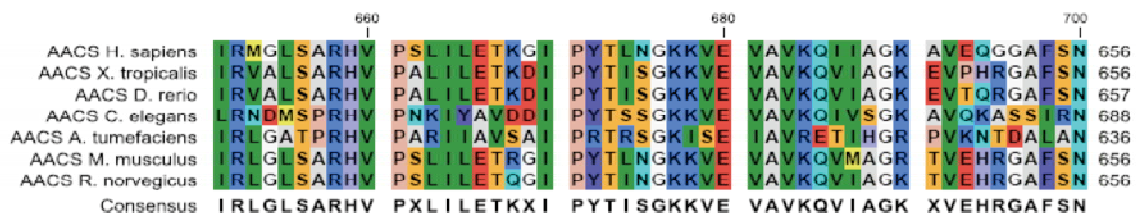
Aquesta regió de 37 aminoàcids anomenada motiu 2 per Watkins *et al.* (2007) és una regió conservada entre les acil-CoA sintetases (ACS), important per a l'especificitat de substrat, que conté un residu d'arginina invariable en totes les seqüències d'ACS analitzades.



**FIGURA I-6. El motiu 2 de l'AACS es troba conservat entre les diferents espècies.** Alineament de seqüències múltiple del motiu 2 (subratllat) de l'acetoacetyl-CoA sintetasa de diferents espècies: *Rattus norvegicus* (gi:81906806); *Mus musculus* (gi:81904891); *Homo sapiens* (gi:74750446); *Xenopus tropicalis* (gi:123892212); *Danio rerio* (gi:166198270); *Caenorhabditis elegans* (sur-5; gi:74965144); *Agrobacterium tumefaciens* (gi: 15159138). Amb fletxa s'indica el residu d'Arg conservat.

### 3.1.4. Motiu PX4GK.

En el centre actiu de la família de proteïnes acil:CoA ligasa, *formador d'AMP*, existeix un motiu conservat PX4GK on hi ha un residu de Lys identificat com a putatiu substrat d'acetilació (Starai *et al.*, 2002).



**FIGURA I-7. El motiu PX4GK de l'AACS es troba conservat entre les diferents espècies.** Alineament de seqüències múltiple del motiu PX4GK (P: prolina; X: qualsevol aminoàcid; G: glicina; K: lisina) (subratllat) de l'acetoacetyl-CoA sintetasa de diferents espècies (CLC Sequence Viewer 4.6.1.). Es marca el putatiu lloc d'acetilació amb una fletxa. *Rattus norvegicus* (gi:81906806); *Mus musculus* (gi:81904891); *Homo sapiens* (gi:74750446); *Xenopus tropicalis* (gi:123892212); *Danio rerio* (gi:166198270); *Caenorhabditis elegans* (sur-5; gi:74965144); *Agrobacterium tumefaciens* (gi: 15159138).

### 3.2. Regulació de l'activitat enzimàtica.

#### 3.2.1. Regulació per substrat i producte de la reacció.

L'activitat enzimàtica de l'AACS és inhibida pel coenzim A (Ito *et al.*, 1984; Bergstrom *et al.*, 1985). Aquesta inhibició per substrat és dependent del pH de manera que elevades concentracions de CoA, varien el pH òptim de l'enzim cap a un pH més àcidic, produint-se la supressió de l'activitat enzimàtica. A més, l'acetoacetil-CoA, producte de la reacció catalitzada per l'AACS, inhibeix l'activitat enzimàtica amb una  $K_i$  de 15  $\mu\text{M}$  (Ito *et al.*, 1987).

L'enzim AACS purificat a partir de *Z. ramigera* no pateix inhibició per substrat, indicant que aquest mecanisme de regulació de l'activitat enzimàtica és intrínsec de mamífers (Ito *et al.*, 1987).

#### 3.2.2. Regulació per acil-CoAs.

Diferents acil-CoAs de cadena llarga i curta inhibeixen, de manera no competitiva, l'enzim AACS purificat de rata, essent el potencial inhibitori superior quan més llarga és la cadena de l'acil-CoA testat. Així, el palmitoil-CoA, producte de la reacció de l'àcid gras sintasa (FAS) i regulador negatiu de la biosíntesi d'àcids grassos mitjançant la inhibició de l'enzim ACC1 (Bloch *et al.*, 1977), inhibeix l'activitat AACS amb una constant d'inhibició ( $K_i$ ) de 9.8  $\mu\text{M}$  (Ito *et al.*, 1987).

Per altra banda, estudis realitzats en un model més fisiològic a partir d'extractes citosòlics hepàtics de rates alimentades amb oli d'oliva durant 2 hores (75% d'àcid oleic) (Salam *et al.*, 1988) o en fetge de rata aïllat i perfusionat amb àcid oleic (Salam *et al.*, 1989) han demostrat que es produeix una inducció de l'activitat enzimàtica dels primers enzims implicats en la colesterogènesi: AACS, acetoacetil-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa citosòlica i HMG-CoA reductasa. El mecanisme pel qual es produeix aquesta inducció és desconegut però podria explicar-se com una conseqüència indirecta de la depleció del *pool* de colesterol necessari per al transport dels triglicèrids en les VLDL.

### 3.2.3. Regulació fisiològica.

L'activitat enzimàtica de l'AACS es modula durant el desenvolupament en fetge, teixit adipós, cervell i glàndula mamària (Buckley *et al.*, 1973; 1975; Robinson 1978; Williamson *et al.*, 1985; Nakamoto *et al.*, 1999).

En fetge, l'activitat enzimàtica de l'AACS disminueix durant el dejuni (Stern, 1971; Buckley *et al.*, 1975) i està sotmesa a regulació diürna (Bergstrom *et al.*, 1982).

### 3.2.4. Diabetis.

En la diabetis induïda per estreptozotocina, es produeix una disminució de l'expressió de l'AACS teixit específica ja que sols té lloc en el fetge i en teixit adipós marró (i no s'observa en altres teixits com el TAB, ronyó o cervell) (Sato *et al.*, 2002). Encara que la taxa de cetogènesi es veu incrementada en rates diabètiques, com a conseqüència de la disminució de l'expressió de l'AACS en fetge es produeix una disminució de l'activitat específica. Aquesta disminució de l'activitat AACS ve acompanyada d'una disminució de la taxa de biosíntesi d'àcids grassos i colesterol, que es normalitza pel tractament de les rates diabètiques amb insulina, quan l'activitat de l'AACS assoleix el valor de les rates control (Freed *et al.*, 1987).

### 3.2.5. Regulació per composts hipocolesterogènics.

L'activitat de l'acetoacetil-CoA sintetasa hepàtica és veu induïda en rates alimentades amb una dieta suplementada amb colestiramina i/o mevilonina. Aquesta regulació està sincronitzada amb la observada per l'HMG-CoA sintasa citosòlica i l'HMG-CoA reductasa (Bergstrom *et al.*, 1984). Posteriorment s'ha vist que altres agents hipocolesterogènics, com ara la pravastatina, també indueixen l'activitat específica de l'AACS i que aquesta inducció es correlaciona amb un increment dels nivells de proteïna (Iwahori *et al.*, 2000).

Més recentment, els experiments de transcriptoma publicats per Horton i col·laboradors (2003), mostren que en fetge de ratolins transgènics la sobreexpressió d'nSREBP1a o d'nSREBP-2 provoca un increment dels nivells d'mRNA de l'AACS de 5.6 i 6.1 vegades, respectivament, mentre que la deficiència de la proteïna SCAP, reflex de la deficiència de la forma madura dels SREBPs endògens, provoca una disminució dels nivells d'mRNA de l'AACS del 60%.

## 4. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL.

El primer treball sobre regulació transcripcional del gen acetoacetil-CoA sintetasa s'ha publicat durant l'escriptura d'aquesta tesi. En ell, els autors clonen la regió 5' flanquejant del gen AACS de ratolí en el vector reporter pGL3basic. En la regió promotora de -335 a -3 (relatiu a l'inici de traducció) es localitza un lloc d'unió a C/EBP i una caixa GC. Ambdós motius són importants per a l'activitat transcripcional de l'AACS; en particular, C/EBP $\alpha$  és important per a l'expressió de l'AACS durant la diferenciació adipocitària (Hasegawa *et al.*, 2008).

## 5. SECRECIÓ D'INSULINA.

En la cèl·lula  $\beta$ -pancreàtica, com a conseqüència del metabolisme de la glucosa, s'incrementa el ràtio ATP/ADP citoplasmàtic, que provoca el tancament dels canals de potassi sensibles a ATP, la subsegüent despolarització de la membrana plasmàtica i l'obertura dels canals de Ca<sup>2+</sup>. Finalment, s'incrementen els nivells de Ca<sup>2+</sup> citoplasmàtic que promouen la secreció d'insulina (revisat per Leibiger *et al.*, 2008).

No obstant això, la cèl·lula  $\beta$  té molta capacitat per a realitzar anaplerosi llur importància en la secreció d'insulina probablement iguala a la de la producció d'ATP, encara que el mecanisme subjacent no està clar. En la secreció d'insulina estimulada per la glucosa, la taxa de carboxilació del piruvat és molt elevada, incrementant els nivells dels intermediaris del cicle de l'àcid cítric en el mitocondri. Com la majoria d'aquests intermediaris inhibeixen o activen varis enzims del cicle, la funcionalitat del cicle de l'àcid cítric es veuria alterada si l'excés d'intermediaris no fos exportat al citosol, on duen a terme la seva funció en la senyalització de la secreció d'insulina (MacDonald *et al.*, 2005).

Per explicar part del paper de l'anaplerosi en la secreció d'insulina existeixen varies hipòtesis. La hipòtesi del "mecanisme del succinat" postula que el metabolisme del succinat proveeix precursors de l'àcid mevalònic, NADPH i acils CoA de cadena curta, amb un paper important en la secreció d'insulina (Fahien *et al.*, 2002). Un altra hipòtesi implica el transport del citrat com a portador de grups acetil cap al citosol on es convertirà en malonil-CoA; la inhibició de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial pel malonil-CoA, provoca un increment dels nivells d'àcid grassos de cadena llarga, que

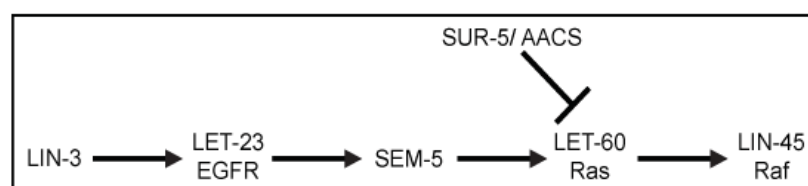
posseeixen una funció important en la senyalització de la secreció d'insulina (Corkey *et al.*, 2000).

Recentment s'ha descrit la importància del gen AACS en la secreció d'insulina, ja que la disminució de la seva expressió mitjançant un RNA antisentit de l'AACS, provoca una disminució de la secreció d'aquesta hormona en cèl·lules pancreàtiques INS-1 832/13 estimulades amb glucosa. En aquest treball es mostra la importància de l'acetoacetat com a transportador d'unitats acetil des del mitocondri al citoplasma ja que la disminució de l'expressió de l'enzim ATP citrat liasa no provoca canvis en la secreció d'insulina (MacDonald *et al.*, 2007).

## 6. SUR-5.

La via de senyalització del receptor tirosina quinasa (RTK) Ras GTPasa/MAP quinasa (MAPK) s'empra repetidament durant el desenvolupament en metazous per tal de controlar diferents processos biològics. No obstant això, l'activació excessiva i no controlada d'aquesta via s'ha relacionat amb l'oncogènesi (Roberts *et al.*, 2007).

En el nematode *Caenorhabditis elegans*, el RTK (LET-23) estimula LET-60/Ras i la cascada de MAPK formada per les kinases LIN-45/Raf, MEK-2/MEK i MPK-1/ERK. Aquesta via de senyalització és necessària per a múltiples processos del desenvolupament com ara la inducció de la vulva (revisat per Chang *et al.*, 1999).



**FIGURA I-8. Funció de Sur-5 en el desenvolupament de la vulva en *C. elegans*.** El gen LET-60/ras actua en una cascada de senyalització cel·lular conservada per tal de traduir el senyal, codificat pel gen lin-3, que prové de la cèl·lula ancorada. Sur-5 bloqueja aquesta via de senyalització mitjançant la inhibició de LET-60/ras (adaptat de Gu *et al.*, 1998).

Sur-5, l'ortòleg en *C. elegans* de l'AACS, és un regulador negatiu de LET-60/Ras durant la inducció de la vulva. Així, la sobreexpressió de Sur-5 suprimeix el fenotip multivulva conseqüència de l'activació aberrant de LET-60/Ras (Gu *et al.*, 1998).



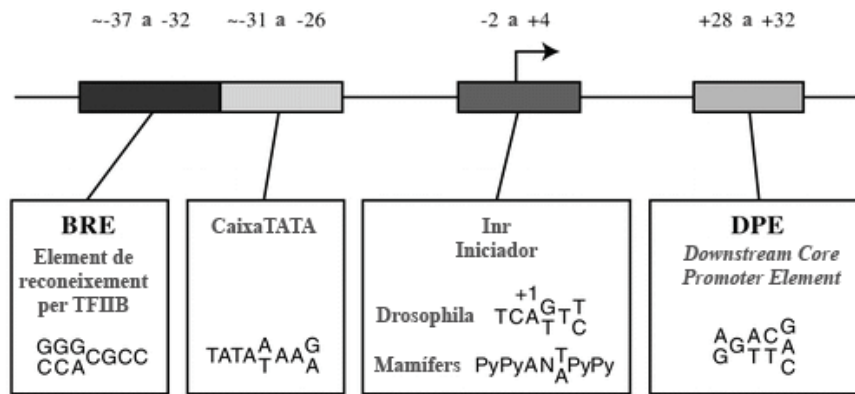
## CONTROL TRANSCRIPCIONAL

El control de la transcripció gènica afecta al patró d'expressió i, per tant, permet, a la cèl·lula l'adaptació als canvis ambientals, l'especialització en l'organisme i el manteniment dels processos metabòlics bàsics necessaris per a la supervivència. La transcripció gènica en eucariotes es prediu per múltiples factors, que inclouen descondensació del locus, remodelació de nucleosomes, modificació d'histones, unió d'activadors i coactivadors transcripcionals als *enhancers* i promotors, i reclutament de la maquinària basal al promotor mínim (Smale *et. al*, 2003).

El promotor mínim inclou elements del DNA que es poden estendre 35 pb corrent amunt i/o corrent avall de l'inici de transcripció, i que sembla que interaccionen directament amb components de la maquinària basal.

La maquinària basal es defineix com el conjunt de factors, inclòs l'RNA polimerasa II, essencials per a la transcripció *in vitro* d'un promotor aïllat. L'RNA polimerasa II, requereix de proteïnes accessòries anomenades factors de transcripció generals (GTFs), per al reconeixement i l'especificitat de promotors gènics que codifiquen per a proteïnes. S'han identificat set GTFs: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH i TFIIJ (Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996). En eucariotes superiors, el TFIID és un complex multiproteic que consta del polipèptid TBP (*TATA binding protein*), que pot unir-se específicament al DNA, i dels factors associats a TBP (TAF; *TBP associated factors*) (Burley *et al.*, 1996; Verrijzer *et al.* 1996).

El reconeixement del promotor mínim per part de la maquinària basal és essencial per al correcte posicionament i acoblament de l'RNA polimerasa II i els factors de transcripció generals. Els motius localitzats en el promotor mínim inclouen la caixa TATA, el BRE (lloc de reconeixement per a TFIIB), l'element iniciador o *Inr*, i el DPE (de l'anglès *downstream promoter element*). Aquests motius no són universals de manera que cap d'ells és absolutament essencial per a la funció transcripcional. De fet, la majoria de promotors mínims manquen de tots els motius coneguts (Yang *et al.*, 2007).



**FIGURA I-9. Motiu del promotor mínim.** Diagrama que mostra les seqüències que contribueixen a l'activitat basal d'un promotor. La caixa TATA pot funcionar en absència dels motius BRE, *Inr* i DPE. Per contra, els motius DPE requereixen la presència de l'*Inr*. Adaptat de Smale *et. al.*, 2003.

- La **caixa TATA**, també anomenada caixa de Goldberg-Hogness, fou el primer motiu identificat en el promotor de gens en eucariotes (Goldberg, 1979). La seqüència consens TATAAA, que es localitza a 25-30 pb corrent amunt de l'inici de transcripció, és reconeguda per la proteïna TBP, que permet la formació del complex de preiniciació.
- L'**element BRE**, localitzat immediatament corrent amunt de la caixa TATA, incrementa l'afinitat per TFIIB al promotor (Lagrange *et al.*, 1998).
- L'**element iniciador o *Inr*** (Smale *et al.*, 1989) fou identificat originalment com una seqüència que determina l'inici de transcripció i que, en absència de la caixa TATA, és suficient per a dirigir l'inici de la síntesi d'RNA cap a un nucleòtid en concret, normalment l'adenosina del consens YYA<sub>+1</sub>NWYY (Javahery *et al.*, 1994). No obstant això, el motiu *Inr* és present tant en promotors que contenen TATA com en aquells promotors que manquen de caixa TATA. L'*Inr*, solapat directament sobre l'inici de transcripció, és reconegut per les subunitats TAF1 i TAF2, que juguen un paper fonamental per a la unió de TFIID (Chalkley *et al.*, 1999).
- El **motiu DPE** es localitza a 28/33 pb corrent avall de l'*Inr* i constitueix una seqüència de reconeixement pel factor TFIID (Burke *et al.*, 1996; 1997). El DPE funciona de manera cooperativa amb l'*Inr*, essent l'espai entre ambdós motius crític per a que es doni una transcripció òptima (Kutach *et al.*, 2000).



La unió de TBP/TFIID al promotor mínim és crítica per a l'acoblament del complex de preiniciació. D'acord amb el model acceptat, la unió de TBP a la regió -30, independentment de l'existència de la caixa TATA, és essencial per a la direcció i reclutament de la resta dels components de la maquinària basal (Hahn *et al.*, 1989; Singer *et al.*, 1990; Wiley *et al.*, 1992; Zenzie-Gregory *et al.*, 1993; Aso *et al.*, 1994). En promotors que contenen la caixa TATA, la unió de TBP es veu estabilitzada per interaccions cooperatives amb TFIIB i TFIIA, que contacten amb el DNA flanquejant, i amb TAFs, que interaccionen amb l'*Inr* i el DPE (revisat per Hagn, 2004). En canvi, en promotors sense caixa TATA, la manca de seqüències riques en A/T en la regió -30 fa que la unió amb TBP no sigui estable i que l'acoblament del complex de preiniciació es reguli per algun mecanisme diferent (Smale *et al.*, 2003).

## FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN LA REGULACIÓ GÈNICA

### 1. FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ DE LA FAMÍLIA Sp.

#### 1.1. La família de proteïnes Sp/KLF.

La família de factors de transcripció Sp/KLF està formada per al menys 23 membres (Philipsen *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 1999; Dang *et al.*, 2000). Aquestes proteïnes es caracteritzen per la presència d'un domini d'unió al DNA format per tres dits de zinc de la classe Cys2-His2 (Suske *et al.*, 1999), que es situa proper a l'extrem COOH-terminal de la proteïna. Com el domini d'unió al DNA està altament conservat, tots els membres de la família Sp/KLF són capaços de reconèixer les mateixes seqüències de DNA GC-(GGGGCGGGG) i GT-(GGYGTGGGG) però amb afinitats diferents degut a substitucions en determinats aminoàcids en els dits de zinc.

La família de factors de transcripció Sp/KLF està subdividida en dos gran subgrups:

- Els factors de transcripció Sp.
- L'heterogeni grup dels factors de transcripció KLFs.

En aquest treball ens centrem en el subgrup de la família de factors de transcripció Sp, concretament en el factor de transcripció Sp1.

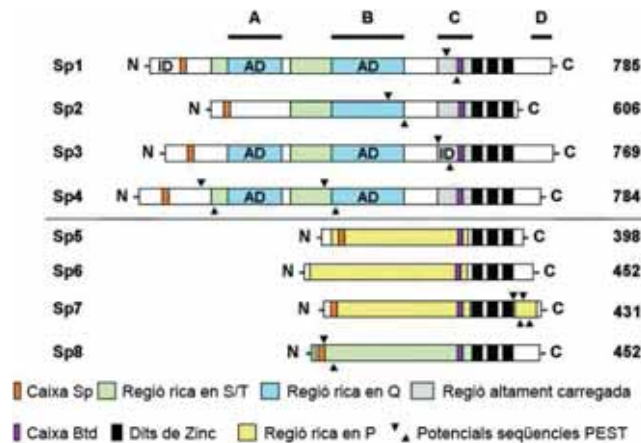
## 1.2. Característiques estructurals de la família Sp.

La família de factors de transcripció Sp inclou 8 proteïnes anomenades, successivament, des d'Sp1 fins a Sp8. Estructuralment, s'han definit dos subgrups de proteïnes Sp: Sp1-4 i Sp5-8, que presenten regions NH<sub>2</sub>-terminals molt diferents.

Totes les proteïnes Sp contenen una seqüència d'11 residus aminoacídics immediatament al costat NH<sub>2</sub>-terminal dels dits de zinc, denominada caixa *Buttonhead* o Btd, que contribueix a la capacitat transactivadora d'aquests factors (Courey *et al.*, 1988). A més, la caixa Sp (SPLALLAATCSR/K1) localitzada propera a l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal (Harrison *et al.*, 2000), sembla implicada en la degradació proteica depenent de proteosoma (Su *et al.*, 1999).

Del subgrup Sp1-4, Sp2 és el que mostra menys similitud amb la resta de membres, fins i tot pel que fa a la regió altament conservada que conforma els dits de zinc, fet que determina que Sp2 s'uneixi a una caixa GT (Kingsley *et al.*, 1992). Els membres d'aquest subgrup contenen dos dominis de transactivació (A i B) rics en glutamina, essencials per a l'activació transcripcional (Courey *et al.*, 1988), excepte Sp2 que conté un únic domini activador. Adjacents als dominis A i B, es troben seqüències riques en residus de serines i treonines, que són objecte de modificacions posttraduccionals. Precedent als dits de zinc, presenten el domini C, que està altament carregat i té un paper important en la interacció amb el DNA (figura I-10).

El factor Sp1 presenta un domini D localitzat en l'extrem COOH-terminal de la proteïna, important en el sinergisme d'Sp1 observat en promotors amb diverses caixes GC (Pascal *et al.*, 1991) i un domini inhibidor (ID) en l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal d'Sp1 (Murata *et al.*, 1994).



**FIGURA I-10. Estructura de la família de factors de transcripció Sp.** Adaptat de la revisió de Bouwman *et al.*, 2002. (AD) dominis d'activació, (ID) dominis d'inhibició. Els diferents mòduls estructurals que constitueixen el factor de transcripció Sp1 es mostren en la part superior del gràfic, marcats amb línies (A, B, C i D) (Courey *et al.*, 1988). A la dreta del gràfic es mostren les mides, en nombre d'aminoàcids, de cadascuna de les proteïnes Sp. Números d'accés: P08047 (Sp1), M97190 (Sp2), CAC34575 i Q02447 (Sp3), CAA48563 (Sp4), XM\_092566 (Sp5), XP\_064386 (Sp6/KLF14), AF477981 (Sp7/Osterix) i AK056857 (Sp8).

### 1.3 Sp1.

El factor de transcripció Sp1 presenta una expressió ubiqua i participa en la regulació transcripcional d'un gran nombre de gens amb múltiples i variades funcions biològiques, regulant la seva transcripció mitjançant la interacció amb el DNA a través de seqüències riques en GC. La proteïna Sp1 pot actuar com a regulador positiu i negatiu de l'expressió gènica (Shou *et al.*, 1998; Suske *et al.*, 1999; Bouwman *et al.*, 2002). A més, Sp1 té un paper important en la prevenció de la metilació de caixes CpG (Brandeis *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 1994) i en l'inici de la transcripció de gens mancats de caixa TATA, on participa en el reclutament de factors iniciadors de la transcripció sobre el promotor (Weis *et al.*, 1997; Smale *et al.*, 1997).

Els primers estudis sobre Sp1 semblaven indicar que aquesta proteïna actuava com a proteïna activadora de la transcripció basal de gens d'expressió constitutiva (*housekeeping genes*). No obstant això, s'ha pogut comprovar que Sp1 és una proteïna subjecta a diferents modificacions posttraduccionals com ara glicosilació (Jackson *et al.*, 1988; Roos *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001), fosforilació (Jackson *et al.*, 1990; Samson *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2005), acetilació (Suzuki *et al.*, 2000, Ryu *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2006), sumoïlació (Spengler *et al.*, 2006) i ubiquitinació (Spengler *et al.*, 2008), indicant que la seva activitat transcripcional es troba molt regulada.

Sp1 pot estimular la transcripció tant a través de promotors proximals com a través de seqüències distals o *enhancers* (Courey *et al.*, 1989). A més, s'ha vist que Sp1 és capaç d'activar sinèrgicament promotors amb múltiples llocs d'unió a Sp formant tetràmers a través dels dominis D (Mastrangelo *et al.*, 1991; Su *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1991).

#### 1.4. Interaccions cooperatives entre Sp1 i altres proteïnes.

- **La maquinària basal de la transcripció:** La proteïna Sp1 és capaç d'interaccionar directament amb TBP (Emili *et al.*, 1994) i amb els factors de transcripció associats a TBP, dATF(II)110h/hTAF(II)130 a través dels dominis d'activació A i B (Hoey *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 1994; Tanese *et al.*, 1996) i amb hTAF(II)55 a través del seu extrem COOH-terminal (Chiang *et al.*, 1995).
- **Proteïnes capaces de modificar l'estat d'acetilació de la cromatina:** El factor de transcripció Sp1 pot formar part de complexos multiproteïcs formats per diferents proteïnes reguladores, coactivadores i/o corepresores, capaces de modificar l'estat d'acetilació de les histones i/o d'altres proteïnes nuclears, afavorint o bloquejant el procés de transcripció mediat per Sp1. Així, s'ha vist que Sp1 pot interaccionar amb proteïnes amb activitat HAT com ara CBP/p300 (Billon *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000) o PCAF (Chu *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005), i amb proteïnes amb activitat HDAC (HDAC1 i HDAC2) (Doetzlhofer *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002a; Won *et al.*, 2002).
- **Factors de transcripció:** Gran part de les proteïnes que interaccionen funcionalment amb Sp1 són factors de transcripció. Entre aquests s'inclouen factors de transcripció ubics com ara Oct-1 (Strom *et al.*, 1996), NF-KB (Pazin *et al.*, 1996), COUP-TF (Rohr *et al.*, 1997), E2F (Karlseder *et al.*, 1996), Smad3 (Inagaki *et al.*, 2001) i factors de transcripció teixit específics, com per exemple SREBP (Sanchez *et al.*, 1995, Yieh *et al.*, 1995, Athanikar *et al.*, 1997), LXR (Thymiakou *et al.*, 2007), PPAR (Krey *et al.*, 1995; Sugawara *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2006), ER (Kim *et al.*, 2003; Stoner *et al.*, 2004), HNF-4 (Kardassis *et al.*, 2002), RXR i RAR (Krey *et al.*, 1995; Horie *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2001).

## 2. STEROL REGULATORY ELEMENT-BINDING PROTEINS.

L'homeòstasi del colesterol és mantinguda a través d'una xarxa complexa de programes transcripcionals. A nivell cel·lular, la síntesi *de novo* de colesterol i la captació de lipoproteïnes estan regulades a través d'un *feedback* negatiu que respon a elevats nivells intracel·lulars de colesterol. Aquesta via està regulada per una família de factors de transcripció anomenada *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) (Brown *et al.*, 1997; 1999).

Els SREBPs són factors de transcripció que pertanyen a la família de proteïnes *basic helix-loop-helix* cremallera de leucina (bHLH-*Zip*), però a diferència d'altres proteïnes bHLH-*Zip* es sintetitzen en forma de precursors ancorats a la membrana del reticle endoplasmàtic on s'organitzen en tres dominis (Hua *et al.*, 1995):

- **Domini NH<sub>2</sub>-terminal;** regió d'aproximadament 480 aminoàcids que conté el domini bHLH-*Zip*, per a la unió al DNA.
- Dos segments transmembrana hidrofòbics interromputs per un petit bucle de 30 aminoàcids que es projecta cap al lumen del reticle endoplasmàtic.
- **Domini COOH-terminal;** regió d'aproximadament 590 aminoàcids que conté el domini de regulació.

En condicions de depleció de colesterol cel·lular, el precursor pateix dues proteòlisis consecutives, alliberant-se el fragment NH<sub>2</sub>-terminal, anomenat forma nuclear de l'SREBP (nSREBP). El domini bHLH-*Zip* conté un senyal de localització cel·lular, que s'uneix directament a la importina, permetent el transport de l'nSREBP dins del nucli (Nagoshi *et al.*, 1999; 2001; Lee *et al.*, 2003) on promou la transcripció de gens implicats en la biosíntesi de colesterol i àcids grassos mitjançant la unió a SRE o E boxes presents en el promotor dels gens diana (Wang *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1995).

Existeixen tres isoformes d'SREBPs: SREBP-1a, SREBP-1c i SREBP-2 (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993; Tontonoz *et al.*, 1993), que s'expressen de manera diferencial en els teixits (Shimomura *et al.*, 1997).

Els trànscripats SREBP-1a i 1c provenen d'un mateix gen a partir de l'ús alternatiu de l'inici de transcripció i difereixen en el primer exó (exó 1a i exó 1c), essent els altres exons comuns en ambdues isoformes (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993; Shimomura *et al.*, 1997). En humans també s'ha descrit l'empalmament alternatiu del final 3' (exons 18a i 19a o exó 18c i 19c), donant lloc a dues proteïnes que difereixen en els seus darrers 113 aminoàcids, llur funcionalitat és desconeguda. El factor de transcripció ADD1 (de l'anglès *adipocyte determination and differentiation dependent factor 1*) clonat a partir d'una llibreria de cDNA d'adipòcits de rata (Tontonoz *et al.*, 1993) és equivalent a SREBP-1c (Shimomura *et al.*, 1997). El tercer membre de la família és SREBP-2, que és codificat per un gen diferent.

SREBP-1a és un activador transcripcional més potent que SREBP-1c degut a que el seu domini NH<sub>2</sub>-terminal transactivador és més llarg (Shimano *et al.*, 1997b). No obstant això, SREBP-1c és la isoforma predominant que s'expressa en la majoria de teixits de ratolí i d'humans, especialment en el fetge, teixit adipós blanc (TAB), múscul esquelètic, glàndula adrenal i cervell. En canvi, SREBP-1a s'expressa a nivells elevats en línies cel·lulars i teixits amb elevada capacitat per a la proliferació cel·lular, com ara la melsa i l'intestí. SREBP-2 s'expressa tant en la majoria de teixits intactes com en la majoria de línies cel·lulars (Shimomura *et al.*, 1997).

## **2.1. Regulació dels SREBPs.**

Els SREBPs són regulats a tres nivells principals: 1) transcripció, 2) escissió proteolítica del precursor ancorat a la membrana del reticle endoplasmàtic i 3) modificació posttraduccional de la forma nuclear (nSREBP), existint diferències significants entre el mecanisme de regulació de les diferents isoformes d'SREBP. Particularment, mentre que SREBP-1a i SREBP-2 semblen ser principalment regulats a nivell de l'escissió proteolítica del precursor, SREBP-1c és principalment regulat a nivell transcripcional (revisat per Eberlé *et al.*, 2004).

### **2.1.1. Control transcripcional.**

SREBP1c i SREBP-2 estan subjectes a diferents formes de regulació transcripcional, mentre que SREBP-1a sembla ser constitutivament expressat a baixos nivells en fetge i molts d'altres teixits de l'animal adult (Shimomura *et al.*, 1997). Un mecanisme de regulació que comparteixen la isoforma 1c i 2 implica un bucle de

retroalimentació positiu mitjançat per motius SREs presents en el seu promotor (Sato *et al.*, 1996; Amemiya-Kudo *et al.*, 2000).

Tres factors regulen la transcripció d'SREBP-1c de manera selectiva: la insulina, el glucagó i el receptor nuclear LXR.

Els canvis en l'estat nutricional regulen l'expressió d'SREBP-1c en el fetge i teixit adipós blanc (Horton *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 1998). Així, l'expressió d'SREBP-1c és reprimida durant el dejuni, quan els nivells d'insulina són baixos i els nivells de glucagó elevats, i s'incrementa molt per la realimentació amb una dieta rica en hidrats de carboni. Els nivells d'mRNA d'SREBP-1c durant el dejuni/ realimentació són paral·lels als canvis en l'expressió dels seus gens diana. En canvi, l'expressió de les altres isoformes d'SREBPs no es veu afectada per aquesta situació fisiològica. La insulina promou tant l'expressió del precursor ancorat a la membrana del reticle endoplàsmic com la forma nuclear del factor de transcripció d'SREBP-1c (Kim *et al.*, 1998; Foretz *et al.*, 1999a; Azzout-Marniche *et al.*, 2000). A més, en fetge de rates diabètiques els nivells d'mRNA d'SREBP-1c es veuen disminuïts i es normalitzen després de l'administració de l'hormona (Shimomura *et al.*, 1999). Els efectes de la insulina en la transcripció d'SREBP-1c són oposats als del glucagó via AMPc (Foretz *et al.*, 1999b).

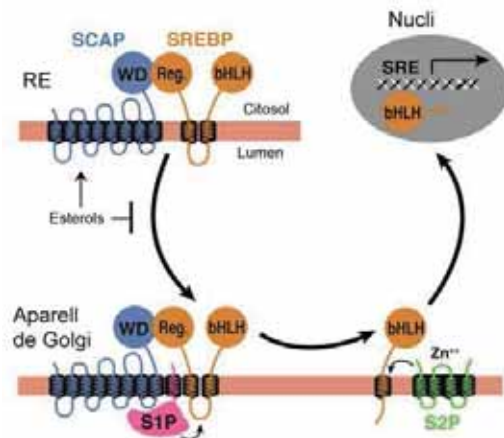
En el promotor del gen SREBP-1c es localitza un LXRE que activa la seva transcripció en presència d'agonistes d'LXR (Repa *et al.*, 2000a). De manera interessant, aquest LXRE també és requerit per a la inducció d'SREBP-1c per insulina, ja que s'ha proposat que aquesta hormona promou l'expressió d'SREBP-1c a través d'LXR $\alpha$ , possiblement mitjançant l'increment de la seva activitat transcripcional per la producció d'un lligant endogen d'LXR (Chen *et al.*, 2004).

### **2.1.2. Activació per escissió proteolítica dels SREBPs.**

Els precursors d'SREBP són retinguts a la membrana del reticle endoplasmàtic mitjançant l'associació amb la proteïna SCAP (de l'anglès *SREBP cleavage activating protein*) (Nohturfft *et al.*, 1998), que posseeix un domini sensor d'esterols, possibilitant que el processament dels SREBPs sigui controlat pel contingut d'esterols cel·lulars (Brown *et al.*, 1999). Així, en condicions de depleció de colesterol intracel·lular SCAP escorta els SREBPs des del reticle endoplàsmic a l'aparell de Golgi, on dues proteases funcionalment diferents, *site 1 protease* (S1P) i *site 2 protease* (S2P), escindeixen, de manera seqüencial, el precursor proteic alliberant l'nSREBP al



citoplasma (Wang *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1998). Primer, S1P talla el bucle luminal contingut entre els dos segments transmembrana del precursor (Duncan *et al.*, 1997; Espenshade *et al.*, 1999) i a continuació S2P talla la proteïna en el primer fragment transmembrana, alliberant el domini bHLH-*Zip* de l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal (Duncan *et al.*, 1998), que migra al nucli on promou la transcripció dels seus gens diana (figura I-11).



**FIGURA I-11. Model de l'escissió proteolítica dels SREBPs mitjançada per esterols.** Els SREBPs es troben ancorats a la membrana del reticle endoplasmàtic. En condicions de depleció de colesterol, la proteïna SCAP transporta els SREBPs cap a l'aparell de Golgi, on dues proteases, S1P i S2P, actuen seqüencialment per tal d'alliberar el domini bHLH-*Zip*, comprès en l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal, que entra al nucli i activa la transcripció dels gens diana. Quan els nivells de colesterol intracel·lular s'incrementen, el processament dels SREBPs es troba bloquejat i romanen ancorats a la membrana del reticle endoplasmàtic (adaptat d'Horton *et al.*, 2002a).

Quan els nivells de colesterol intracel·lular són elevats, el colesterol s'uneix directament al domini sensor d'esterols de la proteïna SCAP, provocant un canvi conformacional de la proteïna (Radhakrishnan *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2002), que interacciona fortament amb les proteïnes Insig (*insulin induced gene proteins*) (Yang *et al.*, 2002; Yabe *et al.*, 2002). Com a conseqüència d'aquest fet, el complex SREBP-SCAP és retingut a la membrana del reticle endoplasmàtic.

La família de proteïnes Insig està formada per dos membres: Insig-1 i Insig-2. Insig-2 s'expressa a baixos nivells, però de manera constitutiva, i no es regula per SREBPs (Yabe *et al.*, 2002). En canvi, la transcripció d'Insig-1 és regulada per SREBPs, de manera que la depleció de colesterol intracel·lular provoca un increment del seu mRNA (Janowski, 2002) i la disminució dels nivells de proteïna, que és ràpidament ubiquitinada quan la concentració de colesterol intracel·lular és baixa (Gong *et al.*, 2006). Sols quan els nivells de colesterol són prou elevats, SCAP s'uneix a Insig-1, estabilitzant la proteïna i provocant l'acumulació del complex Insig-1/SCAP/SREBP, que serveix com a reserva d'SREBP. En absència de colesterol, SCAP/SREBP es dissocia d'Insig-1, que és ubiquitinat i degradat en el proteosoma (Gong *et al.*, 2006). El complex SCAP/SREBP migra al reticle endoplasmàtic, on es processa la forma madura dels SREBPs (nSREBP), que migra al nucli on activa la transcripció de gens implicats en la biosíntesi i captació de nou colesterol. A l'hora, l'nSREBP activa la transcripció d'Insig-1, que provoca un increment de l'mRNA encara



que la proteïna serà degradada fins que en la cèl·lula s'assoleixin un determinats nivells de colesterol, suficients per a unir-se a SCAP, que permetin que aquesta proteïna estabilitzi a Insig-1. Així, el bloqueig del processament dels SREBPs requereix la convergència de dues molècules: colesterol i Insig-1 (revisat per Golstein *et al.*, 2006).

La insulina promou l'increment de la forma nSREBP1c de manera independent a la transcripció (Hegarty *et al.*, 2005), encara que el mecanisme mitjançant aquesta hormona promou l'escissió del precursor no està elucidat, observacions recents impliquen a les proteïnes Insig.

En el fetge existeixen dues isoformes d'Insig-2: Insig-2a i Insig-2b, que provenen del mateix gen però que són conseqüència de l'ús alternatiu de promotors, produint-se un exó 5' no codificant diferent. Així, ambdós transcrits codifiquen per a la mateixa proteïna Insig-2, essent la principal diferència entre Insig-2a i 2b la seva distribució tissular: mentre que Insig-2b s'expressa de manera ubíqua, Insig-2a ho fa principalment en el fetge i sols quan els nivells d'insulina són baixos (Yabe *et al.*, 2003). En aquesta situació fisiològica, SREBP-1c no es transcriu activament i, per tant, disminueixen els nivells d'nSREBP-1c, de manera que tant els nivells de proteïna com d'mRNA d'Insig-1 són baixos. Amb l'alimentació es produeix un increment dels nivells d'insulina i es redueixen ràpidament els nivells d'Insig-2. A l'hora, la insulina promou la transcripció d'SREBP-1c i la forma nSREBP-1c activa la transcripció d'Insig-1, provocant un increment dels nivells d'mRNA i proteïna. Com a conseqüència d'aquest fet, es produeix el reemplaçament de les proteïnes Insig-2 per Insig-1, constituint un mecanisme de regulació específic necessari per a que SREBP-1c sigui activament processat a la seva forma nuclear per tal de convertir l'excés d'hidrats de carboni en lípids (Engelking *et al.*, 2004). Sota la condició d'alimentació, el propòsit de la biosíntesi d'àcids grassos és l'emmagatzament d'energia més que no pas el manteniment de la membrana.

### 2.1.3. Modificacions posttraduccional.

L'activitat transcripcional dels SREBPs esta regulada per modificació posttraduccional. La Ser 117 d'SREBP-1a i les Ser 432 i Ser 455 d'SREBP-2 són fosforilades per MAPK (Roth *et al.*, 2000; Kotzka *et al.*, 2004), que promouen la capacitat transactivadora del factor de transcripció. A més, els nSREBPs també són modificats per ubiquitinació i ràpidament degradats en el proteosoma (Hirano *et al.*, 2001). L'acetilació del residu de Lys 333 d'SREBP-1a evita la seva ubiquitinació (Naar *et al.*, 1998). A més, tant SREBP-1a com SREBP-2 són modificats per sumoïlació, que reprimeix la seva capacitat transactivadora (Hirano *et al.*, 2003).

### 2.2. Especificitat de les diferents isoformes per a l'activació de la transcripció.

Al contrari d'altres factors de transcripció de la família bHLH-*Zip*, que contenen una residu d'arginina conservat en el seu domini bàsic, els SREBPs posseeixen un residu de tirosina. Aquesta substitució aminoacídica permet la unió dels SREBPs tant a motius E box (5'-CANNTG-3', on N representa a qualsevol base), com totes les proteïnes bHLH-*Zip*, com a seqüències SRE (5'-TCACNCCAC-3') (Kim *et al.*, 1995).

Diversos estudis demostren l'existència de funcions específiques dependents de la isoforma, degut al menys en part, a les diferències d'afinitat que presenten les tres isoformes per als diferents consens de seqüència presents en el DNA dels gens diana (Amemiya-Kudo *et al.*, 2002). Així, SREBP-1c i SREBP-2 activen preferencialment la síntesi d'àcids grassos i colesterol, respectivament, mentre que el paper d'SREBP-1a es troba menys restringit. El desenvolupament de ratolins transgènics que expressen les formes nuclears d'SREBPs (nSREBPs) en el fetge han sigut de gran importància en la identificació de nous gens diana de cada isoforma individual (revisat per Horton *et al.*, 2002a/b).

La sobreexpressió d'nSREBP-1a en fetge de ratolí provoca l'increment de l'expressió tant de gens colesterogènics (com ara l'HMG-CoA sintasa, l'HMG-CoA reductasa i l'esqualè sintasa) com de gens implicats en la síntesi d'àcids grassos (per exemple ACC1, FAS i estearoïl-CoA dessaturasa-1 (SCD-1)) (Horton *et al.*, 2003). En canvi, la sobreexpressió hepàtica d'nSREBP-1c en ratolins promou, de manera selectiva, la inducció de gens lipogènics. A més, SREBP-1c també podria contribuir a la regulació de la captació de glucosa i a la gluconeogènesi ja que la sobreexpressió

d'nSREBP-1c en hepatòcits provoca la inducció de l'expressió de la glucoquinasa i la supressió de la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK), enzims claus en la utilització de la glucosa i en la gluconeogènesi, respectivament (Becard *et al.*, 2001; Chakravarty *et al.*, 2001). La sobreexpressió d'nSREBP-2 en ratolins promou l'expressió de gens colesterogènics, amb una lleu inducció dels gens implicats en la síntesi d'àcids grassos (Horton *et al.*, 1998b; 2003). A més, totes les isoformes d'SREBP indueixen l'expressió de gens que promouen la generació de NADPH, cofactor necessari per a la síntesi lipídica.

La deleció selectiva de la isoforma SREBP-1c provoca la disminució de l'expressió basal dels mRNAs que codifiquen per a enzims implicats en la biosíntesi d'àcids grassos i triglicèrids. A més, en aquest context gènic no es produeix la inducció de gens lipogènics en resposta al règim dejuni/realimentació (Liang *et al.*, 2002), suggerint que SREBP-1c mitjança l'acció lipogènica de la insulina en fetge. De manera interessant, els ratolins *knockout* per a SREBP-1c o SREBP-1 mostren un increment dels nivells d'mRNA d'SREBP-2 hepàtics (Shimano *et al.*, 1997a). Mentre que la deleció de la isoforma SREBP-1c no afecta a la viabilitat embrionària, sols el 15-50 % dels embrions sobreviuen per la deleció d'ambdues isoformes d'SREBP-1, la deleció del gen SREBP-2 provoca una mortalitat del 100% dels embrions, indicant que SREBP-2 juga una paper fonamental en les primers etapes del desenvolupament (Shimano *et al.*, 1997a).

### 3. RECEPTORS NUCLEARS.

#### 3.1. Generalitats.

La superfamília de receptors nuclears (NR) està formada per més de 150 proteïnes que participen en una gran varietat de processos biològics com l'homeòstasi cel·lular, desenvolupament, reproducció, diferenciació i morfogènesi (revisat per Mangeldorf *et al.*, 1995; Desvergne *et al.*, 1999; Giguère *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2001; Moller *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005; Glass *et al.*, 2006).

Els receptors nuclears (NR) són factors de transcripció activats per lligant, que poden promoure o reprimir l'expressió gènica, mitjançant el reconeixement i la unió a seqüències específiques del DNA (HRE: *hormone response element* o NRRE: *nuclear receptor response element*) presents en les regions promotores dels seus gens diana.

Els HRE deriven d'un hexàmer consens AGGTCA, on els NR poden unir-se com a monòmers, homodímers o heterodímers. En el cas d'unir-se com a dímers, la seqüència consens es troba repetida formant diferents motius estructurals segons es disposi com a repetició directa (DR: *direct repeat*), inversa (IR: *inverse repeat*) o eversa (ER: *everse repeat*). Els hexàmers poden estar separats entre sí per un determinant nombre de nucleòtids, que s'indica a continuació del tipus de repetició i que és específic per a cada receptor nuclear. Alguns NR, com els PPAR o els que s'uneixen com a monòmers, requereixen, a part de la repetició de l'hexàmer, d'una regió rica en A/T a la zona 5' de l'element de resposta per la seva unió al DNA (revisat per Desvergne *et al.*, 1999).

Els NR poden dividir-se en dos grans grups: receptors que uneixen hormones esteroïdals i receptors que no uneixen hormones esteroïdals. Aquests darrers presenten lligants químicament molt diversos que poden ser sintetitzats per la pròpia cèl·lula diana. Entre els receptors amb lligants no esteroïdals trobem receptors capaços de dimeritzar amb RXR com el receptor d'hormona tiroïdal (TR), el receptor de vitamina D (VDR), el receptor activat per proliferadors de peroxisomes (PPAR) i el receptor d'àcid retinoic (RAR). Existeixen també, dins la superfamília de receptors nuclears, una sèrie de receptors de lligant desconegut anomenats receptors orfes, com el factor de transcripció del promotor de l'ovoalbúmina de pollastre (COUP-TF), el factor nuclear d'hepatòcits (HNF-4), el receptor relacionat amb estrògens (ERR), el receptor relacionat amb l'àcid retinoic (ROR) i Rev-erb.

### 3.2. Estructura.

Els receptors nuclears presenten una organització estructural altament conservada formada per cinc dominis funcionals: A/B, C, D, E i F (figura I-12) (Desvergne *et al.*, 1999; Chawla *et al.*, 2001b; Zhang *et al.*, 2002b; Smith *et al.*, 2005).

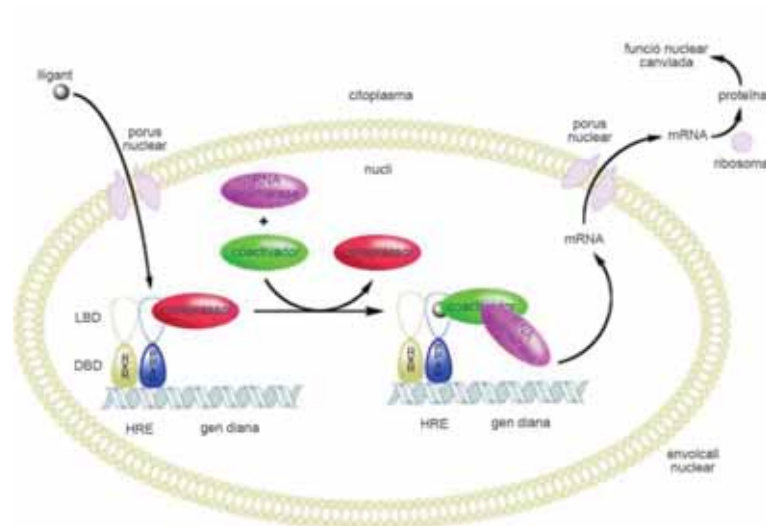


**FIGURA I-12. Estructura dels receptors nuclears.** AF-1/AF-2: Domini de transactivació-1/2; DBD: Domini d'unió a DNA. CTE: Extensió carboxi-terminal, LBD: domini d'unió a lligant (modificat de Desvergne *et al.*, 1999).

- **Domini A/B;** la regió NH<sub>2</sub>-terminal (A/B) és la menys conservada entre els membres de la superfamília, presenta una longitud variable, conté un domini de transactivació independent de lligant (AF-1: *activation function-1*) i un lloc de fosforilació que afecta a l'activació per lligant.
- **Domini C;** altament conservat entre els receptors nuclears és on es localitza el domini d'unió a DNA (DBD: *DNA binding domain*). Aquest domini està format per dos dits de zinc coordinats, cada un d'ells, a través de quatre residus cisteïna que es pleguen formant una estructura globular que reconeix els elements de resposta dels gens diana.
- **Domini D;** es troba poc conservat i permet la rotació relativa dels dominis d'unió a DNA (DBD) i a lligant (LBD), fent possible que un mateix NR pugui unir-se tant a un DR com a un IR. En alguns casos, aquesta regió presenta una extensió COOH-terminal (CTE) del domini d'unió a DNA que participa en la unió del factor de transcripció al seu element de resposta, unint-se a la regió 5' rica en A/T.
- **Domini E;** inclou el domini d'unió a lligant (LBD: *ligand binding domain*), poc conservat, el domini de transactivació dependent de lligant (AF-2: *activation function-2*), molt conservat i crític per l'activació transcripcional dels gens diana, el domini de dimerització, els dominis d'interacció amb coreguladors i un domini de localització nuclear.
- **Domini F;** la regió carboxil (F) no existeix en tots els receptors nuclears, presenta longitud variable i la seva funció és de moment desconeguda.

### 3.3. Mecanisme d'acció.

En general, els receptors nuclears es troben en el nucli, units al DNA en absència de lligant, excepte un reduït grup (com alguns receptors esteroïdals) que són citoplasmàtics i es transloquen al nucli en unir-se al lligant. En ambdós casos, la unió a aquest implica una sèrie de canvis conformacionals en el receptor nuclear que deixa al descobert el domini AF-2, provocant un canvi d'afinitat de proteïnes corepressores a proteïnes coactivadores (revisat per Glass *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Robyr *et al.*, 2000; Hermanson *et al.*, 2002) (figura I-13).



**FIGURA I-13. Mecanisme d'acció dels receptors nuclears.** En absència de lligant, PPAR heterodimeritza amb RXR, s'uneix al DNA (HRE) i atrau a proteïnes corepressores. La unió de lligant a PPAR provoca la dissociació del corepressor i el reclutament de proteïnes coactivadores que, a l'hora, recluten l'RNA polimerasa. Com a conseqüència de l'activació de l'expressió gènica es produeix un canvi en la funció cel·lular.

En condicions basals (absència de lligant) molts dels receptors nuclears estudiats es troben units al DNA i associats a proteïnes corepressores tipus NCoR (*nuclear receptor corepressor*) i SMRT (*Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*), que atrauen histones desacetilases (HDAC) per interacció amb Sin3 i mantenen el gen reprimat (Horlein *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995; Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997). SHARP1 (*SMRT/HDAC1 Associated Repressor Protein*) també reprimeix receptors nuclears en presència i absència de lligant, a través de la interacció amb SMRT i el segrest del coactivador SRA (Shi *et al.*, 2001).

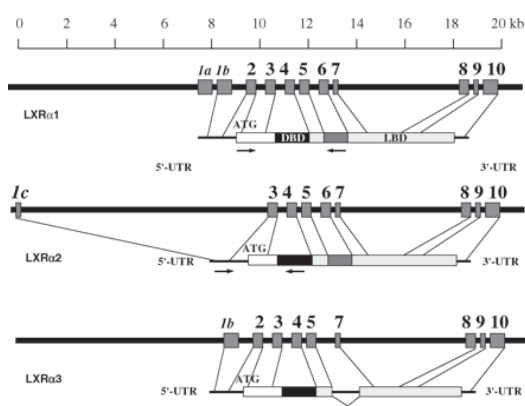
En presència de lligant, el complex repressor es desestabilitza, ja que es produeix un canvi conformacional del receptor que deixa al descobert el domini AF2, permetent la interacció amb el motiu LXXLL dels coactivadors inclòs SRC-1 (*Steroid receptor coactivator-1*), P/CAF i CBP/p300 (revisat per Mahajan *et al.*, 2005). Aquests interaccionen amb la maquinària basal de la transcripció i acetilen les histones, gràcies a la seva activitat histona acetiltransferasa (HAT) intrínseca o al reclutament de HATs, descompactant la cromatina i activant la transcripció (Martinez-Balbás *et al.*, 1998). El membres del complex DRIP/TRAP, com PBP/TRAP220 que interacciona amb PPAR, formen ponts entre la maquinària basal de la transcripció i els receptors nuclears.

Juntament amb el mecanisme d'acetilació/desacetilació, el balanç de metilació/desmetilació i fosforilació/desfosforilació d'histones és important per la regulació de la transcripció (Lemon *et al.*, 2000). Els receptors nuclears també poden regular la transcripció dels seus gens diana a través de la interacció amb altres factors de transcripció de manera independent del DNA (Yang-Yen *et al.*, 1990; Ray *et al.*, 1994).

#### 4. LIVER-X-RECEPTORS (LXR).

Diferents estudis han elucidat el paper d'LXR com a un sensor metabòlic per al manteniment de l'homeòstasi del colesterol, mitjançant la regulació del catabolisme, emmagatzematge, absorció i transport del mateix, a través del control transcripcional de gens diana involucrats en aquests processos (revisat per Lu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002b; Zelcer *et al.*, 2006; Beaven *et al.*, 2006).

Existeixen dos isotips d'LXR: LXR $\alpha$  (NR1H3) i LXR $\beta$  (NR1H2), amb una identitat en la seqüència aminoacídica de gairebé el 80% en els dominis d'unió al DNA (DBD) i al lligant (LBD) (Alberti *et al.*, 2000). El gen que codifica per a LXR $\alpha$  genera tres variants diferents: LXR $\alpha$ 1, LXR $\alpha$ 2 i LXR $\alpha$ 3 (figura I-14), com a conseqüència de l'ús de dos promotors alternatius i de l'empalmament diferencial (Chen *et al.*, 2005). LXR $\alpha$ 1 i LXR $\alpha$ 3 es transcriuen a partir del mateix promotor, localitzat corrent amunt dels exons 1a i 1b, mentre que LXR $\alpha$ 2 es transcriu a partir d'un promotor alternatiu, localitzat 10 Kb corrent amunt de l'exó 1a. La traducció d'aquesta variant comença a l'exó 3, donant lloc a una proteïna truncada que manca dels primers 45 aminoàcids de l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal, fet que determina que LXR $\alpha$ 2 sigui menys activa a l'hora de promoure la transcripció que LXR $\alpha$ 1. L'empalmament alternatiu d'LXR $\alpha$ 3 elimina l'exó 6, provocant una deleció de 50 aminoàcids en el LBD, impeding la unió del lligant i la transactivació gènica.



**FIGURA I-14. Isoformes de l'hLXR $\alpha$ .** Es mostra l'organització gènica del gen d'LXR $\alpha$  humà. L'empalmament alternatiu que implica els exons 1 i 2 genera la isoforma LXR $\alpha$ 2. La traducció s'inicia en l'exó 3 resultant en l'eliminació de 45 aminoàcids de l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal. LXR $\alpha$ 3 és generat per l'empalmament alternatiu de l'exó 6, donant lloc a una deleció de 50 aminoàcid en el LBD.



LXR $\alpha$  s'expressa amb gran quantitat en el fetge (d'aquí el nom de la subfamília) i a nivells més inferiors en glàndules adrenals, intestí, teixit adipós, macròfags, pulmó i ronyó, mentre que l'expressió d'LXR $\beta$  és ubiqua (Repa *et al.*, 2000b).

Originàriament, els LXRs foren considerats receptors nuclears orfes ja que els seus lligants naturals eren desconeguts (Apfel *et al.*, 1994; Willy *et al.*, 1995). Posteriorment, es descobrí que els oxisterols, metabòlits del colesterol, s'unien a aquests receptors, activant-los a concentracions fisiològiques, essent el 22-(R)-, 20-(S)-, 24-(S)-hidroxicolesterol i 24-(S),25-epoxicolesterol, els lligants naturals més potents (Janowski *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1997). El 24-(S),25-epoxicolesterol és particularment abundant en el fetge, on també són abundants el metabolisme del colesterol i l'expressió d'LXR. En macròfags en canvi, el 27-hidroxicolesterol generat per l'esterol 27-hidrolasa (CYP27) és el putatiu lligand d'LXR (Fu *et al.*, 2001). Així, depenent de la seva concentració relativa, diferents oxisterols representen el principal lligand fisiològic d'LXR en un tipus cel·lular en concret (Millatt *et al.*, 2003). La disponibilitat d'agonistes sintètics, com ara T0901317 o GW3965 (Repa *et al.*, 2000c; Collins *et al.*, 2002), han facilitat l'estudi més profund de les conseqüències metabòliques de l'activació d'LXR.

L'activació de gens per LXR implica la formació d'heterodímers amb RXR (*retinoic-X-receptor*) i la unió del lligand. Es tracta d'un heterodímer permissiu que permet l'activació per lligands de qualsevol dels dos receptors (Lu *et al.*, 2001). Del receptor nuclear RXR se'n coneixen tres isotips: RXR $\alpha$ , RXR $\gamma$  i RXR $\beta$  (Mangelsdorf *et al.*, 1992) i se sap que juga un paper dual a nivell de senyalització cel·lular, actuant com a receptor específic per ell mateix amb el 9-cis-retinoic com a lligand (Solomin *et al.*, 1998) o com a parella d'altres receptors nuclears. En l'animal adult, les funcions de RXR $\alpha$  són desconegudes i té importància sobretot en el desenvolupament fetal. El ratolí *knockout* de RXR $\alpha$  mor en fase embrionària i el *knockout* hepàtic el presenta com una molècula integradora de molts processos fisiològics (Wan *et al.*, 2000a/b). En canvi, els ratolins *knockout* dels altres dos isotips ( $\gamma$  i  $\beta$ ) no presenten alteracions importants (Krezel *et al.*, 1996; Kastner *et al.*, 1996).

L'element de resposta a LXR (LXRE) és un DR4, una repetició directa de l'hexàmer AGGTCA separada per 4 nucleòtids (Willy *et al.*, 1995), on RXR interacciona amb l'hexàmer 5' i LXR amb el 3' (Willy *et al.*, 1997).



Com la majoria de receptors nuclears que formen heterodímers amb RXR, en absència de lligant, LXR es troba en el nucli unit a l'RXRE i amb corepressors com ara NCoR o SMRT (Horlein *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995). La unió de lligant a LXR suposa un canvi conformacional que facilita la unió de proteïnes coactivadores i la transcripció dels gens diana (Glass *et al.*, 2000).

#### 4.1. Regulació i control d'LXR.

L'expressió d'LXR $\alpha$  està sotmesa a control per un mecanisme d'autoregulació (Laffitte *et al.*, 2001a; Whitney *et al.*, 2001). El promotor del gen LXR $\alpha$  humà conté tres LXREs, un dels quals és fortament activat tant per LXR $\alpha$  com per LXR $\beta$  (Li *et al.*, 2002). A més, en macròfags d'humans i de ratolí els agonistes de PPAR $\gamma$  promouen la inducció d'LXR $\alpha$ , ja que els promotors d'ambdues espècies contenen un PPRE conservat (Laffitte *et al.*, 2001a; Chawla *et al.*, 2001a). Per altra banda, en fetge, la insulina promou l'expressió d'LXR $\alpha$ , suggerint que l'efecte estimulador d'aquesta hormona sobre la lipogènesi hepàtica ve mitjançat, al menys en part, per LXR (Tobin *et al.*, 2002).

L'activitat transcripcional d'LXR també està regulada per modificació posttraduccional ja que LXR $\alpha$  posseeix múltiples llocs de fosforilació. La Ser 198 és fosforilada per MAPK (Chen *et al.*, 2006) i, en macròfags, aquesta fosforilació afecta l'activitat transcripcional del receptor de manera gen-específica ja que sols un determinat grup de gens, com ara AIM (*apoptosis inhibitor expressed by macrophages*) o la lipoproteïna lipasa (LPL), són sensibles a l'estat de fosforilació d'LXR $\alpha$  (Torra *et al.*, 2008). Altres autors han descrit que la fosforilació d'LXR $\alpha$  en les Ser195, 196, 290 i 291, impedeix la dimerització amb RXR i promou el reclutament d'NCoR, inhibint la seva activitat transcripcional (Yamamoto *et al.*, 2007). A més, l'acetilació d'LXR $\alpha$  en la Lys 432 (localitzada en el LBD) evita la ubiquitinació i la subseqüent degradació proteasomal del receptor nuclear, resultant, paradoxalment, en una reducció de la seva activitat transcripcional. En el procés de desacetilació d'LXR $\alpha$  i, per tant, d'activació, juga un paper fonamental la unió del lligant així com la proteïna desacetilasa SIRT1 (Li *et al.*, 2007).

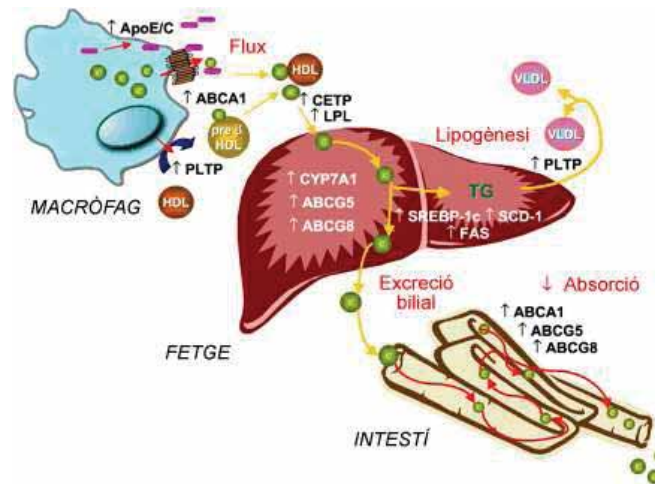
## 4.2. Funcions biològiques.

### 4.2.1. Homeòstasi del colesterol.

La identificació dels oxisterols com a lligants fisiològics d'LXR, suggerí la possible importància d'aquests receptors en el metabolisme del colesterol. La generació de ratolins *knockout* per a LXR permeté la identificació del colesterol 7 $\alpha$ -hidrolasa (CYP7a1) com al primer gen diana d'LXR (Peet *et al.*, 1998.). El CYP7a1 catalitza la reacció limitant en la síntesi d'àcids biliars (Russell *et al.*, 1992; Vlahcevic *et al.*, 1999), que és principalment hepàtica, i promou la secreció de colesterol en la bilis per a la posterior excreció amb la femta. La inhabilitat d'aquests ratolins per induir l'expressió de CYP7a1 provoca una acumulació d'èsters de colesterol en el fetge. No obstant això, en humans, l'LXRE del promotor de CYP7a1 de ratolí no es troba conservat (Chiang *et al.*, 2001) i el colesterol de la dieta no promou la seva expressió, suggerint l'existència d'un mecanisme de regulació diferencial entre les diferents espècies.

Els agonistes d'LXR disminueixen l'absorció de colesterol intestinal, fet que ve determinat per la capacitat d'aquest receptor nuclear d'activar l'expressió dels membres de la superfamília de transportadors de membrana ABC (Borst *et al.*, 2002), que bombegen el colesterol cap al lumen de l'estómac, inclòs ABCA1 (Repa *et al.*, 2000c; Costet *et al.*, 2000), ABCG5 i ABCG8 (Repa *et al.*, 2002; Berge *et al.*, 2002).

Estudis posteriors demostraren que els LXRs també regulen l'expressió de gens involucrats en la regulació del transport revers del colesterol, mitjançant el qual l'excés de colesterol, en forma d'HDL, és transferit des dels teixits perifèrics al fetge (Lewis *et al.*, 2005). Aquest procés és especialment important en macròfags, on l'excés de colesterol provoca la conversió d'aquest tipus cel·lular en cèl·lules escumoses, que promouen l'aterogènesi (Lusis, 2000; Glass *et al.*, 2001). Durant la lesió els macròfags acumulen lligants d'LXR, mitjançant la acumulació d'LDL modificades i per la producció intracel·lular de 27-hidroxicolesterol (Szanto *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2005) i 24-(S),25-epoxicolesterol (Rowe *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004), resultant en un increment de l'activitat transcripcional d'LXR. Aquesta activació d'LXR, mitjançant l'activació dels transportadors ABCA1 i ABCG1, promou la secreció del colesterol (Repa *et al.*, 2000c; Costet *et al.*, 2000; Venkateswaran *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2001; Sabol *et al.*, 2005).



**FIGURA I-15. Paper dels gens diana d'LXR en l'homeòstasi del colesterol i la lipogènesi** (adaptat de Tontonoz *et al.*, 2003). C, colesterol; TG, triglicèrid.

La inducció d'un conjunt d'apolipoproteïnes constitueix un mecanisme addicional mitjançant el qual LXR contribueix al transport revers del colesterol. Específicament, els LXRs promouen l'expressió d'Apoc (ApocI, ApocII i ApocIV) (Mak *et al.*, 2002b) en macròfags i d'Apod (Hummasti *et al.*, 2004) en el teixit adipós. En ambdós teixits, els LXRs indueixen l'expressió d'Apoe (Laffitte *et al.*, 2001b) llur paper antiaterogènic està ben establert (revisat per Curtiss *et al.*, 2000).

Els LXRs també modulen l'expressió de varis gens clau en la remodelació de lipoproteïnes com ara la LPL (Zhang *et al.*, 2001), la proteïna transferidora d'èsters de colesterol humana (CETP) (Luo *et al.*, 2000) i la proteïna transferidora de fosfolípids (PLTP) (Mak *et al.*, 2002a, Laffitte *et al.*, 2003b).

#### 4.2.2. Lipogènesi.

Els LXRs són factors de transcripció clau en la regulació de la lipogènesi hepàtica. El tractament de ratolins amb agonistes sintètics d'LXR eleva els nivells de triglicèrids en plasma i fetge, cosa que suposa un obstacle significat a l'hora de desenvolupar aquests composts com a fàrmacs (Schultz *et al.*, 2000; Joseph *et al.*, 2002). Sembla ser que els LXRs promouen la lipogènesi principalment de manera indirecta, a través de la inducció d'SREBP-1c (Repa *et al.*, 2000a; Yoshikawa *et al.*, 2001), encara que l'activació directa de gens lipogènics, com ara la FAS, PLTP o ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*) (Joseph *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2002; Laffitte *et al.*, 2003b; Cha *et al.*, 2007) també ha sigut descrita. En ratolins *knockout* per a LXR $\alpha$ , l'expressió d'un gran nombre de gens, entre d'ells SREBP-1c i FAS, es veu alterada (Peet *et al.*, 1998).

#### 4.2.3. LXR en el metabolisme d'hidrats de carboni.

El metabolisme de la glucosa també es veu afectat per l'activitat d'LXR. El tractament de ratolins diabètics amb agonistes sintètics d'LXR (Laffitte *et al.*, 2003a; Cao *et al.*, 2003) provoca una millora de la tolerància a la glucosa. Aquest efecte ve associat a la repressió de gens gluconeogènics, com ara la PEPCK i la glucosa-6-fosfatasa, i amb la inducció de la glucoquinasa, provocant un increment en la utilització de la glucosa hepàtica.

En adipòcits, LXR $\alpha$  incrementa la captació de la glucosa mitjançant la inducció dels transportadors de glucosa 1 (GLUT1) i 4 (GLUT4) (Ross *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2003; Dalen *et al.*, 2003).

Recentment, Mitro *et al.* (2007) han definit a LXR com a sensor de glucosa, amb la capacitat d'unir D-glucosa i D-glucosa-6-fosfat, i promoure així l'expressió dels seus gens diana amb la mateixa eficàcia que ho fan els oxisterols. Aquest fet ha sigut qüestionat per la comunitat científica (Lazar *et al.*, 2007; Shiota *et al.*, 2008) i d'altres autors no han pogut reproduir aquests experiments, apuntant a ChREBP com al factor de transcripció clau en l'activació de gens hepàtics sensibles als nivells de glucosa i d'hidrats de carboni (Denechaud *et al.*, 2008).

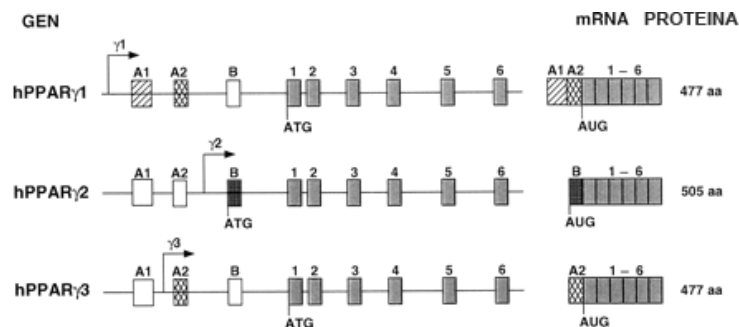
## 5. RECEPTORS ACTIVATS PER PROLIFERADORS DE PEROXISOMES (PPAR).

Els receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR o NR1C) són receptors nuclears implicats en la regulació de l'expressió de gens vinculats a l'homeòstasi lipídica i glucídica i a la diferenciació i proliferació cel·lular, actuant com a sensors lipídics (Desvergne *et al.*, 1999; Willson *et al.*, 2000; Escher *et al.*, 2000; Chawla *et al.*, 2001b; Grimaldi *et al.*, 2001; Kersten *et al.*, 2002; Van Bilsen *et al.*, 2002; Ferré *et al.*, 2004; Desvergne *et al.*, 2004; Tontonoz *et al.*, 2008).

Inicialment es van descriure com a mediadors de l'efecte de compostos sintètics, que administrats a rosegadors provocaven un increment del número i la mida dels peroxisomes hepàtics, i un augment de la capacitat de metabolitzar àcids grassos per la sobreexpressió de gens de la  $\beta$ -oxidació peroxisomal (Lazarow *et al.*, 1985). Posteriorment s'ha observat que aquests compostos també són capaços d'incrementar

el número de mitocondris i la  $\beta$ -oxidació mitocondrial i que tenen efectes hipolipemiants (revisat per Desvergne *et al.*, 1999).

Actualment s'han identificat tres isotips de PPAR: PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\delta$  (també anomenat PPAR $\beta$ , NR1C2 o *fatty acid activated receptor* (FAAR)) i PPAR $\gamma$  (NR1C3), amb una estructura gènica similar (Desvergne *et al.*, 1999). El gen que codifica per PPAR $\gamma$  humà i de ratolí genera tres mRNAs: PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 i PPAR $\gamma$ 3 (figura I-16), com a conseqüència de l'ús de dos promotors alternatius i de l'empalmament diferencial. Els mRNAs de PPAR $\gamma$ 1 i PPAR $\gamma$ 3 codifiquen per la mateixa proteïna però estan controlats per promotors alternatius localitzats en la regió 5' que flanqueja l'exó A2 (Fajas *et al.*, 1998). La proteïna codificada pel mRNA de PPAR $\gamma$ 2 difereix de les codificades per PPAR $\gamma$ 1 i  $\gamma$ 3 en l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal (Zhu *et al.*, 1995; Fajas *et al.*, 1997).



**FIGURA I-16. Isoformes de hPPAR $\gamma$ .** Es mostra l'organització genòmica del gen de PPAR $\gamma$  humà. Dues isoformes de PPAR $\gamma$  es produeixen per l'ús diferencial de tres promotors i l'empalmament alternatiu dels tres exons ubicats a 5' (A1, A2 i B1). Els exons 1-6 són comuns als tres transcrits. També es mostra l'esquema dels tres mRNA així com la mida de les proteïnes obtingudes.

A nivell de proteïna, s'ha definit l'estructura del domini d'unió a lligant per cristal·lografia de raigs X dels tres isotips de PPAR. El LBD està format per 13  $\alpha$ -hèlixs i una làmina- $\beta$  que creen una butxaca bastant gran, comparat amb altres NR, permetent l'entrada de lligants hidrofòbics, naturals o sintètics, químicament molt diferents (Xu *et al.*, 2001) (taula I-2).

Isotip	Lligants naturals	LLligants sintètics
PPAR $\alpha$	Àc. grassos insaturats i saturats, leucotriè B4.	Wy14643, GW-9578, GW-7647, GW-2433, L-796446 i L-783483
PPAR $\delta$	Àc. grassos insaturats i saturats, prostaglandines A1 i D2 i prostaciclina.	Wy14643, GW501516, L165041, GW-2433, L-796446 i L-783483.
PPAR $\gamma$	Àc. grassos insaturats i saturats; prostaglandines: PGD2 i 15d-PGJ2;	tiazolidindiones (TZD), GW-1929, GW-7845, GI-262570, LY-171883, L-796446 i L-783483

**TAULA I-2. Relació d'alguns lligants coneguts, naturals i sintètics, dels diferents isotips de PPAR.**

L'activació de gens per PPAR implica la formació d'heterodímers amb RXR (*retinoic-X-receptor*) i la unió del lligant. Es tracta d'un heterodímer permissiu que permet l'activació per lligants de qualsevol dels dos receptors de manera que l'àcid 9-*cis*-retinoic pot activar gens reporters sota el control d'un PPPE a través de PPAR/RXR (Kliewer *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 1993).

L'element de resposta a PPAR (PPPE) és un DR1, una repetició directa imperfecta de l'hexàmer AGGTCA amb una adenina entremig (Kliewer *et al.*, 1992), on PPAR interacciona amb l'hexàmer 5' i RXR amb el 3' (Ijpenberg *et al.*, 1997). A més, la unió dels heterodímers PPAR/RXR al DNA requereix d'una extensió 5' rica en A/T (Palmer *et al.*, 1995; Juge-Aubry *et al.*, 1997; Osada *et al.*, 1997; Ortiz *et al.*, 1999) que ha de ser reconeguda pel domini CTE de PPAR (Hsu *et al.*, 1998).

Els PPPE poden trobar-se en les dues cadenes de DNA en orientacions diferents i, segons la seva capacitat d'unir PPAR/RXR, es poden classificar en forts, mitjans i dèbils, diferències que es correlacionen amb la conservació de l'element (Juge-Aubry *et al.*, 1997). En tots els casos, PPAR $\gamma$  és el que s'uneix amb més força i més independentment de la regió 5', que és particularment important per PPAR $\alpha$ . També l'isotip d'RXR marca la capacitat d'unió al PPPE, essent més forta per heterodímers amb RXR $\gamma$  i menys per heterodímers amb RXR $\alpha$  (Desvergne *et al.*, 1999). Encara no està clar si aquestes diferències d'afinitat observades *in vitro* es tradueixen en un reconeixement selectiu dels diferents PPPE pels isotips de PPAR en el context genòmic natural.

Fins fa poc s'havia considerat que els corepressors NCoR i SMRT no podien interaccionar amb l'heterodímer PPAR/RXR per manca del domini CoR *box* en els PPAR (DiRenzo *et al.*, 1997; Zamir *et al.*, 1997a/b). Recentment, aquesta idea ha sigut desplaçada per una sèrie de publicacions que descriuen pels PPAR el mecanisme de repressió via NCoR i SMRT descrit per altres receptors nuclears (Oberfield *et al.*, 1999; Krogsdam *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2005). RIP-140 (*receptor interacting protein-140*) també ha estat inclòs entre els corepressors de PPAR (Miyata *et al.*, 1998; Dowell *et al.*, 1999).

En relació als coactivadors, els PPAR interaccionen amb SRC-1 a través del LBD (dos dominis LXXLL) (Zhu *et al.*, 1996), de manera dependent de lligant. Aquesta interacció sembla essencial per l'activació transcripcional via PPAR $\gamma$  (Zhu *et al.*, 1996; DiRenzo *et al.*, 1997) però no via PPAR $\alpha$  (Qi *et al.*, 1999). CBP/p300 també és capaç d'interaccionar amb el LBD dels PPARs en presència de lligant (Chakravarti *et al.*, 1996). Altres coreguladors descrits són PGC-1 (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma alpha*) (Puigserver *et al.*, 1998), PBP (*PPAR binding protein*) (Zhu *et al.*, 1997) i TRAP220 (*Thyroid hormone receptor associated protein-220*).

### 5.1. Regulació i control.

En fetge de rata l'expressió de PPAR $\alpha$  està subjecta a regulació negativa i positiva per insulina i glucocorticoides, respectivament (Steiniger *et al.*, 1994; Lemberger *et al.*, 1994). D'aquesta forma, en situacions d'estrès o de dejuni, l'expressió de PPAR $\alpha$  es veu incrementada. D'acord amb aquest fet, els nivells de mRNA i de proteïna de PPAR $\alpha$  estan sotmesos a oscil·lació circadiària (Oishi *et al.*, 2005). També la presència dels lligants de PPAR $\alpha$ , fibrats o FFA, indueixen la seva expressió (Sterchele *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1998). L'exercici intens en múscul esquelètic (Horowitz *et al.*, 2000) i la transició de miòcits des de l'estat fetal a l'adult en múscul cardíac (Barger *et al.*, 2001), promouen la inducció de PPAR $\alpha$ .

Poc es coneix sobre la regulació de PPAR $\delta$ . En les línies adipocitàries ob1771, 3T3L1 i 3T3-F442A així com en la línia cel·lular mioblàstica C2C12, els nivells de PPAR $\delta$  s'indueixen durant la diferenciació cel·lular (Amri *et al.*, 1995).

L'expressió de PPAR $\gamma$  s'indueix durant la diferenciació adipocitària, essent els factors de transcripció C/EBP $\beta$ ,  $\delta$ , SREBP-1c i LXR responsables, al menys en part,



d'aquesta inducció (Saladin *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1995; Fajas *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2004). A més, l'expressió de PPAR $\gamma$  és reprimida pel dejuni i per la diabetis tipus I. Al contrari, la dieta rica en greixos indueix la seva expressió en teixit adipós (Vidal-Puig *et al.*, 1996). *In vitro* la insulina i els glucocorticoides promouen l'expressió de PPAR $\gamma$  (Vidal-Puig *et al.*, 1997) mentre que TNF $\alpha$ , la inhibeix (Xing *et al.*, 1997).

A nivell posttraduccional els PPARs veuen afectada la seva capacitat transactivadora per mecanismes de fosforilació i desfosforilació (revisat per Gelman *et al.*, 2005). En el cas de l'isotip  $\alpha$ , la insulina, mitjançant les MAPK, promou la fosforilació de les Ser 12 i 21 del domini A/B (Shalev *et al.*, 1996; Juge-Aubry *et al.*, 1999), i residus del DBD s'han descrit com a substrat de la PKA (Lazennec *et al.*, 2000), fet que incrementa, en ambdós casos, la seva activitat transcripcional. Al contrari, en PPAR $\gamma$  la fosforilació de la Ser112, per Erk1 o 2, provoca la inhibició de l'activitat transcripcional i, per tant, disminueix la seva capacitat adipogènica (Hu *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 1997). Per altra banda, la sumoïlació de PPAR $\gamma$  en la Lys107 inhibeix la seva capacitat transactivadora (Ohshima *et al.*, 2004) mentre que la sumoïlació en la Lys 365 és necessària per a la repressió de promotors de gens proinflamatoris mitjançada per PPAR $\gamma$  (Pascual *et al.*, 2005).

## **5.2. Patró d'expressió i principals funcions biològiques dels diferents isotips de PPAR.**

Els diferents isotips de PPAR presenten divergències en el seu patró d'expressió tissular d'acord amb la funció que desenvolupen. A continuació es descriuran, molt breument, el patró d'expressió i les principals funcions biològiques dels isotips  $\alpha$  i  $\delta$  i, més extensament, de l'isotip  $\gamma$ .

### **5.2.1. PPAR $\alpha$ .**

PPAR $\alpha$  s'expressa principalment en teixits metabòlicament actius com el fetge, el ronyó, el cor, el múscul, l'intestí i el pàncrees, tot i que també es detecta a la placenta, el pulmó i el teixit adipós (Braissant *et al.*, 1996; Auboeuf *et al.*, 1997). L'estudi de ratolins *knockout* per a PPAR $\alpha$  ha revelat que aquest receptor és el mediador principal de la resposta a proliferadors peroxisomals a nivell hepàtic (Peters *et al.*, 1996), però no de la biogènesi de peroxisomes.



PPAR $\alpha$  és un dels reguladors principals de l'expressió de gens implicats en la majoria d'etapes de la utilització d'àcids grassos (revisat per Lefebvre *et al.*, 2006):

- **Transport i esterificació d'àcids grassos:** FATP, FAT/CD36, FABP i ACS (Schoonjans *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1997; Motojima *et al.*, 1998; van der Lee *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2002).
- **Import mitocondrial:** CPT1 (Mascaró *et al.*, 1998; Brandt *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998; Napal *et al.*, 2005), CPT2 (Barrero *et al.*, 2003).
- **$\beta$ -oxidació mitocondrial:** (ACS, LCAD, MCAD, LCAD, VLCAD (Gulick *et al.*, 1994; van der Lee *et al.*, 2000).
- **$\beta$ -oxidació peroxisomal:** acil-CoA oxidasa (ACO), tiolasa bifuncional: enoïl-CoA hidratasa/3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HD) (Dreyer *et al.*, 1992; Tugwood *et al.*, 1992; Marcus *et al.*, 1993; Gulick *et al.*, 1994; Van der Lee *et al.*, 2000).
- **Cetogènesi:** l'HMG-CoA sintasa mitocondrial (Rodríguez *et al.*, 1994).
- **Desacoblament mitocondrial i termogènesi:** les tres isoformes de la proteïna desacobladora (UCP; *uncoupling protein*) (Kelly *et al.*, 1998; Cabrero *et al.*, 1999; Barbera *et al.*, 2001).

PPAR $\alpha$  també juga un paper important en la funció cardíaca ja que els ratolins *ko* per PPAR $\alpha$  mostren nivells molt baixos dels enzims de la  $\beta$ -oxidació i tenen molt incrementada l'oxidació de la glucosa (Lee *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1997). En aquests ratolins el dejú no indueix els gens del metabolisme lipídic, acumulen grassa a nivell hepàtic i cardíac, tenen alterada la producció de cossos cetònics i mostren hipoglucèmia i hipotèrmia (Djouadi *et al.*, 1998; Kersten *et al.*, 1999). En el múscul esquelètic les alteracions d'aquests animals en resposta al dejú són mínimes i s'ha proposat que aquest fet reflecteix la capacitat de PPAR $\delta$  de compensar la falta de PPAR $\alpha$  (Muoio *et al.*, 2002a/b).

### 5.2.2. PPAR $\delta$ .

PPAR $\delta$  és un receptor nuclear d'expressió ubiqua i s'expressa en gran quantitat a diferents teixits com ara el cervell, múscul esquelètic i cardíac, epidermis i TAB (Dreyer *et al.*, 1992, Amri *et al.*, 1995; Braissant *et al.*, 1996; Braissant *et al.*, 1998). També és present a tota la mucosa del tracte digestiu, al fetge, al pàncrees, als ronyons, als centres de proliferació limfocitaris del sistema immunitari i als testicles (Kliewer *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 2002).

Diferents estudis han revelat que PPAR $\delta$  controla un gran rang de gens metabòlics implicats en l'homeòstasi de la glucosa i en la síntesi, emmagatzematge, mobilització i catabolisme d'àcids grassos de manera teixit específica (revisat per Barish *et al.*, 2006; Reilly *et al.*, 2007).

- **TAM:** controla el transport i oxidació d'àcids grassos: LCAS, VLCAS, ACOX1, CPT1, LCAD, VLCAD, HSL, així com la termogènesi: UCP1 i UCP3 (Wang *et al.*, 2003).
- **TAB:** regula la termogènesi mitjançant l'expressió del gen UCP1 (Wang *et al.*, 2003).
- **Múscul esquelètic:** regula el transport i l'oxidació d'àcids grassos: FABP, CPT1, PDK4, HMGCS2, tiolasa, LCAD (Tanaka *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Abbot *et al.*, 2005), el metabolisme oxidatiu: succinat deshidrogenasa i citrat sintasa (Luquet *et al.*, 2003; Holst *et al.*, 2003), la respiració mitocondrial i termogènesi: citocrom c, citocrom oxidasa II i IV, UCP2 i UCP3 (Tanaka *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004), la mioglobina i troponina I (Tanaka *et al.*, 2003; Grimaldi, 2003) i promou el canvi de fibres de contracció ràpida a contracció lenta (Narkar *et al.*, 2008).
- **Múscul cardíac:** control del transport i oxidació d'àcids grassos: CPT1, tiolasa, UCP3, LCAD, MCAD, PDK4, VLCAD, ACOX (Grimaldi, 2003; Cheng *et al.*, 2004).
- **Placenta:** controla la diferenciació de les cèl·lules gegants: Akt1, PDK1, ILK, ADRP, etc. (Nadra *et al.*, 2006).

- **Macròfags:** regula el metabolisme d'àcids grassos i la inflamació: ADRP, CPT1, UCP2, ATGL, MCP-1/3, IL-1 $\beta$ , etc. (Chawla *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; 2006).

Altres funcions destacades de PPAR $\delta$  són la maduració epidèrmica, el metabolisme del teixit ossi i de les lipoproteïnes (Michalik *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2000), la diferenciació adipocitària (Bastie *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2001), el desenvolupament cerebral (Xing *et al.*, 1995), la implantació uterina (Lim *et al.*, 1999) i un paper antiproliferatiu en càncer de còlon (He *et al.*, 1999; Barak *et al.*, 2002).

### 5.2.3. PPAR $\gamma$ .

L'expressió de PPAR $\gamma$  en rates és troba reduïda principalment a TAB i TAM, còlon, cec i melsa i en menor proporció, a intestí prim, retina i múscul esquelètic (Braissant *et al.*, 1996; 1998). En humans, PPAR $\gamma$ 2 s'expressa fortament en múscul esquelètic i teixit adipós, on és la principal variant en la inducció de l'adipogènesi (Rosen *et al.*, 2002). PPAR $\gamma$ 1, a més d'expressar-se en aquests teixits, també ho fa en cor i fetge (Auboeuf *et al.*, 1997; Mukherjee *et al.*, 1997).

#### 5.2.3.1. Mecanisme d'acció.

PPAR $\gamma$ , així com la majoria de receptors nuclears, activa la transcripció gènica de manera dependent de lligant i la seva activitat ve regulada pels cofactors comuns de la família de receptors nuclears: CBP/p300 i la família SRC i TRAP220 entre d'altres (Powell *et al.*, 2007). A més, PGC-1 $\alpha$  s'uneix i coactiva a PPAR $\gamma$ , i d'altres factors de transcripció, de manera dependent de lligant per induir l'expressió de gens mitocondrials, promoure la termogènesi i incrementar la respiració cel·lular. Aquesta proteïna s'expressa de manera preferencial en TAM, on es troba molt regulada tant a nivell transcripcional com a nivell posttraduccional (Puigserver *et al.*, 1998; Rodgers *et al.*, 2008). L'acció de PGC-1 $\alpha$  sobre PPAR $\gamma$  posseeix selectivitat gènica de manera que l'expressió de PGC-1 $\alpha$  no promou l'expressió de tots els gens diana de PPAR $\gamma$ . Per exemple, en experiments de transfecció transitòria en cèl·lules adipocitàries, PGC-1 $\alpha$  activa l'expressió d'UCP-1 però no d'aP2 (*adipocyte fatty acid-binding protein*) (Puigserver *et al.*, 1998). Els corepressors capaces de suprimir l'activitat de PPAR $\gamma$  inclouen SMART, NCoR i RIP140 (Debevec *et al.*, 2007).

### 5.2.3.2. Lligants de PPAR $\gamma$ .

La identificació de lligants biològics de PPAR $\gamma$  és una qüestió no resolta encara que diferents evidències suggereixen que durant l'adipogènesi es produeix un activador de PPAR $\gamma$  que no ha sigut purificat (Forman *et al.*, 1997). Els àcids grassos poliinsaturats i d'altres molècules relacionades poden activar als PPAR (Keller *et al.*, 1993; Forman *et al.*, 1997; Kliewer *et al.*, 1997; Krey *et al.*, 1997), essent la resposta de l'isotip  $\gamma$  molt inferior a la de PPAR $\alpha$  i PPAR $\delta$ . La prostaglandina D2 (PGD2) i la 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 (15d-PGJ2), són capaços d'activar el receptor a concentracions micromolars (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995) però sembla ser que aquests eicosanoids es troben a molt baixa concentració *in vivo*. Els àcids grassos oxidats, com el 9-HODE i el 13-HODE, presents en les LDL oxidades, activen a PPAR $\gamma$  en la lesió arterioscleròtica (Nagy *et al.*, 1998) però la seva funció activadora en altres teixits no està clara.

A nivell sintètic s'han dissenyat les tiazolidinediones (TZD) (Lehmann *et al.*, 1995), rosiglitazona, troglitazona i pioglitazona, que s'utilitzen farmacològicament com a antidiabètics (revisat per Berger *et al.*, 2002). Altres lligants més selectius i més potents per a la transactivació de PPAR $\gamma$  (GW1929; GW7845; GI262570) s'han desenvolupat a partir de l'estructura i del mecanisme d'interacció d'aquest receptor amb les TZDs. Altres compostos no relacionats amb les TZDs que també uneixen PPAR $\gamma$  són LY-171883 (derivat de LTB4), alguns AINE, com la indometacina o el ibuprofè, i el GE-0207 (revisat per Willson *et al.*, 2000). En el cas de PPAR $\gamma$  existeixen també antagonistes com el BADGE (Wright *et al.*, 2000) i el GE0072 (Oberfield *et al.*, 1999) que interaccionen amb residus diferents del LBD.

### 5.2.3.3. Funcions biològiques.

- **PPAR $\gamma$  i diferenciació adipocitària.**

El paper de PPAR $\gamma$  en la diferenciació adipocitària s'ha desenvolupat en l'apartat de control transcripcional de la diferenciació adipocitària (secció 2 del bloc teixit adipós).

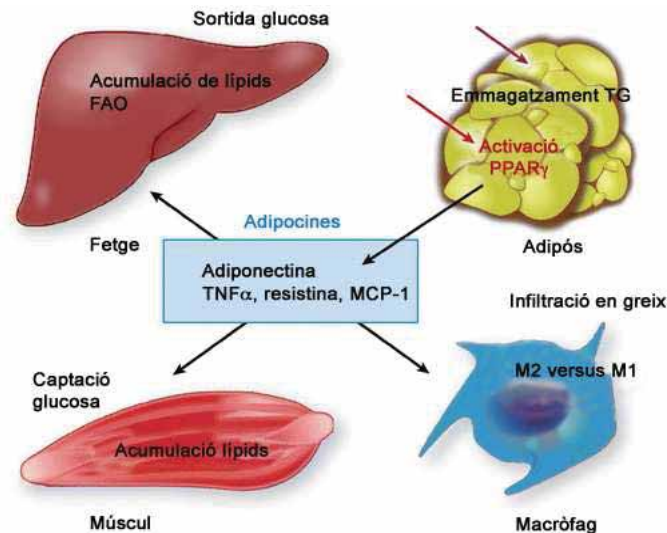
- **PPAR $\gamma$  i la resistència a insulina.**

Les tiazolidinediones (TZDs) són fàrmacs antidiabètics que milloren la sensibilitat a la insulina i disminueixen els nivells de glucosa en sang mitjançant la unió a PPAR $\gamma$ . Els ratolins amb activitat PPAR $\gamma$  incrementada degut a la mutació de la Ser112 que impedeix la seva fosforilació, són resistents a la obesitat i a la resistència a insulina (Rangwala *et al.*, 2003) mentre que els ratolins *knockout* de PPAR $\gamma$  en greix, múscul o fetge, estan predisposats al desenvolupament de la malaltia (He *et al.*, 2003; Hevener *et al.*, 2003; Matsusue *et al.*, 2003; Norris *et al.*, 2003).

Malgrat la gran rellevància metabòlica de PPAR $\gamma$  en diferents òrgans, es creu que el teixit adipós és el principal teixit responsable de l'efecte terapèutic de les TZDs (Rangwala *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2004). La diabetis tipus 2 està associada amb un increment dels nivells plasmàtics d'àcids grassos lliures i amb el dipòsit inapropiat de lípids en fetge i múscul esquelètic. L'activació dels gens diana de PPAR $\gamma$  en TAB, com ara aP2, LPL, CD36, entre d'altres (Tontonoz *et al.*, 1994a; 1995; 1998; Schoonjans *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1997; Kishida *et al.*, 2001), promou la seva capacitat per emmagatzemar àcids grassos provinents de la dieta i evita l'acumulació d'àcids grassos en teixits on provocarien efectes deleteris en l'acció de la insulina.

A més, les TZDs promouen l'expressió de l'adiponectina llur nivells plasmàtics estan inversament relacionats amb la massa del teixit adipós i directament correlacionats amb la sensibilitat a la insulina (Hu *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 2002). L'activació de PPAR $\gamma$  en adipòcits també està associada a la disminució de la producció de proteïnes que provoquen resistència a insulina com ara TNF $\alpha$  i resistina (Steppan *et al.*, 2001).

Els macròfags són cèl·lules especialitzades que juguen un paper crucial en la defensa de l'organisme però la seva infiltració en el teixit adipós provoca un increment en la producció de mediadors de la inflamació, com ara IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  i IL-6, que contribueixen a la patogènesi de la resistència a la insulina (Uysal *et al.*, 1997; Wellen *et al.*, 2005; Arkan *et al.*, 2005). PPAR $\gamma$  promou l'activació alternativa dels macròfags cap als macròfags de tipus M2, amb funcions antiinflamatòries. Així, els ratolins que no expressen PPAR $\gamma$  en els macròfags exhibeixen defectes en la producció de macròfags M2, mostren resistència a insulina i el tractament amb TZDs sols millora de manera parcial la sensibilitat a l'hormona (Odegaard *et al.*, 2007; Hevener *et al.*, 2007).



**FIGURA I-17. Mecanisme d'acció de les TZDs.** L'activació de PPAR $\gamma$  per TZDs regula el metabolisme glucídic i lipídic, provocant una millora de la sensibilitat a insulina. En el teixit adipós, PPAR $\gamma$  promou la captació i emmagatzament de lípids a través de l'activació dels seus gens diana. A l'hora, PPAR $\gamma$  també influencia la producció d'adipoquines, inclòs l'adiponectina, TNF $\alpha$ , MCP-1 i la resistina. La reducció d'àcids grassos lliures en sèrum i dels nivells tissulars de lípids, així com els canvis en l'expressió d'adipoquines, tenen efectes beneficiosos en el metabolisme de la glucosa, inclòs la supressió de la captació de glucosa hepàtica i l'estimulació de la captació de glucosa en el múscul esquelètic. L'activació de PPAR $\gamma$  també provoca el canvi de macròfags cap al fenotip antiinflamatori M2, reduint així la infiltració de macròfags en el teixit adipós (adaptat de Tontonoz *et al.*, 2008).

- **PPAR $\gamma$  i càncer.**

El tractament amb lligands de PPAR $\gamma$  exerceix un efecte antiproliferatiu en una gran varietat de cèl·lules tumorals (revisat per Han *et al.*, 2007) encara que el mecanisme mitjançant el qual l'activació de PPAR $\gamma$  altera el creixement cel·lular no està elucidat. S'ha vist que l'activació de PPAR $\gamma$  promou la fosforilació d'E2F, reduint la seva capacitat d'unió al DNA (Altiok *et al.*, 1997). Més recentment estudis, tant *in vitro* com *in vivo*, mostren que l'activació de PPAR $\gamma$  està associada amb una reducció dels nivells de  $\beta$ -catenina (Girnun *et al.*, 2002; Moldes *et al.*, 2003), el seu paper en la carcinogènesi del còlon i d'altres teixits ha sigut ben establert.

- **PPAR $\gamma$  i aterosclerosi.**

Els senyals antiinflamatoris en la paret del vas són crítics per al desenvolupament de la lesió arterioscleròtica, jugant els macròfags un paper central en aquest procés.

Inicialment es suggerí que la captació i emmagatzament de lípids depenent de PPAR $\gamma$  provocava un increment de la formació de cèl·lules escumoses i potenciava l'aterosclerosi (Nagy *et al.*, 1998). No obstant això, el tractament amb TZDs redueix l'aterosclerosi en ratolins (Li *et al.*, 2000). La relació directe entre PPAR $\gamma$  en macròfag i el desenvolupament de l'aterosclerosi fou demostrada mitjançant el transplantament de medul·la òssia PPAR $\gamma^{-/-}$  en ratolins LDLR $^{-/-}$ , que desenvolupen la lesió arterioscleròtica (Chawla *et al.*, 2001a). Una possible explicació d'aquest efecte protector de PPAR $\gamma$  és la seva capacitat per regular l'expressió d'LXR $\alpha$  i promoure el flux de colesterol en macròfags (Chawla *et al.*, 2001a; Akiyama *et al.*, 2002). Així, PPAR $\gamma$  coordina una resposta complexa dels lípids oxidats, que resulta en l'eliminació de lipoproteïnes modificades des de la paret arterial mitjançant la promoció de la via del transport revers de colesterol. D'acord amb aquest fet, s'ha demostrat que l'administració d'agonistes de PPAR $\gamma$  redueixen la formació de cèl·lules escumoses en ratolins LDLR $^{-/-}$  *in vivo* (Li *et al.*, 2004).

## EL TEIXIT ADIPÓS

Els lípids emmagatzemats al TAB són la major reserva energètica dels vertebrats. El TAB està compost per adipòcits madurs, que presenten entre 1/3 i 2/3 de la totalitat de les cèl·lules, i per una mescla de cèl·lules de l'estroma vascular que inclou cèl·lules sanguínies, cèl·lules endotelials i cèl·lules precursors d'adipòcits (preadipòcits). El teixit adipós es desenvolupa a diferents llocs de l'organisme, tant subcutàniament (TAB subcutani o inguinal) com al voltant de diferents òrgans (TAB visceral). El seu desenvolupament comença durant l'embriogènesi però el procés continua durant tota la vida i consta de dos fenòmens: augment de la mida de les cèl·lules (hipertròfia) i augment del nombre de les cèl·lules (hiperplàsia).

La funció principal del teixit adipós és el control de les reserves energètiques de l'organisme que conté emmagatzemades en forma de triglicèrids. Durant períodes d'excés calòric el teixit adipós emmagatzema els lípids i els sucres que hi ha en excés (lipogènesi) i durant estats de necessitat energètica allibera les reserves en forma d'àcids grassos lliures o no esterificats (FFA o NEFA) i glicerol (lipòlisi). Ambdós processos, lipogènesi i lipòlisi, estan estretament regulats i responen a estímuls exteriors com ara la insulina, el cortisol, les catecolamines, l'hormona de creixement, la testosterona, els FFA i diferents citoquines. El teixit adipós és també un òrgan endocrí ja que contribueix als processos d'homeòstasi glucídica i de sensibilitat a la insulina mitjançant l'alliberament d'adipocitoquines.

L'obesitat és una acumulació excessiva d'energia en forma de greix deguda al desequilibri del balanç energètic, és a dir, entre l'energia incorporada i la utilitzada. Implica un risc per a la salut ja que porta associada tot un conjunt d'anomalies metabòliques, diabetis tipus 2, dislipidèmia i malalties cardiovasculars, que es coneixen amb el nom de síndrome metabòlic.



## 1. DIFERENCIACIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS.

Les cèl·lules mare es converteixen en preadipòcits quan perden la capacitat de diferenciar-se en altres llinatges mesenquimals com ara els condrocits, els osteòcits i els miòcits (Taylor *et al.*, 1979; Pittenger *et al.*, 1999). Per a l'estudi de la diferenciació adipocitària s'han fet servir tant línies cel·lulars preadipocitàries com cultius primaris, obtinguts a partir de les cèl·lules de l'estroma vascular del teixit adipós. En aquest darrer model, els preadipòcits aïllats dels diferents dipòsits tenen característiques moleculars i bioquímiques diferents, la base de les quals, és totalment desconeguda (Djian *et al.*, 1985; Adams *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1998).

La diferenciació adipocitària és un procés multifactorial ordenat i ben caracteritzat. Inicialment es produeix l'arrestament del creixement dels preadipòcits proliferants, que és assolit pel contacte cèl·lula-cèl·lula, i induït, en línies cel·lulars cultivades, per l'addició al medi de cultiu d'un còctel d'hormones. A continuació té lloc l'expansió clonal mitòtica, una o dos divisions cel·lulars, que finalitza amb l'expressió dels factors de transcripció PPAR $\gamma$  i C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ ) (Shao *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1999). La inducció d'aquestes proteïnes és caracteritzada per un segon i permanent període de parada de creixement, seguit de l'expressió del fenotip sencer de diferenciació (revisat per Gregoire *et al.*, 1998).

El mecanisme mitjançant el qual PPAR $\gamma$  i C/EBP $\alpha$  indueixen l'arrestament del creixement cel·lular no està del tot elucidat. En cèl·lules 3T3-F442A no confluent l'activació de PPAR $\gamma$  es correlaciona amb la pèrdua de la capacitat d'unió al DNA del factor de transcripció E2F/DP, que és clau en la regulació de molts gens implicats en el creixement cel·lular (Altiok *et al.*, 1997). A més, l'activitat d'E2F també pot ser bloquejada per la unió de la proteïna del retinoblastoma (Rb) (Black *et al.*, 1999; Kaelin, 1999) de manera que en cèl·lules Rb *-/-* l'adipogènesi es troba inhibida (Higgins *et al.*, 1996) mentre que, al contrari, l'activació de Rb promou aquest procés (Chen *et al.*, 1996; Richon *et al.*, 1997). Per altra banda, en cèl·lules 3T3L1, els canvis en l'estat de diferenciació adipocitària es correlacionen amb canvis en l'expressió de diferents inhibidors de proteïnes quinases, inclòs p18, p21 i p27 (Morrison *et al.*, 1999). De fet, PPAR $\gamma$  promou l'expressió de p18 i p21 mentre que C/EBP $\alpha$  promou l'expressió i l'estabilització de p21 (Timchenko *et al.*, 1996).

Després d'aquest segon arrestament cel·lular, té lloc la diferenciació cap a la cèl·lula adipocitària madura. Durant la diferenciació primerenca apareix la LPL (MacDougald *et al.*, 1995), i els factors de transcripció C/EBP $\beta$  i C/EBP $\delta$  (Darlington *et al.*, 1998). A continuació es produeix l'acumulació de PPAR $\gamma$  i C/EBP $\alpha$ , que promouen l'expressió de la majoria de gens que caracteritzen el fenotip adipocitari, inclòs la glicerofosfat deshidrogenasa, la FAS, l'ACC1, GLUT4, el receptor d'insulina i aP2 (Spiegelman *et al.*, 1993). Durant aquest procés, la cèl·lula adopta una forma esfèrica, acumula gotícules lipídiques en el citoplasma i, progressivament, es converteix en l'adipòcit blanc madur.

## 2. CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA DIFERENCIACIÓ ADIPOCITÀRIA.

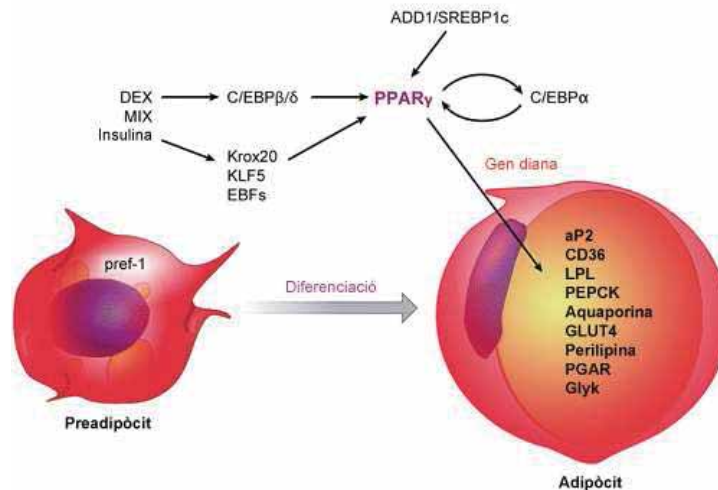
Els canvis en l'expressió i activitat dels factors de transcripció PPAR $\gamma$ , C/EBP i ADD1/SREBP-1c defineixen el procés de diferenciació adipocitària.

### 2.1. PPAR $\gamma$ .

PPAR $\gamma$  és el factor de transcripció clau en la regulació de l'adipogènesi, ja que la seva expressió és suficient i necessària per a que es doni aquest procés (Tontonoz *et al.*, 1994b; Chawla *et al.*, 1994). De fet, fins al moment no es coneix cap factor de transcripció capaç de promoure l'adipogènesi en absència de PPAR $\gamma$ . L'expressió ectòpica de PPAR $\gamma$  en fibroblasts indueix l'expressió de gens específics de la cèl·lula adiposa, com ara aP2, PEPCK, LPL, adiponectina i GLUT 4 (Tontonoz *et al.*, 1994a; 1995), i provoca la diferenciació morfològica, inclòs l'acumulació de gotícules lipídiques (Tontonoz *et al.*, 1994b). A més, l'expressió d'una forma dominant negativa de PPAR $\gamma$ , capaç d'unir-se al DNA però sense la capacitat de reclutar coactivadors, bloqueja la diferenciació de preadipòcits en cultiu (Barroso *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2000).

Com els ratolins *knockout* per a PPAR $\gamma$  moren durant l'embriogènesi, degut a un defecte en el desenvolupament de la placenta (Barak *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 1999), s'han desenvolupat estratègies alternatives amb l'objectiu de provar la importància d'aquest factor de transcripció en el desenvolupament del teixit adipós. En ratolins quimèrics, les cèl·lules nul·les per PPAR $\gamma$  no tenen la capacitat de contribuir a la formació dels adipòcits, encara que poden contribuir a la formació d'altres tipus cel·lulars (Rosen *et al.*, 1999). Per altra banda, mitjançant la tècnica de l'embrió

tetraploide, a partir de la qual s'obtingué un únic ratolí viable, s'observà que la deficiència de PPAR $\gamma$  en aquests animals provoca la manca tant de TAB com de TAM, i una profunda esteatosi hepàtica (Barak *et al.*, 1999). Recentment, diferents estudis mostren que la deleció selectiva de PPAR $\gamma$  en els adipòcits madurs compromet la seva viabilitat i provoca lipodistròfia i resistència a insulina (He *et al.*, 2003, Imai *et al.*, 2004).



**FIGURA I-18. PPAR $\gamma$  i l'adipogènesi.** PPAR $\gamma$  és el principal regulador de l'adipogènesi i es troba ubicat en el centre de la cascada adipogènica, en un bucle de retroalimentació amb C/EBP $\alpha$ . C/EBP $\beta$  i C/EBP $\delta$  es troben corrent amunt de PPAR $\gamma$ . Pref-1 és un marcador preadipocitàri. L'activació de PPAR $\gamma$  promou la diferenciació terminal a través de l'activació de gens implicats en la captació i emmagatzament de triglicèrids. DEX, dexametasona; Glyk, glicerol quinasa; MIX, metilisobutil xantina. (Adaptat de Tontonoz *et al.*, 2008).

## 2.2. Família C/EBP.

Les proteïnes d'unió a CCAAT/*enhancer* pertanyen a la família de factors de transcripció bHLH-*Zip*. S'han descrit sis isoformes, que actuen com a homodímers o heterodímers i la seva distribució tissular no està restringida al teixit adipós (Lekstrom-Himes *et al.*, 1998). No obstant això, s'ha observat la regulació de l'expressió de diferents membres de la família de C/EBPs durant l'adipogènesi, indicant que aquestes proteïnes juguen un paper fonamental en la diferenciació de la cèl·lula adiposa: les isoformes C/EBP $\beta$  i C/EBP $\delta$  s'expressen durant les primeres etapes d'aquest procés mentre que C/EBP $\alpha$  s'indueix durant l'etapa de diferenciació tardana, just abans de l'expressió de gens que constitueixen el fenotip de l'adipòcit madur (Cao *et al.* 1991; Yeh *et al.* 1995).

A nivell transcripcional, C/EBP $\beta$  s'indueix per CREB (*AMPC regulatory binding protein*), d'acord amb la necessitat dels inductors d'AMPC (isobutilmetilxantina) per a la iniciació del programa adipocitari; en canvi, C/EBP $\delta$  s'indueix per glucocorticoides i per C/EBP $\beta$  (Cao *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 2004). Les isoformes C/EBP $\beta$  i C/EBP $\delta$  són responsables de la regulació de l'expressió de C/EBP $\alpha$  i de PPAR $\gamma$  (Christy *et al.*, 1989; Clarke *et al.*, 1997). Sembla ser que la inducció de C/EBP $\beta$  i C/EBP $\delta$  promou l'expressió de PPAR $\gamma$  i que, PPAR $\gamma$  amb combinació amb aquestes isoformes de C/EBP, activen l'expressió de C/EBP $\alpha$  (Zuo *et al.*, 2006).

L'expressió ectòpica de C/EBP $\beta$  en preadipòcits 3T3L1 és suficient per a la inducció del programa adipogènic en absència d'inductors hormonals; en el cas de C/EBP $\delta$ , estudis similars indiquen que aquests agents prodiferenciadors són necessaris, però que el procés d'adipogènesi es veu accelerat per la seva sobreexpressió (Cao *et al.*, 1991; Yeh *et al.*, 1995). C/EBP $\beta$  podria ser capaç de determinar les cèl·lules cap al llinatge de l'adipòcit així com de promoure la seva diferenciació, ja que l'expressió ectòpica de C/EBP $\beta$  en fibroblast de la línia cel·lular no adipogènica NIH3T3 facilita la diferenciació d'aquestes cèl·lules mitjançant la inducció de l'expressió de PPAR $\gamma$ 2 (Wu *et al.*, 1995; 1996).

Els ratolins *knockout* per a C/EBP $\beta$  i C/EBP $\delta$  tenen una defecte en la producció del teixit adipós; no obstant això, aquest defecte sembla estar corrent avall de PPAR $\gamma$  i de C/EBP $\alpha$ , ja que ambdós factors de transcripció s'expressen en el poc teixit adipós diferenciat present en els animals (Tanaka *et al.*, 1997). Al contrari, els MEFs obtinguts a partir d'aquests ratolins no expressen ni C/EBP $\alpha$  ni PPAR $\gamma$  i són incapaços de dur a terme l'adipogènesi. Aquestes dades suggereixen l'existència d'algun mecanisme redundat en les primeres etapes de l'adipogènesi on, *in vivo*, diferents vies operen per assegurar l'expressió tant de PPAR $\gamma$  com de C/EBP $\alpha$ .

La implicació de C/EBP $\alpha$  en el procés de l'adipogènesi és més clar. La sobreexpressió de C/EBP $\alpha$  en preadipòcits 3T3L1 promou la diferenciació adipocitària (Freytag *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1994) i l'expressió, en el mateix model cel·lular, d'un RNA antisentit de C/EBP $\alpha$  bloqueja aquest procés (Lin *et al.*, 1992). C/EBP $\alpha$  transactiva molts gens relacionats amb el fenotip d'adipòcit madur com ara aP2/FABP, SCD1, GLUT4, PECK, leptina i el receptor d'insulina (Umek *et al.*, 1991). Els animals *knockout* per a C/EBP $\alpha$  moren després del naixement degut a la inhabilitat dels

nadons per produir glucosa, fenotip resultant del requeriment de C/EBP $\alpha$  per a la gluconeogènesi hepàtica (Wang *et al.*, 1995). L'eliminació de C/EBP $\alpha$  en tots els teixits excepte en el fetge revelen la importància d'aquest factor de transcripció per a la formació del TAB i la no afectació de la formació del TAM (Linhart *et al.*, 2001).

PPAR $\gamma$  pot induir l'adipogènesi en MEFs deficients en C/EBP $\alpha$ , mentre que C/EBP $\alpha$  és incapaç de conduir el programa adipogènic en absència de PPAR $\gamma$ , suggerint que cadascun d'aquests factors participen en una via única del desenvolupament adipocitari, essent PPAR $\gamma$  el factor dominant (Rosen *et al.*, 2002). La manca d'expressió de C/EBP $\alpha$  durant el període de diferenciació tardana provoca resistència a insulina en models cel·lulars i la inhabilitat de desenvolupar TAB *in vivo* (El-Jack *et al.*, 1999; Linhart *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1999). S'ha suggerit que C/EBP $\alpha$ , a més de controlar l'acció de la insulina, és requerit per al manteniment de l'expressió de PPAR $\gamma$  en la cèl·lula adiposa madura (Wu *et al.*, 1999).

### 2.3. ADD1/SREBP-1c.

L'expressió d'SREBP-1c en preadipòcits 3T3L1 ja es detecta 24 hores després de l'addició de les hormones inductores de la diferenciació, suggerint la importància d'aquest factor de transcripció en l'adipogènesi (Kim *et al.*, 1996). En aquest model cel·lular, l'expressió ectòpica d'SREBP-1c promou la diferenciació adipocitària, a través de la inducció directa de l'expressió de PPAR $\gamma$  (Fajas *et al.*, 1999) i a través de l'increment de l'activitat transcripcional de PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , probablement mitjançant la formació de lligands endògens de PPAR $\gamma$  (Kim *et al.*, 1996; 1998). A més, s'ha demostrat que la sobreexpressió d'una forma dominant negativa d'SREBP-1c bloqueja la diferenciació de les cèl·lules 3T3L1 (Kim *et al.*, 1998).

Els ratolins *knockout* per a SREBP-1 no mostren alteracions ni en la massa adipogènica ni en els nivells de gens lipogènics. És possible que la presència de baixos nivells d'SREBP-2 en greix compensin per la manca d'SREBP-1 (Shimano *et al.*, 1997a). Al contrari del que caldria esperar, la sobreexpressió en ratolins d'una forma constitutivament activa d'SREBP-1c provoca lipodistròfia, reflectint una desregulació del programa adipogènic, probablement degut als nivells aberrants del factor de transcripció. A més, aquests animals transgènics tenen el fetge greixós i són severament diabètics (Shimomura *et al.*, 1998).

## RITMES CIRCADIARIS

Els ritmes circadiaris son processos fisiològics recurrents d'aproximadament 24 hores que perduren en absència d'estímuls ambientals, reflectint l'existència d'un rellotge biològic intrínsec (Harmer *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2001).

Sota condicions naturals, aquests ritmes endògens estan sincronitzats amb l'ambient de manera que s'ajusten cada dia per estímuls externs o *Zeitgebers* (de l'alemany "zeit" (temps) i "geber" (donador)). Com a conseqüència de la sincronització s'estableix un període d'exactament 24 hores i es manté una relació de fase estable entre l'ambient i el ritme endogen, assegurant-se així la correspondència del temps biològic amb el geològic.

L'oscil·lació circadiària confereix un avantatge a l'organisme orquestrant temporalment els processos fisiològics i de comportament per a la millor adaptació als canvis diaris previsibles de l'ambient. Aquesta preadaptació produeix màquines biològiques més eficients (Woelfle *et al.*, 2004; Dodd *et al.*, 2005), conferint un avantatge que probablement reflexa la conservació al llarg de l'evolució, des d'organismes procarïotes fotosintètics als eucariotes superiors (Dunlap, 1999). A més, podria explicar perquè el rellotge circadiari s'ha adoptat per a la regulació de processos biològics tan diversos en mamífers com ara els cicles de son-vigília, temperatura corporal, secreció d'hormones, funció cardiopulmonar, i molts aspectes de la fisiologia del fetge, ronyó i tracte digestiu (Sensi *et al.*, 1993; Hastings *et al.*, 2003).

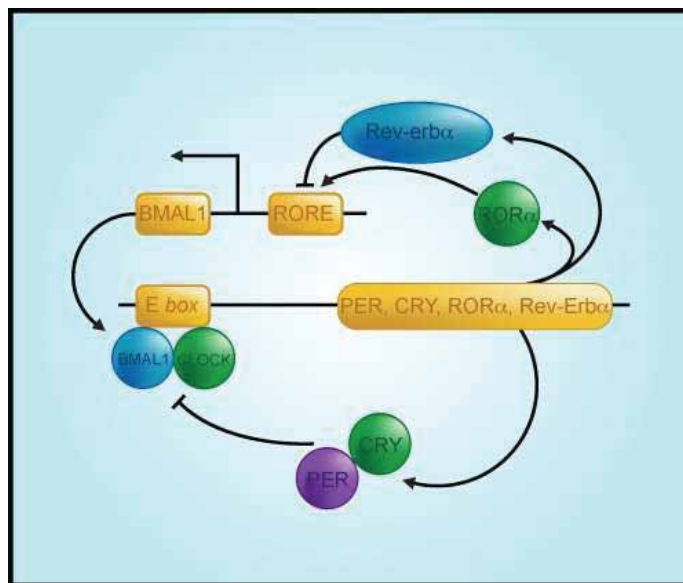
### 1. MECANISME MOLECULAR DEL RELLOTGE CIRCADIARI.

La base molecular del rellotge circadiari consisteix en varis bucles de retroalimentació positius i negatius, on proteïnes del rellotge regulen, tant a nivell transcripcional com a nivell traduccional, la seva abundància o activitat.

El principal bucle d'autoregulació implica els activadors transcripcionals BMAL (també anomenat MOP3) i CLOCK, que pertanyen a la subfamília bHLH (*basic helix-loop-helix*) (King *et al.* 1997; Gekakis *et al.*, 1998; Hogenesch *et al.*, 1998; Bunger *et al.*, 2000). BMAL i CLOCK heterodimeritzen i activen la transcripció de tres gens *period* (PER1-PER3) i dos gens *criptocrom* (CRY1 i CRY2) (Schibler *et al.*, 2002; Reppert *et al.*, 2002) mitjançant la unió a E boxes (CACGTG) presents en el seu promotor (Gekakis *et al.*, 1998; Hogenesch *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2002).

Les proteïnes resultants PER i CRY formen complexos que es transloquen al nucli, on les proteïnes CRY actuen com a reguladors negatius mitjançant la interacció directa amb CLOCK i/o BMAL per inhibir la transcripció, reprimint així la seva pròpia expressió (Kume *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999; Okamura *et al.*, 1999; Shearman *et al.*, 2000).

El segon bucle de retroalimentació important d'aquest sistema està format per les proteïnes ROR, Rev-erb i BMAL. Els factors de transcripció Rev-erbs (Rev-erb $\alpha$  i Rev-erb $\beta$ ), i ROR (ROR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) pertanyen a la subfamília de receptors nuclears orfes. Ambdós receptors, Rev-erb i ROR, reconeixen el mateix element de resposta (ROREs) dels gens diana (Forman *et al.*, 1994) però mentre que les proteïnes ROR són activadores transcripcionals, els Rev-erbs actuen com a repressors constitutius (Dumas *et al.*, 1994; Forman *et al.*, 1994; Retnakaran *et al.*, 1994). L'heterodímer BMAL/CLOCK activa la transcripció de Rev-erb $\alpha$  i aquest, reprimeix l'expressió de BMAL mitjançant la unió a dos ROREs presents en el seu promotor (Preitner *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2002); per altra banda, ROR $\alpha$ , a través dels mateixos elements de resposta, activa la transcripció de BMAL (Akashi *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2004).



**FIGURA I-19. Mecanisme molecular del rellotge circadiari.** BMAL i CLOCK heterodimeritzen i activen la transcripció de PER, CRY, ROR $\alpha$  i Rev-erb $\alpha$  a través del motiu E box. L'heterodímer PER i CRY es transloca al nucli i bloqueja la seva pròpia expressió mitjançant la interacció amb BMAL/CLOCK. Rev-erb $\alpha$  i ROR $\alpha$  actuen com a reguladors negatius i positius de BMAL, respectivament, a través de l'element RORE present en el seu promotor.



Com a conseqüència de l'activitat transcripcional de Rev-erb $\alpha$ , els nivells d'mRNA de BMAL disminueixen, mentre que els nivells d'mRNA de PER i CRY s'incrementen. Quan les proteïnes CRY entren en el nucli per inhibir la transcripció de PER i CRY (a través de l'acció de BMAL/CLOCK), també inhibeixen la transcripció de Rev-Erb $\alpha$  resultant en la desrepressió (activació) de la transcripció de BMAL (Shearman *et al.*, 2000; Preitner *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).

Aquest mecanisme està sotmès a regulació posttraduccional, com ara fosforilació (revisat per Reppert i Weaver, 2002), sumoïlació (Cardone *et al.*, 2005) i acetilació (Nakahata *et al.*, 2008; Asher *et al.*, 2008) que, juntament amb els patrons circadianis de l'abundància, de les interaccions i de la localització subcel·lular de proteïnes del rellotge, són essencials per al manteniment de l'oscil·lació rítmica.

## 2. L'ESTÍMUL DE LLUM EN EL NUCLI SUPRAQUIASMÀTIC.

El nucli supraquiasmàtic (NSQ) localitzat en l'hipotàlem, és el rellotge circadiari principal en mamífers (Moore *et al.* 1972; Rusak *et al.*, 1979; Ralph *et al.*, 1990). Aquest grup d'aproximadament 10 000 neurones es subdivideix en la regió ventral, que rep innervació directa des de la retina, i la regió dorsal, que sembla ser el marcapassos principal dels ritmes endògens (Hastings *et al.*, 2004).

El sincronitzador o *Zeitgeber* del rellotge central és la llum (Czeisler *et al.*, 1986), que sincronitza el ritme intern amb l'ambient. El NSQ rep l'estímul de llum, a través del tracte retinohipotalèmic (TRH) (Lucas *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2002), des de les cèl·lules ganglionals en la retina, que contenen el fotorpigment melanopsina (Provencio *et al.*, 2000; Hattar *et al.*, 2002; Provencio *et al.*, 2002), detectant així canvis en la intensitat lumínica durant el fotoperíode (Fu *et al.*, 2005).

Aquesta població de cèl·lules ganglionals de la retina és única en el fenotip neuropeptídic (ja que conté el polipèptid activador de l'adenilil ciclase pituïtària (PACAP) i melanopsina), té la morfologia apropiada (amb llargues cues dendrítiques) i es projecta directament en el NSQ (Gooley *et al.*, 2001; Hattar *et al.*, 2002; Hannibal *et al.*, 2002). A més, les cèl·lules ganglionals positives per melanopsina projectades en el NSQ responen directament a estímuls de llum, encara que es trobin físicament aïllades (Hattar *et al.*, 2002; Berson *et al.*, 2002). No obstant això, no està clar si la melanopsina és suficient per a la fotorrecepció circadiària.



Les neurones del NSQ reben i processen l'estímul de la llum. Els principals neurotransmissors del TRH són el glutamat i PACAP. Els estímuls fòtics i no fòtics també arriben al NSQ indirectament, a través del cervell mig, essent els principals transmissors el neuropèptid Y, l'àcid  $\gamma$ -aminobutíric i la serotonina (revisat per Reppert i Weaver, 2001).

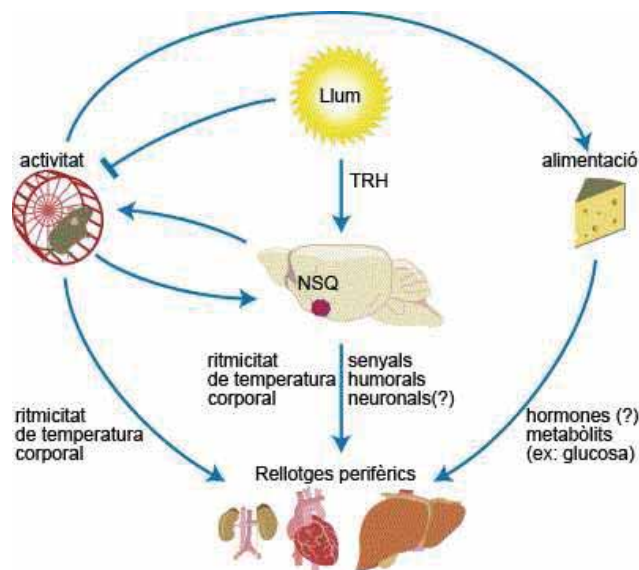
El mecanisme mitjançant el qual l'activació de les cèl·lules ganglionals provoca alteracions en el rellotge molecular de les neurones del NSQ encara no ha sigut elucidat. Sembla ser que l'acumulació nuclear de CRY depenent de PER es clau per a la resincronització de la fase circadiària (Lee *et al.*, 2001; Yagita *et al.*, 2002). Així, l'estímul de llum provoca la inducció de l'expressió gènica de PER1 i PER2, mitjançada per la unió de la proteïna CREB fosforilada (*cyclic AMP responsive element-binding protein*; pCREB) a l'element de resposta a cAMP (CRE) dels seus promotors (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002); aquest increment dels nivells de PER és necessari per a que més proteïna CRY sigui translocada al nucli, controlant d'aquesta manera el mecanisme del rellotge central.

### 3. OSCIL·LADORS PERIFÈRICS.

Els gens rellevants del rellotge molecular també s'expressen en els teixits perifèrics (Yamazaki *et al.*, 2000; Akhtar *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002; Storch *et al.*, 2002) on aproximadament el 5-10% del transcriptoma està subjecte a oscil·lació circadiària (Albrecht *et al.*, 2003).

D'acord amb el model actual, els oscil·ladors perifèrics estan sincronitzats amb el marcapassos central del NSQ, probablement a través de connexions sinàptiques i de senyals humorals (Silver *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2000). No obstant això, la fase dels oscil·ladors perifèrics pot ser completament desacobrada del NSQ. Així, en els rosegadors, l'alimentació diürna provoca una inversió de fase del patró d'expressió de gens del rellotge molecular en teixits com ara el fetge, el ronyó, el cor, i el pàncrees, però no en el NSQ (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001). Alteracions en el patró d'expressió rítmic de gens del rellotge molecular en teixits perifèrics (i no en el NSQ) també s'han descrit en animals alimentats amb una dieta rica en greix (Kohsaka *et al.*, 2007).

El *Zeitgeber* dominant dels rellotges perifèrics és el menjar encara que el mecanisme mitjançant el qual sincronitza aquest rellotges no està del tot elucidat. Sembla ser que aquesta sincronització implica les propietats sensibles del potencial redox de CLOCK i BMAL, ja que *in vitro* la unió al motiu *E box* és estrictament dependent del ratio entre NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> (Rutter *et al.*, 2001). A més, s'ha vist que la glucosa pot suprimir l'expressió de PER1 i PER2 (Hirota *et al.*, 2002), de manera que les oscil·lacions diàries en la seva captació i utilització podrien participar en la sincronització dels oscil·ladors perifèrics, probablement a través del mecanisme redox abans mencionat. Per altra banda, les hormones relacionades amb l'estat d'alimentació com ara el glucagó, la insulina i els glucocorticoids (Le Minh *et al.*, 2001; Kuriyama *et al.*, 2004) també estan implicades en la sincronització dels rellotges perifèrics. Finalment, els estímuls químics poden venir reforçats pels ritmes en la temperatura corporal, que poden promoure l'oscil·lació circadiària de l'expressió gènica durant varis dies. A més, els cicles de temperatura ambiental contraris al ritme natural-calor durant la nit i fred durant el dia- poden provocar un canvi de fase de l'oscil·lació circadiària en teixits perifèrics de ratolí. Un altra cop, la fase del NSQ no es veu alterada pels canvis de temperatura ambiental (Brown *et al.*, 2002).



**FIGURA I-20. Establiment de fase dels rellotges circadianis Central i Perifèric en rosegadors nocturns.** Les neurones del NSQ reben la informació lumínica directament des de la retina i del TRH, assegurant la sincronització del ritme endogen amb el temps geològic. El NSQ sincronitza els rellotges perifèrics mitjançant mecanismes directes i indirectes. Els mecanismes indirectes inclouen els cicles d'activitat-repos i, en conseqüència, l'alimentació, que constitueix el *Zeitgeber* principal dels rellotges perifèrics, probablement a través dels metabòlits del menjar i les hormones relacionades amb l'estat d'alimentació. Els cicles d'activitat també afecten a la temperatura corporal, que pot participar en la sincronització dels rellotges perifèrics. Els mecanismes directes deuen implicar hormones i senyals neuronals secretades cíclicament i connectades als rellotges perifèrics a través del sistema nerviós perifèric i dels ritmes de temperatura corporal. La llum també pot suprimir directament l'activitat dels rosegadors i generar així una activitat locomotora cíclica. (Adaptat d'Schibler *et al.*, 2002).

En mamífers, l'homeòstasi metabòlica és el principal propòsit de l'oscil·lació circadiària de l'expressió gènica en els teixits perifèrics i està estretament connectada amb l'alimentació. En el fetge, que juga un paper dominant en el metabolisme i processament del menjar, l'expressió rítmica s'ha observat en enzims implicats en l'homeòstasi de la glucosa (Ishikawa *et al.*, 1976; Panda *et al.*, 2002; Rudic *et al.*, 2004), en la biosíntesi de colesterol (Edwards *et al.*, 1972; Panda *et al.*, 2002), en la conversió de colesterol en àcids biliars (Lavery *et al.*, 1993), en el metabolisme d'aminoàcids, proteïnes i xenobiòtics (Focan, 1995; Panda *et al.*, 2002), en el metabolisme de fosfolípids (Marquez *et al.*, 2004) i en molts factors de transcripció implicats en la regulació dels processos metabòlics abans esmentats, com ara SREBPs (Brewer *et al.*, 2007) i el 50% de membres de la superfamília de receptors nuclears (Yang *et al.*, 2006; Teboul *et al.*, 2008), suggerint que l'oscil·lació de proteïnes reguladores podria determinar directament la ritmicitat de determinats gens diana per tal d'assolir l'homeòstasi fisiològica.



## **MATERIALS I MÈTODES**



En el capítol que aquí s'inicia s'expliquen les característiques del material biològic, així com els mètodes emprats en la realització d'aquest treball. Oligonucleòtids i construccions generades es descriuen en l'apèndix.

Totes les solucions utilitzades es van preparar amb aigua MiliQ autoclavada (30 minuts, 121 °C, 1.2 atm.) i aquelles que contenien substàncies làbils a aquest procés d'esterilització es van filtrar a través de filtres Millipore® de 0.2 µM de porus. Si no existeixen especificacions pròpies, totes les solucions es guardaren i tots els protocols es desenvoluparen a temperatura ambient.

Les tècniques i preparacions de reactius bàsics en biologia molecular que no es detallen en aquest capítol van realitzar-se segons Sambrook *et al.* (1989) i Ausubel *et al.* (1994) o bé seguint les instruccions de la casa comercial.

## MATERIALS

### 1. SOQUES BACTERIANES.

Es van emprar tres soques d'*Escherichia coli* per a la propagació i selecció de plasmidis i l'expressió de proteïnes.

<u>Soca</u>	<u>Genotip/fenotip</u>	<u>Referència</u>
<b>XL1-Blue</b>	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene
<b>DH5α</b>	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ-	GibcoBRL
<b>BL21</b>	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Invitrogen

Aquestes soques es van créixer en medi LB i una alíquota es va conservar congelada a -80 °C en medi LB al 15% de glicerol.

## 2. LÍNIES CEL·LULARS ESTABLERTES.

A continuació es mostra una relació de les línies cel·lulars de mamífers emprades en aquest treball.

<u>Línia cel·lular</u>	<u>Descripció (teixit i organisme)</u>	<u>Referència</u>
<b>CaCo-2</b>	Adenocarcinoma colorectal humà	ATCC HTB-37
<b>Cos7</b>	Ronyó de mico verd ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	ATCC CRL-1651
<b>Hek293</b>	Ronyó d'embrió humà	ATCC CRL-1573
<b>HeLa</b>	Adenocarcinoma de cèrvix humà	ATCC CCL-2
<b>HeLa Tet-On®</b>	Adenocarcinoma de cèrvix humà; estable per al plasmidi pTet-On	Clontech ref. 632110
<b>HeLa Tet-On AACS</b>	Adenocarcinoma de cèrvix humà; sobreexpressió induïda del gen AACS.	Present tesi
<b>HepG2</b>	Hepatoblastoma humà	ATCC HTB-8065
<b>HIB-1B</b>	Línia preadipocitària (TAM) de ratolí	Ross <i>et al.</i> , 1992
<b>Mev-1</b>	Cèl·lules mutants en l'activitat HMG-CoA sintasa 1 derivades de la línia CHO-K1	Schnitzer-Polokoff <i>et al.</i> , 1982
<b>3T3-F422A</b>	Línia preadipocitària (TAB) de ratolí	Green <i>et al.</i> , 1974
<b>3T3L1</b>	Línia preadipocitària (TAB) de ratolí	ATCC CL 173

## 3. ANIMALS.

Per a la realització dels experiments *in vivo* s'empraren rates mascle Sprague-Dawley adultes, mantingudes en unes condicions d'estabulació estàndard (temperatura constant de 22-24 °C, humitat del 75% i un cicle de llum-fosc de 12 hores) i si no s'indica el contrari, alimentades amb una dieta equilibrada de laboratori i aigua *ad libitum*.

Tots els protocols emprats foren aprovats pel comitè d'ètica en l'experimentació animal de la Universitat de Barcelona.



## 4. VECTORS.

En aquests apartat es descriuen els vectors emprats per al present treball. Les construccions generades es recullen a l'apèndix.

### 4.1. Vectors de subclonatge i anàlisi de DNA.

**pBluescript SK+/-:** Conté els promotors T3 i T7, i una zona de clonatge amb diferents dianes de restricció úniques (Stratagene).

**pGEM<sup>®</sup>-T:** vector linealitzat per digestió amb l'enzim EcoRV que presenta una timidina afegida als extrems 3', facilitant el clonatge de productes de PCR als que la *Taq* polimerasa ha afegit una adenina en finalitzar la síntesi de la cadena naixent. Conté els promotors T7 i SP6, i una zona de clonatge amb diferents dianes de restricció úniques (Promega ref. A3600).

Ambdós vectors són d'alt número de còpia, confereixen resistència a ampicil·lina i inclouen en la seva seqüència el gen *lacZ*, permetent la selecció per color de les colònies recombinants. La inserció de fragments de DNA en el *polylinker* provoca la interrupció de la regió codificant del gen *lacZ* i la pèrdua de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa. La replicació d'aquests plasmidis es va dur a terme en les soques XL1-Blue o DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Un cop transformades es sembraren en medi LB suplementat amb ampicil·lina (100 mg/L), IPTG (8 mg/L) i X-Gal (40 mg/L). En aquestes condicions, les colònies recombinants apareixen de color blanc, per incapacitat d'hidrolitzar el substrat X-gal, mentre que les que han incorporat el vector buit son blaves, per presència de productes d'hidròlisi de X-gal.

### 4.2. Vectors d'expressió procariota.

**pGEX-4T:** Vector utilitzat per la producció de proteïnes de fusió amb la Glutatió-S-transferasa (GST) en *Escherichia coli*. Conté una zona de dianes de clonatge úniques, confereix resistència a ampicil·lina i el seu promotor (Tac) és induïble per IPTG. Existeixen tres vectors pGEX-4T: pGEX-4T1 (ref. 27-4580-01) pGEX-4T2 (ref. 27-4581-01) i pGEX-4T3 (ref. 27-4583-01) que presenten la zona de les dianes de restricció segons els diferents marcs de lectura, permetent el clonatge dels cDNAs de manera que es generi correctament la proteïna de fusió (Amersham Biosciences).

#### 4.3. Vectors d'expressió eucariota.

<u>Vector:</u>	<u>Expressió <i>in vivo</i>:</u>	<u>Expressió <i>in vitro</i>:</u>	<u>Antibiòtic selecció:</u>	<u>Referència:</u>
<b>pSG5</b>	Promotor SV40	Promotor T7	Ampicil·lina	Green <i>et al.</i> , 1988
<b>pcDNA3</b>	Promotor CMV	Promotor T7/SP6	Ampicil·lina	Umesono <i>et al.</i> , 1991
<b>pCDM8</b>	Promotor CMV	Promotor T7	Ampicil·lina	Invitrogen, ref. V30820
<b>pSV-SPORT</b>	Promotor SV40	Promotor T7/SP6	Ampicil·lina	GIBCO-BRL, ref. 15386014
<b>pCMV5flag</b>	Promotor CMV	-	Ampicil·lina	Cedit pel Dr. Seoane
<b>pTet-On</b>	Promotor CMV	-	Ampicil·lina	Clontech ref. 630930
<b>pTRE2hyg</b>	Promotor SV40	-	Ampicil·lina	Clontech ref. 630930

#### 4.4. Vectors reporters.

Els sistemes reporters amb el gen luc (Promega) permeten l'estudi de seqüències reguladores de la transcripció eucariota. Després de la transfecció de cèl·lules eucariotes en cultiu, es poden detectar els efectes transcripcionals sobre el gen luc mesurant els nivells d'activitat luciferasa de la cuca de llum (*Photinus pyralis*). Aquesta activitat és pràcticament absent en les cèl·lules de mamífer de manera que la luminescència detectada en els lisats cel·lulars és directament proporcional a l'activitat promotora de la construcció transfectada.

**pGL3Basic:** Vector mancat de promotor eucariota i de seqüències *enhancer*, confereix resistència a ampicil·lina i presenta una zona de clonatge múltiple corrent amunt del gen luc. S'empra per a l'estudi de promotors ja que l'activitat de l'enzim luciferasa en les cèl·lules transfectades amb aquest plasmidi depèn de la funcionalitat del promotor inserit corrent amunt del reporter (Promega, ref. E1751)

**pGL3Promoter:** Vector amb el promotor viral del SV40 corrent amunt del gen de la luciferasa. Confereix resistència a ampicil·lina i presenta una zona de clonatge múltiple a 5' del gen luc, permetent l'estudi de putatius elements reguladors en un promotor eucariòtic heteròleg (Promega, ref. E1761).

**pRL-CMV:** Vector d'expressió constitutiva del gen luc de *renilla* (*Renilla reniformis*) sota el promotor del CMV. S'utilitza com a control de l'eficiència de transfecció en cèl·lules de mamífer en cultiu (Promega, ref. E2261).

## 5. OLIGONUCLEÒTIDS.

Tots els oligonucleòtids utilitzats en aquests treball van ser sintetitzats per Sigma-Genosys amb un grau de puresa de HPLC. En l'apèndix es detalla la seqüència dels oligonucleòtids emprats.

## 6. ANTICOSSOS.

A continuació es mostra una relació dels anticossos emprats.

**AACS:** Anticòs policlonal de conill obtingut front al pèptid RLNYAENLLRHKENDC (present tesi).

**Acetil-lisina:** Anticòs policlonal de conill obtingut front a un pèptid acetilat (Cell Signaling, ref. 9441).

**Acetil-lisina, clon 4G12, conjugat a agarosa:** Anticòs monoclonal de ratolí obtingut front a una col·lecció de diversos antígens químicament acetilats i conjugat a proteïna G agarosa (Upstate, ref. 16-272).

**FLAG<sup>®</sup> M2 :** Anticòs monoclonal de ratolí obtingut front al pèptid Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (pèptid *FLAG<sup>®</sup>*) emprat com a "etiqueta" en l'expressió de proteïnes de fusió en sistemes eucariotes (Sigma-Aldrich, ref. F3165).

**GST:** anticòs monoclonal de ratolí obtingut contra la proteïna de fusió GST de 26 KDa del vector pGEX (Santa Cruz Biotechnology, ref. sc-138).

**HA:** Hibridoma 12CA5; (laboratori Dr. Gil, IMIM; Barcelona).

**Myc:** Hibridoma 9E10 (laboratori Dr. Ayté, UPF; Barcelona).

**PPAR $\gamma$ :** Anticòs policlonal de conill obtingut contra els aminoàcids 6-105 de PPAR $\gamma$  d'origen humà (Santa Cruz Biotechnology, ref. sc-7196).

**SP-1 (PEP-2):** Anticòs policlonal de conill obtingut contra la proteïna Sp1 humana (Upstate ref. 07-645).

**Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked:** Anticòs conjugat a l'enzim peroxidasa que reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari (conill), permetent la localització dels punts de la membrana on aquest s'ha unit (Amersham Biosciences, ref. NA934V).

**Anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked:** Anticòs conjugat a l'enzim peroxidasa que reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari (ratolí), permetent la localització dels punts de la membrana on aquest s'ha unit (Amersham Biosciences, ref. NA931V).

## 7. REACTIUS.

### 7.1. Reactius utilitzats en cultius cel·lulars.

Tot el material estèril de plàstic per treballar amb cultius cel·lulars (plaques, flascons, pipetes, criotubs, etc.) es va adquirir a la casa comercial Corning.

A continuació es descriuen els reactius més comunament emprats durant la propagació de cultius cel·lulars:

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco BRL ref. 52100-039
Minimum essential medium (MEM)	Gibco BRL ref. 61100-087
DMEM:F12	Gibco BRL ref. 31330-038
Sèrum boví fetal (Foetal Bovine Serum)	Gibco BRL ref. 10270-106
Sèrum boví deficient en lipoproteïnes	Sigma ref. S-5394
Charcoal stripped foetal bovine serum	Biological Industries Lot. 613032
Penicil·lina- Estreptomicina 10.000 U.I./mL	Gibco BRL ref. 15140-122
L-glutamina 200 mM	Gibco BRL ref. 25030-024
Bicarbonat sòdic en solució al 7,5 %	Sigma ref. S-8761
Tripsina EDTA	Gibco BRL ref. 15400-054
Fungizona	Gibco BRL ref. 15290-026

Els reactius referenciats a continuació s'empraren com a tractaments puntuals en cultius cel·lulars. En cada cas s'indica el solvent emprat i la concentració final. Un cop dissolts els reactius, es van fer alíquotes i es guardaren a -20°C.

**Acetoacetat** (Sigma ref. A8509): cos cetònic. Es dissol en H<sub>2</sub>O a una concentració de 1 mM.

**Àcid 9-cis retinoic** (Sigma ref. R4643): lligant d'RAR i d'RXR. Es dissol en DMSO a una concentració de 10 mM.

**$\beta$ -hidroxibutirat** (Sigma ref. H3145): cos cetònic. Es dissol en H<sub>2</sub>O a una concentració de 10 M.

**Dexametasona** (Sigma ref. D4902): glucocorticoide emprat per a la inducció de la diferenciació dels cultius preadipocitaris. Es dissol en etanol a una concentració de 0.25 mM. Es guarda a 4°C.

**IBMX** (Sigma ref. I7018): Inhibidor no específic de les cAMP i cGMP fosfodiesterases. L'increment dels nivells de cAMP promouen la diferenciació dels cultius preadipocitaris. Es prepara al moment i es dissol en DMSO a una concentració de 0.5 M.

**Insulina** (Sigma ref. I1882): hormona sintetitzada per les cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques necessària per a la diferenciació dels cultius preadipocitaris. Es dissol en H<sub>2</sub>O àcida a una concentració de 5 mg/mL.

**Mitramicina** (Sigma ref. M6891): Impedeix la unió d'Sp1 al DNA. Es dissol amb metanol a una concentració de 10 mg/mL.

**Nicotinamida** (Sigma ref. N0636): Inhibeix les proteïnes desacetilases dependents de NAD<sup>+</sup>. Es dissol en H<sub>2</sub>O a una concentració de 400 mM.

**Pravastatina** (Sigma ref. P4498): Inhibidor competitiu de l'enzim HMG-CoA reductasa. Inhibeix la síntesi de colesterol *in vivo* (K<sub>i</sub> ~1 nM). Es dissol en H<sub>2</sub>O a una concentració de 10 mM.

**Rosiglitazona** (Alexis ref. 350-103-M025): lligant de PPAR $\gamma$ . Es dissol en DMSO a una concentració de 10 mM.

**TSA** (Sigma ref. T1952): Inhibeix histones desacetilases. Es dissol en DMSO e una concentració de 5 mM.

**T0901317** (Cayman ref. 71810): lligant d'LXR. Es dissol en DMSO a una concentració de 10 mM.

**25-OH colesterol** (Sigma ref. H1015): impedeix la escissió dels SREBPs del reticle endoplasmàtic. Es dissol en etanol a una concentració de 2 mg/mL.

A continuació es descriuen els antibiòtics emprats com a tractaments puntuals en cultius cel·lulars o bé per a la selecció i manteniment de línies cel·lulars estables. En cada cas s'indica el solvent emprat, la concentració final i la temperatura en la que es guardaren les alíquotes.

**Actinomicina D** (Sigma ref. A9415): Inhibeix la transcripció. Es dissol en DMSO a una concentració de 5 mg/mL. Es guarda a 4°C.

**Cicloheximida** (Sigma ref. C0934): Inhibeix la traducció. Es dissol en etanol a una concentració de 10 mg/mL. Es guarda a -20°C.

**Doxiciclina** (BD Biosciences ref. 8634-1): Inducció dels sistemes Tet. Es dissol en H<sub>2</sub>O a una concentració de 1 mg/mL. Es guarda a -20°C.

**Geneticina** (Sigma ref. A1720): Selecció de cèl·lules transfectades amb el gen neo<sup>R</sup>. Es dissol en H<sub>2</sub>O a una concentració de 100 mg/mL. Es guarda a -20°C.

**Higromicina B** (Invitrogen ref. 10687-010): Selecció de cèl·lules transfectades amb el gen hph. Es dissol en PBS a una concentració de 50 mg/mL. Es guarda a 4°C.

## 7.2. Composts radioactius.

**[1-<sup>14</sup>C] Àcid acètic, sal sòdica (57 mCi/ mmol)**: utilitzat en els experiments d'incorporació de <sup>14</sup>C-Acetat a colesterol (Amersham Biosciences, ref. B287).

**[<sup>14</sup>C] Colesterol**: utilitzat com a patró per a la identificació de la identitat del colesterol en els experiments de cromatografia (NEN Products ref. NEC-018).

**[α-<sup>32</sup>P]dCTP (3000Ci/mmol)**: utilitzat en els marcatges de fragments de DNA per Random Primed, en experiments d'hibridació d'àcids nucleics (Amersham Biosciences, ref. AA0005).

**L-[<sup>35</sup>S] Methionine (1000Ci/mmol)**: utilitzat en protocols de transcripció i traducció *in vitro* per generar proteïnes radioactives en assajos de *GST-pull-down* (Amersham Biosciences, ref. SJ1015).

## 7.3. Marcadors de pes molecular.

Marcador DNA 1Kb	Bitools ref. 31005
Marcador DNA 100pb	Bitools ref. 31006
<i>RNA markers</i> 0.28-6.58 kb	Promega ref. 63191
<i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i>	Fermentas ref. SM0441

#### 7.4. Altres reactius.

Altres reactius i *kits* emprats es detallen en l'apartat de mètodes.

### 8. EINES INFORMÀTIQUES.

**Basic Local Alignment tools (2.2.18+);** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (*National Center for Biotechnology Laboratory-NCBI-USA*).

**CLC Sequence Viewer 4.6.1** (CLC Bio).

**Clustal-W software** <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> (*European Molecular Biology Laboratory-EMBL-Hinxton, UK*).

**Entrez-Pubmed;** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (*National Center for Biotechnology Laboratory-NCBI-USA*).

**Image Quant TL v5.2** (Amersham Biosciences).

**Kodak MI v.4.0.4.** *Molecular Imaging software* (Eastman Kodak Company)

**Prediction of Acetylation on Internal Lysines** disponible a <http://bioinformatics.lcd-ustc.org/pail> (Liu *et al.*, 2007).

**PROSCAN** (versió 1.7) disponible a <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/> (*Center for Information Technology, National Institutes of Health*)

**PROSITE;** Base de dades de famílies de proteïnes i dominis. Disponible a <http://www.expasy.org/prosite/> (*Swiss Institute of Bioinformatics*).

**SPSS v11.5** (SPSS Inc., Chicago, USA).

**TFSearch** (versió1.3) disponible a [www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) (*Computational Biology Research Center , AIST , Japan*)

**Vista;** [www-gsd.lbl.gov/vista/](http://www-gsd.lbl.gov/vista/) (*Genomics Division of Lawrence Berkeley National Laboratory*)

**Webcutter software;** [www.firstmarket.com/cutter](http://www.firstmarket.com/cutter) (Carolina Biological Supply Co.)

## MÈTODES

### 1. OBTENCIÓ DE DNA.

#### 1.1. Cultius bacterians.

Per a l'obtenció de DNA plasmídic, es va créixer la soca bacteriana que conté el plasmidi d'interès en medi líquid LB/antibiòtic. L'antibiòtic de selecció va ser ampicil·lina (100 mg/L) o kanamicina (25 mg/L) depenent del vector. El volum de medi dels inòculs s'escollí en funció de la quantitat de DNA que es volia obtenir: 2 mL per una obtenció a petita escala (mini-preparació) o 100 mL per una obtenció a gran escala (maxi-preparació). En el primer dels casos era aconsellable iniciar el cultiu a partir d'una colònia aïllada crescuda en medi sòlid. En el segon calia un pre-inòcul de volum inferior (2-10 mL) perquè el creixement fos òptim.

#### **LB (Luria-Bertrani Broth) pH 7.4:**

Triptona	10 g/L
Extracte de llevat	5 g/L
NaCl	5 g/L

(Les plaques de LB sòlid contenen un 1.5% d'agar)

#### 1.2. Preparació de DNA plasmídic.

Els mètodes de preparació de DNA plasmídic descrits a continuació, es basen en el protocol de lisi alcalina de la paret bacteriana de Birnboim *et al.* (1979). Els plasmidis obtinguts per aquests sistemes es troben, majoritàriament, en forma circular tancada (superenrotllat) i en general no necessiten purificacions posteriors per la manipulació enzimàtica.

El procés consisteix en una lisi suau de la paret bacteriana en medi alcalí permetent que el cromosoma bacterià quedi associat a les parets i pugui ser eliminat per centrifugació amb les restes de membranes. El DNA plasmídic queda en el sobrenedant i és purificat mitjançant una resina d'intercanvi iònic obtenint-se rendiments d'entre 1-5 µg de DNA/mL de cultiu.

Les preparacions a petita escala de DNA es van realitzar amb el *kit* comercial *Wizard™ Minipreps DNA Purification* (Promega, ref. A1460), obtenint-se 1-10 µg de DNA d'un plasmidi d'alt número de copia en un cultiu de 2 mL. En l'obtenció de grans quantitats de DNA es va utilitzar el *kit Nucleobond AX 500 / 50 cart.* (Cultek, ref. 740531.50), obtenint-se 100-500 µg de DNA d'un plasmidi d'alt número de copia en un cultiu de 100 mL.



### 1.3. Preparació de DNA genòmic de cultius cel·lulars.

S'emprà el mètode descrit per Blin i Statford (1976) que permet l'obtenció de DNA genòmic de fins a 150 Kb a partir de teixit o cèl·lules en cultiu. Es va partir d'una placa HeLa confluent que es rentà dos vegades amb TBS fred. Es recolliren les cèl·lules per centrifugació a 1500g durant 10 minuts i a 4°C i es repetí el rentat amb 1 mL de TBS fred. Es tornà a centrifugar en les mateixes condicions i es va resuspendre el *pellet* cel·lular en 200 µL de TE pH 8. S'incubà durant 1 hora a 37°C en 1 mL de tampó d'extracció de DNA genòmic i finalment, s'afegí proteïnasa K a una concentració final de 100 µg/mL i s'incubà durant tres hores més a 50°C sota agitació periòdica i manual.

#### Tampó d'extracció de DNA genòmic:

Tris-HCl	10 mM (pH 8.0)
EDTA	0.1 M (pH 8.0)
SDS	0.5 %
RNasa pancreàtica	20 µg/mL

Es realitzaren dos extraccions amb fenol seguides d'una precipitació amb etanol. Aparegué una medusa de DNA que fou captada amb pipeta *Pasteur* segellada. S'afegí 1 mL de TE pH 8 i es deixà en rotació durant 12-24 hores fins que es produí la total dissolució del DNA.

Aquest mètode s'emprà per a l'obtenció de DNA genòmic de la línia cel·lular HeLa Tet-On AACs i analitzar, mitjançant la tècnica de la PCR, si el plasmidi pTRE2HygAACs s'havia inserit correctament en el genoma.

### 1.4. Extracció de proteïnes, precipitació i quantificació del DNA.

#### 1.4.1. Extracció de proteïnes.

L'extracció amb fenol:cloroform es va dur a terme per tal d'eliminar les proteïnes de solucions de DNA; el fenol desnaturalitza les proteïnes però l'eliminació de proteïnes és més eficient usant dos solvents orgànics. A la solució de DNA es va afegir 1 volum de la barreja fenol:cloroform (1:1), s'agità per vòrtex fins a formar una emulsió, es centrifugà a màxima velocitat durant 5 minuts i es va prendre la fase aquosa, descartant la interfase. S'afegí un volum de cloroform i es va repetir el procés, prenent la fase aquosa i eliminant així les traces de fenol restants a la solució.

#### 1.4.2. Precipitació del DNA.

La precipitació del DNA té lloc a  $-20^{\circ}\text{C}$  durant 1 hora com a mínim, en presència de 2.5 volums d'etanol absolut i 0.1 volum d'acetat sòdic 3 M pH 5.2. Posteriorment, es centrifugà a 15000 rpm durant 20 minuts i a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sediment obtingut es rentà amb etanol al 70% i, després de tornar a centrifugar durant 5 minuts, s'enretirà el sobrenedant. El DNA precipitat va ser resuspès en aigua MilliQ autoclavada o TE pH 8.0.

#### 1.4.3. Quantificació del DNA.

La concentració de DNA es determina per espectrofotometria mesurant l'absorbància de la mostra a 260 nm i 280 nm i tenint en compte que 1 unitat de densitat òptica a 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) correspon a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA de cadena doble (DNAdS). La relació entre les dues absorbàncies indica la puresa de la mostra i es consideren acceptables valors  $>1.8$ .

La lectura espectrofotomètrica es va realitzar en cubetes de quars, emprant un espectrofotòmetre Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech), o bé, per addició directa de 2  $\mu\text{L}$  de suspensió a quantificar, en un NanoDrop-1000 (*NanoDrop Technologies, Inc*).

Per la quantificació de petites quantitats de DNA es van resoldre els fragments en gels d'agarosa/TAE/bromur d'etidi.

### 1.5. Resolució, identificació i purificació de fragments de DNA.

#### 1.5.1. Separació de fragments de DNA en gels d'agarosa/TAE/bromur d'etidi.

L'electroforesi en gel d'agarosa permet la separació analítica o preparativa de fragments de DNA de mides compreses entre 50 pb i 25 kb. La resolució d'aquests gels ve determinada per la concentració d'agarosa (0.8-4%), permetent la separació de fragments de menor mida incrementant la relació agarosa/TAE.

La comparació de les mobilitats electroforètiques de les bandes resoltes en un gel d'agarosa amb fragments de DNA de mida coneguda permet el càlcul del pes molecular d'un DNA lineal, tenint en compte que la mobilitat electroforètica d'un fragment de DNA en un gel d'agarosa és inversament proporcional al logaritme del seu pes.

Per preparar els gels d'agarosa es va dissoldre, en calent, l'agarosa (Pronadisa ref. 8008) en el tampó d'electroforesi (TAE1x) i s'afegiren 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromur d'etidi (Sigma ref. E4134) a la solució temperada. Aquesta molècula és capaç d'intercalar-se entre el DNA i RNA, i emetre fluorescència ataronjada es ser exposada a llum UV de longitud d'ona curta (310 nm).

**Tampó d'electroforesi (TAE1X):**

Tris-acetat pH 8,3	40 mM
EDTA	1 mM
Bromur d'etidi	0.5 µg/mL

**Tampó de càrrega de les mostres 5×:**

Ficoll 400	30 %
EDTA	40 mM
SDS	0.1 %
Blau de bromofenol	0.2 %

**1.5.2. Purificació de fragments de DNA en gels d'agarosa.**

S'emprà el *kit* comercial *Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega ref. A9282) i es van purificar els fragments seguint les indicacions de la casa comercial. Aquest mètode es basa en la dissolució del fragment del gel d'agarosa que conté el DNA a purificar, en un agent caotrópic (perclorat sòdic). Així, es produeix l'adsorció selectiva del DNA (però no de l'RNA, proteïnes o altres molècules en solució) a una matriu de sílice. El DNA adsorbit és rentat per eliminar impureses i eluït en condicions de baixa força iònica (aigua MilliQ autoclavada o TE pH 8.0) (Vogelstein *et al.*, 1979).

**2. MODIFICACIÓ ENZIMÀTICA DEL DNA.****2.1. Digestió de DNA.**

Les endonucleases de restricció són enzims purificats a partir de bacteris o fongs que reconeixen seqüències curtes de DNA específiques i que actuen sobre aquestes trencant l'enllaç fosfodièster i en conseqüència la cadena de DNA. Els enzims utilitzats al llarg d'aquest treball van ser desoxiribonucleases de tipus II.

Les reaccions es protocolaren, per norma general, digerint el DNA a una concentració final de 5-200 ng/µL, amb una relació de 1-3 unitats d'enzim per µg de DNA i sempre evitant superar el 5% de glicerol a la solució. Els requeriments de força iònica i temperatura són específics de cada enzim de manera que es segueixen les indicacions de la casa comercial (Fermentas, New England Biolabs). El temps de digestió fou de 2-3 hores i els productes van ser analitzats en gels d'agarosa/TAE/Bromur d'etidi.

## 2.2. Desfosforilació del DNA.

S'emprà la fosfatasa alcalina d'intestí de vedella (CIAP) (Roche, ref. 713023) que catalitza la hidròlisi de residus fosfat de l'extrem 5' de les cadenes de DNA i RNA, de ribonucleòtids i de desoxiribonucleòtids trifosfat. Es tracta d'un metal·loenzim que requereix de  $Zn^{2+}$  per actuar. El seu ampli ús ve donat per la seva elevada activitat específica i per ser fàcilment inactivable per escalfament (70°C 10 minuts) o extracció amb fenol:cloroform.

La CIAP s'utilitzà per desfosforilar els extrems cohesius o roms dels vectors plasmídics, per tal de reduir el número de colònies no recombinants en clonatges no dirigits. La reacció de desfosforilació es va dur a terme en una solució de 100-200 ng/ $\mu$ L de DNA lineal, 0.1 U.I. d'enzim per  $\mu$ g de DNA i el tampó proporcionat per la casa comercial, durant 1 hora a 37°C. La fosfatasa fou inactivada a 75°C durant 10 minuts i, finalment, es realitzà una extracció fenol:cloroform.

## 2.3. Generació d'extrems roms per ompliment (*fill-in*).

La tècnica d'ompliment (*fill-in*) permet completar els extrems 5' protuberants de seqüències de DNA mitjançant l'activitat 5'  $\rightarrow$  3' polimerasa de l'enzim *klenow* (Promega, ref. M220A) en presència de desoxiribonucleòtids trifosfat. Aquesta tècnica es va emprar per generar extrems roms fent possible la lligació de fragments obtinguts per digestió amb enzims de restricció que generaven extrems no compatibles. La reacció es dugué a terme en un volum final de 20  $\mu$ L amb 1 U.I. de *klenow*, en presència de 25  $\mu$ M de cada dNTP, 100-400 ng de DNA i en el tampó subministrat per la casa comercial durant 30 minuts a 30°C. L'enzim s'inactivà incubant-lo a 75°C durant 25 minuts.

## 2.4. Lligació de DNA.

Per a la construcció de molècules híbrides es va emprar la DNA ligasa del bacteriòfag T4 (Promega, ref. M1801), que catalitza la formació d'enllaços fosfodièster entre el grup fosfat 5' terminal d'un fragment de DNAs i l'hidroxil 3' terminal d'un altre. Actua sobre extrems cohesius i, encara que amb menor eficiència, sobre extrems roms (l'addició de polietilenglicol al 3% al tampó de reacció pot ajudar a millorar l'eficiència). La reacció es dugué a terme en un volum final de 20  $\mu$ L, amb 1  $\mu$ L de T4 DNA ligasa (3 U.I./ $\mu$ L), 50 ng de vector linealitzat en presència de 3 o 4 vegades de molècules d'insert, i el tampó subministrat per la casa comercial. Generalment, s'incubà a temperatura ambient tota la nit.

### 2.5. Marcatge radioactiu de molècules de DNA: *Random Primed*.

El mètode de marcatge homogeni de fragments de DNA va ser escollit per al marcatge de sondes utilitzades en experiments de *Northern blot*. S'emprà el kit comercial *Rediprime*<sup>TM</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, ref. RPN16330L), que genera sondes de DNA d'elevada radioactivitat específica marcades uniformement. Es basa en la tècnica de *Random Primed* (Feinberg *et al.*, 1983) on s'utilitza la hibridació de tots els possibles hexanucleòtids sintètics amb el fragment de DNA que es vol marcar, prèviament desnaturalitzat per calor (5 minuts a 100°C). Les zones de seqüència de doble cadena resultants són elongades per l'activitat del fragment *klenow* en presència de desoxinucleòtids trifosfat, un dels quals està marcat amb un isòtop radioactiu ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (3000Ci/mmol); Amersham Biosciences, ref. AA0005).

Després del marcatge, seguint les indicacions de la casa comercial, es va purificar la sonda amb *QIAquickR Nucleotide Removal kit* (Qiagen), que permet retenir fragments de DNA superior a 19 pb i eliminar els nucleòtids no incorporats. Posteriorment es procedí al recompte radioactiu de 2  $\mu\text{L}$  de sonda en líquid de centelleig (Ecolite(+), ICN Biolink 2000 ref. 882475).

## 3. CONSTRUCCIÓ DE MOLÈCULES DE DNA RECOMBINANT.

### 3.1. Subclonatge de fragments de DNA.

Per tal de construir molècules híbrides, els DNAs van ser tractats amb els enzims de restricció adients en cada cas i el vector plasmídic va ser, normalment, desfosforilat, per evitar la seva recircularització durant la reacció de lligació. Es purificà l'insert del gel d'agarosa i tant el vector com l'insert eren quantificats abans de ser sotmesos a la reacció de lligació (relació molecular 1:4). Posteriorment, es transformaren cèl·lules DH5 $\alpha$  competents i s'identificaren els transformants així com s'explica en els següents apartats.

En el cas dels clonatges en el vector pGEM<sup>®</sup>-T, els fragments de DNA generats per PCR es purificaren per extracció de gel d'agarosa i es lligaren sense digestió prèvia, degut als extrems cohesius compatibles entre el DNA sintetitzat per la Taq DNA polimerasa, que afegeix dATP als extrems 5', i els extrems protuberants 3'T del vector.

### 3.2. Transformació de cèl·lules d'*E.coli*: mètode del CaCl<sub>2</sub>.

El mètode del clorur càlcic (Mandel *et al.*, 1970) es basa en la permeabilització de les membranes cel·lulars bacterianes amb ions calci, conferint-los la capacitat d'incorporar el DNA present en el medi (competents). Es tracta d'una tècnica que ofereix altes eficiències de transformació ( $10^6\text{-}10^7$  transformants/  $\mu\text{g}$  de DNA).

Es va fer créixer un cultiu de cèl·lules *E.coli* fins a la fase exponencial de creixement ( $OD_{600}=1.4$ ), es separaren les cèl·lules del medi de cultiu per centrifugació i es rentaren dues vegades en una solució de  $CaCl_2$  60mM. Un cop preparades, les cèl·lules es poden conservar a  $-70^{\circ}C$  durant llargs períodes de temps.

#### Solució de $CaCl_2$ :

CaCl <sub>2</sub>	60 mM
Glicerol	15 %
PIPES	10 mM pH 7.0
Solució estèril. Ajustar el pH i filtrar	

Els productes de lligació o bé els plasmidis ja circulars foren incubats amb les cèl·lules competents i sotmesos a un xoc tèrmic (10 minuts en gel → 5 minuts a  $37^{\circ}C$  → 2 minuts en gel). Posteriorment, les cèl·lules s'incubaren, en agitació a  $37^{\circ}C$  durant 1 hora, en 1 mL de medi LB líquid no selectiu, abans de créixer-les en plaques de medi LB sòlid selectiu.

En alguns casos es van utilitzar cèl·lules competents DH5 $\alpha$  comercials (Invitrogen ref. 18265-017).

### **3.3. Selecció de plasmidis recombinants.**

La selecció genètica dels bacteris recombinants es realitzà mitjançant el creixement de les cèl·lules transformades en medi sòlid de selecció, generalment LB/ampicil·lina. Quan el vector permetia la selecció per color, s'empraren plaques suplementades amb IPTG (8 mg/L), X-Gal (40 mg/L) i l'antibiòtic corresponent.

Posteriorment, s'identificaren els transformants per PCRprep i, després de preparacions a petita escala del DNA, es va comprovar el patró de digestió. Finalment, s'analitzà el DNA per seqüenciació.

## **4. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet la síntesi enzimàtica de seqüències de DNA definides a partir d'un DNA motlle que conté la seqüència que es vol amplificar. Per això, es requereixen dos oligonucleòtids com a encebadors (*primers*), que presenten seqüències complementàries a les cadenes oposades del DNA motlle i flanquegen la regió de DNA a amplificar. L'amplificació d'aquests fragment te lloc mitjançant cicles repetitius de desnaturalització del DNA motlle, hibridació dels encebadors i extensió d'aquests per acció d'una DNA polimerasa.

Donat que els productes d'un cycle complet d'amplificació serveixen com a motlles per al següent, s'aconsegueix l'acumulació exponencial de fragments específics de DNA, de manera que al final del procés s'obté un número de molècules de DNA de  $2^n$ , essent n el número de cycles practicats.

Saiki *et al.* (1988) van descriure la utilització de la DNA polimerasa termostable purificada del bacteri *Thermus aquaticus* (Taq DNA Polimerasa) en la tècnica de la PCR. Aquesta polimerasa té una temperatura òptima de treball de 72°C i és resistent a altes temperatures, fet que permet la realització dels cycles sense la necessitat d'afegir nou enzim en l'inici de cada amplificació.

#### 4.1. Amplificació de DNA.

Al llarg d'aquest treball es realitzaren amplificacions de DNA a partir de cDNA, DNA genòmic o DNA plasmídic, emprant encebadors que generessin dianes de restricció en els extrems dels fragments amplificats en els casos en que es precisava el seu posterior subclonatge, o bé es clonaren directament en pGEM<sup>®</sup>-T vector (veure apartat 3.1). També es va emprar la tècnica de la PCR en l'anàlisi de DNA obtingut en els experiments d'immunoprecipitació de cromatina (veure apartat 7.7.2.).

Pel disseny dels encebadors es tingueren en compte els següents criteris:

- a. La longitud de l'oligonucleòtid segueix la fórmula empírica: longitud = 18 més una base extra per cada 2% de baixada respecte al 50% G+C.
- b. El rang ideal de G+C és de 40-60%. Percentatges elevats de A+T no hibriden adequadament
- c. Cal evitar possibles homologies internes, o adjacents a la regió a amplificar, entre els oligonucleòtids i el DNA motlle, així com possibles hibridacions entre encebadors o intraencebadors, ja que generen estructures secundàries.
- d. Cal comprovar els últims 10 nucleòtids de l'encebador (3') que és on s'inicia la hibridació. És recomanable que aquesta zona tingui una composició equilibrada de G+C.
- e. Si es generen dianes de restricció en els encebadors cal deixar 3-5 nucleòtids de marge a 5' perquè hi ha enzims que perden eficiència si la diana es troba a l'extrem.

Les amplificacions es van realitzar amb *Biotherm<sup>TM</sup> Taq Polymerase* (Attend Bio GC-002-0500) en un termociclador *Minicycler MJ Research, Inc.* o un *PTC-100 MJ Research, Inc.*

A continuació es descriuen les condicions estàndards d'amplificació i de la mescla de reacció.

**Reacció de PCR:**

DNA motlle	10-20 ng (DNA plasmídic) 500-1500 ng (DNA genòmic) 100-200 ng (cDNA)
Tampó <i>Taq</i> 10x	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM cada dNTP
Oligo <i>forward</i>	1 µM
Oligo <i>reverse</i>	1 µM
<i>Taq</i> DNA polimerasa	2.5 U.I.
Aigua q.s.p.	50 µL
(Oli mineral 50µL)	

**Condicions d'amplificació:**

Desnaturalització inicial ( <i>hot start</i> )	94°C	5 minuts	
Desnaturalització	94°C	45 segons	(25-30 cicles)
Hibridació	55°C-68°C	45 segons	
Extensió	72°C	1 minut/Kb	
Extensió final	72°C	10 minuts	

La temperatura d'hibridació es va decidir en funció de les T<sub>m</sub> dels encebadors (temperatura de fusió (*melting*)) i va oscil·lar, com s'observa, entre els 55°C i els 68°C.

En els casos on era necessari reduir al màxim la possibilitat d'introduir errors en els productes de PCR les amplificacions es van realitzar amb *Pfx* DNA polimerasa (Invitrogen ref. 11708013).

**4.2. PCR-prep.**

Es tracta d'un mètode de selecció de colònies transformants. Permet seleccionar les colònies que provenen de bacteris que han incorporat el plasmidi d'interès, amplificant per PCR un fragment del mateix plasmidi, sense la necessitat d'aïllar prèviament el DNA (McPherson *et al.*, 1991).



La mescla de reacció es preparà segons el protocol descrit a l'apartat anterior en un volum final de 20 µL. En aquest cas, el DNA motlle s'aporta en picar una colònia aïllada crescuda a la placa de LB/antibiòtic resultat de la transformació. Durant el cicle de desnaturalització inicial (94°C 5 minuts) es trenquen les parets bacterianes, fent accessible el material genètic que, a l'hora, és desnaturalitzat.

### **4.3. Mutagènesi dirigida de DNA mitjançant la tècnica de la PCR.**

#### **4.3.1. Introducció de dianes de restricció.**

Per introduir dianes de restricció a fragments de DNA ja clonats es van dissenyar oligonucleòtids que continguessin la diana de restricció desitjada en el seu extrem 5'. Aquests oligonucleòtids contenien, com a mínim, 10 nucleòtids complementaris a la regió de DNA a amplificar i 4 nucleòtids a 5' de la diana a introduir. Els PCR es van realitzar, segons les condicions adients per cada amplificació, generant molècules que contenien a 5' i/o a 3' les dianes desitjades.

#### **4.3.2. Introducció de mutacions puntuals.**

##### **4.3.2.1. *Overlap extension* PCR.**

La tècnica de *Overlap extension* PCR va ser descrita per Ho *et al.* (1998). Consisteix en realitzar dues reaccions de PCR independents sobre el mateix DNA motlle, utilitzant, en cada cas, un encebador iniciador intern que conté la mutació a introduir i un encebador extern no mutat que inclou una diana de restricció de la seqüència salvatge. Els fragments amplificats es solapen en la zona mutada central i són utilitzats com a cadena motlle per un nou PCR amb els encebadors externs utilitzats en els primers PCRs. Aquesta nova reacció genera el producte, que inclou la mutació puntual desitjada flanquejada per dues dianes de restricció presents també a la seqüència salvatge inicial i que permet la substitució, per digestió, del fragment salvatge pel fragment mutat.

##### **4.3.2.2. *QuikChange*® XL *Site-Directed Mutagenesis Kit*.**

El mètode utilitzat per *QuikChange*® XL *Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene ref. 200518) presenta importants avantatges respecte a les tècniques de mutagènesi dirigida per PCR convencional. En aquest cas, el DNA sintetitzat en cada cicle de la reacció no pot ser utilitzat com a motlle en cicles posteriors, reduint la probabilitat d'introduir mutacions no desitjades. Aquest mètode, basat en els treballs de Fisher i Pei (1997), permet la síntesi del DNA mutat a partir de DNA motlle de doble cadena circular, utilitzant dos encebadors complementaris entre sí i que contenen la seqüència mutada.

La síntesi de DNA és duta a terme per una DNA polimerasa d'alta fidelitat, *PfuTurbo*® *polymerase*, que estén els oligonucleòtids cap a ambdues cadenes del DNA motlle fins a copiar tot el plasmidi. El mètode de selecció del DNA mutat respecte al parental es basa en el fet que, a diferència del DNA sintetitzat *in vitro*, el DNA sintetitzat per *E.coli* es troba metilat. La digestió amb l'enzim DpnI, que únicament reconeix el DNA metilat, elimina el DNA motlle de la reacció i el producte resultant, el DNA mutat, és directament transformat en cèl·lules XL-1 blue competents, segons el protocol subministrat per la casa comercial.

## 5. SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA DE DNA.

La seqüenciació de DNA es realitzà utilitzant el *kit BigDye*® *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, ref. 4337456) seguint les indicacions del fabricant. Les mostres precipitades van ser processades pels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

### **Reacció de seqüenciació:**

DNA motlle	300-500 ng
Mix	1.5 µL
Tampó	1 µL
Oligonucleòtid 10µM	0.5 µL
Aigua q.s.p.	10 µL

Alternativament, 10 µL de DNA a seqüenciar (100 ng/µL) i 10 µL d'encebador (10 µM) foren enviats a *MacroGen Inc.* per al seu anàlisi.

## 6. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE L'RNA.

L'RNA és una molècula molt sensible a la degradació per RNases, de manera que és imprescindible la utilització de guants i de material estèril en tot moment. En general, es realitzà un doble procés d'esterilització per autoclau del material sòlid.

### **6.1. Preparació d'RNA total.**

Per a l'obtenció d'RNA es va emprar el reactiu comercial Trizol (Life Technologies, ref. 15596-026) basat en el mètode descrit per Chomczynski *et al.*, 1987. És una solució monofàsica de fenol i isotiocianat de guanidina que manté la integritat de l'RNA a l'hora que lisa les cèl·lules i dissol els seus components.

Per a l'obtenció d'RNA a partir de teixit, es va escindir un fragment del mateix (inferior al 10 % del volum de Trizol) en un morter amb N<sub>2</sub> líquid. Es va permetre la descongelació dintre d'1 mL de reactiu de Trizol i s'homogeneïtzà amb *polytron* R PT-MR 2100 (Kinematica AG), generalment 2 x 20 *strokes*. Per a l'obtenció d'RNA a partir de cultiu cel·lular, s'emprà 1 mL de reactiu de Trizol per placa de 100 mm, produint-se així, el seu lisat. En ambdós casos, l'homogeneïtzació cel·lular fou seguida d'una separació de fases al afegir cloroform (eliminant així les proteïnes desnaturalitzades) i una posterior precipitació i resuspensió de l'RNA.

## 6.2. Quantificació d'RNA total.

La concentració d'RNA es determina per espectrofotometria mesurant l'absorbància de la mostra a 260 nm i 280 nm i tenint en compte que 1 unitat de densitat òptica a 260 nm (OD<sub>260</sub>) equival a 40 µg/mL d'RNA. La relació entre les dues absorbàncies indica la puresa de la mostra i es consideren acceptables valors >1.8.

La lectura espectrofotomètrica va ser realitzada en cubetes de quars i es va utilitzar un espectrofotòmetre Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) o bé es va dur a terme en un NanoDrop-1000 (*NanoDrop Technologies, Inc*).

## 6.3. Northern blot (hibridació DNA-RNA).

La tècnica de *Northern blot* permet l'anàlisi de l'expressió d'un gen en termes d'RNA. Per això, l'RNA obtingut de les cèl·lules o teixits, és separat electroforèticament i immobilitzat en una membrana de niló o nitrocel·lulosa per a la posterior hibridació amb una sonda específica marcada radioactivament, segons el protocol descrit per Sambrook *et al.* (1989).

### 6.3.1. Separació electroforètica d'RNA en gel desnaturalitzant d'agarosa/formaldehid.

Aquest tipus de gels s'empren per al fraccionament d'RNA en experiments de *Northern blot*, ja que contenen formaldehid a una concentració de 2.2 M, que actua desnaturalitzant les estructures secundàries de l'RNA. Aquest fet permet que la migració de l'RNA sigui proporcional al logaritme del seu pes molecular i, per tant, possibilita el càlcul del mateix per interpolació sobre una recta patró realitzada en base als marcadors de pes molecular fraccionats al mateix gel.

**Gel d'electroforesi per a Northern blot, 1%:**

Agarosa	1 g
Tampó electroforesi	20 mL
Formaldehid 37 %	6 mL
H <sub>2</sub> O lliure d'RNasa	q.s.p. 100 mL

El gel es preparà dissolent l'agarosa en H<sub>2</sub>O i un cop refredada la mescla a 55-60°C s'afegiren la resta de reactius.

**Tampó d'electroforesi per a Northern blot:**

MOPS-Na pH 7.0	0.1 M
Acetat sòdic	40 mM
EDTA pH 8.0	5 mM
Filtrar i protegir de la llum	

**Tampó de càrrega per a RNA 2x:**

Tampó d'electroforesi per a NB 1x	
Formaldehid	2.2 M
Formamida desionitzada	50%
Glicerol	5%
Blau de bromofenol	5 %
Bromur de Etidi	10 µg/mL

Les mostres (10-20 µg d'RNA) es prepararen escalfant-les a 65°C durant 10 minuts i es carregaren en el gel, que es corregué a 60 volts durant 5-6 hores.

**6.3.2. Transferència a suport sòlid i immobilització.**

Un cop finalitzada l'electroforesi de l'RNA, es disposà el gel en un recipient lliure de RNases i es realitzaren 4-5 rentats amb H<sub>2</sub>O desionitzada per tal d'eliminar l'excés de formaldehid. A continuació es submergí durant 20-30 minuts en solució SSC 10x.

Finalment foren transferits per capil·laritat a una membrana de niló *NytranN 0.45 µm Neutral Nylon Transfer Membrane for DNA/RNA/proteins* (Schleicher & Schuell, ref. 10416194) en tampó SSC 20x durant 16 hores.

**Tampó de transferència SSC 20x:**

Citrat sòdic pH 7.0	0.3 M
NaCl	3 M

La fixació de l'RNA es va realitzar mitjançant radiació UV, utilitzant *Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker* (Spectronics Corporation). La membrana així fixada es pot conservar a 4°C fins a la seva hibridació.

### 6.3.3. Marcatge i purificació de la sonda.

Per al marcatge de les sondes s'emprà el *kit* comercial *Rediprime™* (Amersham Pharmacia Biotech, ref. RPN16330L) (veure apartat 2.5.).

Posteriorment la sonda fou purificada amb el *kit* *QiAquickR Nucleotide Removal Kit* (Qiagen ref. 28304), que permet retenir fragments de DNA superiors a 19 pb i eliminar els nucleòtids no incorporats.

En l'apèndix es detalla una relació de les sondes emprades en els diferents experiments de *Northern blot*.

### 6.3.4. Hibridació.

De manera general, es prehibridaren les membranes durant 30 minuts a 68°C emprant la solució comercial *ExpressHyb Hybridization solution* (Clontech, ref. 8015-1) per a després hibridar-les amb les sondes marcades homogèniament ( $2 \times 10^6$  cpm/mL de la mateixa solució) durant mínim 1 hora a 68°C. Posteriorment, es realitzaren diferents rentats, amb la finalitat d'eliminar de la membrana la radioactivitat no específica, depenent del tipus de sonda a hibridar.

#### **Rentats per a sondes homòlogues:**

1x SSC 0.1x/SDS 0.1% RT 20 minuts

2x SSC 0.1x/SDS 0.1% 65°C 20 minuts

#### **Rentats per a sondes heteròlogues:**

1x SSC 0.25x/SDS 0.1% RT 20 minuts

2x SSC 0.25x/SDS 0.1% 55°C 10 minuts

#### **Rentats per a hibridació amb sonda ratAACS:**

1x SSC 2x/SDS 0.1% RT 15 minuts

+

1x SSC 2x/SDS 0.1% 55°C 10 minuts (per fetge)

ò

2x SSC 2x/SDS 0.1% 55°C 10 minuts (per teixit adi pós)

Les membranes foren exposades a plaques d'europi per al posterior escaneig emprant el *software STORM 840 Gel and Blot Imaging System* (Amersham Biosciences) i es quantificaren amb el programa *Image Quant TL* (Amersham Biosciences). Posteriorment, s'exposaren a pel·lícules autorradiogràfiques i amb pantalla intensificadora (*Intensifying screen* Sigma ref. Z37, 431-8) a -70°C durant 3-5 dies.

#### 6.4. RT-PCR.

La tècnica de RT-PCR consta d'una reacció de síntesi de la primera cadena de cDNA a partir d'mRNA, seguida d'una amplificació específica del transcrit que es vol analitzar per PCR.

La primera cadena va ser sintetitzada per una DNA polimerasa dependent d'RNA (transcriptasa inversa M-MLV, Invitrogen ref. 28025-013) que requereix un oligonucleòtid encebador. Es van emprar oligonucleòtids degenerats (Primer random p(dN)<sub>6</sub>, Roche Diagnostics ref. 11 034 731 001) per tal d'obtenir un cDNA representatiu de tot l'mRNA present a les cèl·lules.

##### Reacció d'RT:

RNA total	1 µg	
Random primers	0.25 µg	
dNTP 10 mM <i>each</i>	1 µL	
Aigua q.s.p.	13 µL	
<b>Desnaturalització</b>	<b>65°C</b>	<b>5 minuts</b>
Afegir:		
<i>5x first-strand buffer</i>	4 µL	
DTT 0.1 M	2 µL	
<b>Incubació:</b>	<b>37°C</b>	<b>2 minuts</b>
<u>Afegir:</u>		
M-MLV RT	200 U.I. = 1 µL	
Incubació:	37°C	1 hora
	70°C	15 minuts

Els cDNAs obtinguts van ser emprats com a DNA motlle de la síntesi de la segona cadena i de les successives còpies de la molècula mitjançant una reacció estàndard de PCR (veure apartat 4.1.). Així mateix, els cDNAs s'empraren per a estudiar l'expressió del gen AACS en termes d'RNA mitjançant la tècnica de la PCR en temps real (veure apartat 6.5).

### 6.5. PCR en temps real.

La PCR a temps real permet la quantificació de l'expressió d'un gen en termes d'mRNA de manera més sensible i ràpida que la tècnica del *Northern blot*. L'RNA retrotranscrit a cDNA és amplificat per PCR. Durant l'amplificació es fa un seguiment de la reacció a temps real ja que en la mescla de la reacció s'incorporen reactius que emeten fluorescència al unir-se específicament a la seqüència amplificada (*Taqman*®) o bé quan s'intercalen en el DNA de doble cadena (*SYBR-Green*).

En el present treball s'ha emprat el sistema *TaqMan*® *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). La característica principal és l'ús de tres oligonucleòtids en la reacció de la PCR. Dos dels oligonucleòtids (*forward* i *reverse*) permeten l'amplificació del producte al que s'hibridarà el tercer oligonucleòtid, la sonda fluorogènica *Taqman*®. Aquesta sonda conté un marcador reporter fluorescent a l'extrem 5' i un *quencher* al 3'. Mentre la sonda està intacta la proximitat del *quencher* redueix la fluorescència emesa pel reporter. Si s'amplifica el gen diana, la sonda s'hibrida a la seqüència complementària i, mitjançant l'activitat 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa, és degradada. Aquesta ruptura de la sonda separa el reporter del *quencher*, fet que provoca l'emissió de fluorescència a temps real, que és directament proporcional a la concentració de la seqüència diana.

Les reaccions es dugueren a terme en ABI PRISM ® 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) en plaques de 96 pouets.

#### **Reacció PCR:**

<i>Platinum</i> ® <i>quantitative PCR SuperMix-UDG</i> with <i>ROX</i> (Invitrogen ref. 11743-100)	12.5 µL
<i>TaqMan</i> ® <i>Gene Expression Assays</i>	1.25 µL
cDNA	150-250 ng
H <sub>2</sub> O <i>q.s.p.</i>	25 µL

#### **Condicions d'amplificació:**

50°C	2 minuts	(40 cicles)
95°C	10 minuts	
95°C	15 segons	
60°C	1 minut	

La tècnica de la PCR en temps real ha sigut utilitzada per a l'estudi de l'expressió dels gens AACS (ref. Rn 00576635-m1) i SREBP-1c (ref. Rn 01495759-m1) en fetge (225 ng) i teixit adipós blanc (180 ng) de rata. En ambdós casos s'ha emprat la detecció del gen 36B4 (ref. Rn 00821065-g1) com a normalitzador.

## 7. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES.

### 7.1. Obtenció d'extracte cru de proteïnes a partir de cèl·lules en cultiu.

Es recolliren les cèl·lules en PBS 1X i es centrifugà a 3000 rpm 10 minuts. Posteriorment es va resuspendre el *pellet* cel·lular en PBS suplementat amb inhibidors de proteases (0.1 mM PMSF (Sigma ref. P7626), 2 µg/mL leupeptina, 200 U/mL aprotinina) i es sotmeté a 3 cicles de congelació-descongelació (N<sub>2</sub> líquid → 37°C). Després d'aquest tractament, les cèl·lules rompudes eren centrifugades a 15000 rpm 5 minuts i 4°C, separant-se així l'extracte de proteïnes (sobrenedant).

Alternativament es dugué a terme la lisi del *pellet* de cèl·lules en presència de NP40 *buffer* o RIPA *buffer* (1 mL per 10<sup>7</sup> cèl·lules/ placa de 100 mm) suplementat igualment amb inhibidors de proteases, mitjançant la seva incubació a 4°C en una plataforma oscil·lant durant 15 minuts. Els lisats cel·lulars es centrifugaren a 15000 rpm i a 4°C durant 15 minuts i es recuperà el sobrenedant.

Els extractes proteics es congelaren a -80°C fins a l seu anàlisi posterior.

#### **NP 40 buffer:**

Tris-HCl pH 8	50mM
NP-40	1%
NaCl	150mM

Es suplementa extemporàniament amb inhibidors de proteasa: 2 µg/mL leupeptina, 200 U/mL aprotinina i PMSF 0.1 M (Sigma ref. P7626).

#### **RIPA buffer:**

Tris-HCl pH 7.4	50mM
NP-40	1%
Na-deoxicolat	0.25%
NaCl	150mM
EDTA	1 mM

Es suplementa extemporàniament amb inhibidors de proteasa: 2 µg/mL leupeptina, 200 U/mL aprotinina i PMSF 0.1 M (Sigma ref. P7626).



### 7.2. Quantificació de proteïnes: mètode de Bradford.

El mètode de quantificació de proteïnes introduït per Bradford (1976) es basa en el canvi que es produeix en l'espectre d'absorció del colorant *Coomassie*, com a conseqüència de la seva adsorció sobre molècules proteiques. La unió a proteïnes estabilitza la forma blava del colorant *Coomassie* de manera que la quantitat del complex format és una mesura de la concentració de proteïna quan es llegeix l'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm. Aquest mètode mostra una gran sensibilitat i amplis marges de linealitat.

Pel seu ús es van seguir les indicacions del fabricant (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad, ref. 500-0006) i s'utilitzà com a proteïna patró l'albumina sèrica bovina (Sigma ref. A7906).

### 7.3. Separació electroforètica de proteïnes en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

L'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970) és una tècnica de separació de proteïnes segons el seu pes molecular. Aquesta separació es realitza en una matriu de poliacrilamida, en condicions que assegurin la dissociació de les proteïnes en subunitats polipeptídiques individuals. La desnaturalització de les proteïnes es du a terme en presència de  $\beta$ -mercaptoetanol, agent reductor de ponts disulfur, i de SDS, que s'uneix a aquests polipèptids desnaturalitzats carregant-los negativament. En aquest cas, la càrrega negativa de cada polipèptid es proporcional a la quantitat de SDS unit, que a l'hora es directament proporcional al pes molecular del polipèptid. L'aplicació d'un camp elèctric en aquestes condicions fa que la migració cap a l'ànode d'aquests polipèptids es faci d'acord amb la seva mida.

Els gels d'acrilamida consten de dues fases, la fase apiladora i la fase separadora. La concentració d'acrilamida d'aquesta darrera fase es va decidir en funció dels pesos moleculars de les proteïnes a resoldre en el gel, oscil·lant entre el 5% per proteïnes d'alt pes molecular i el 15% per proteïnes molt petites.

#### Gel apilador:

Acrilamida	5%
Tris-HCl pH 6.8	0.12 M
SDS	0.1 %

#### Gel separador:

Acrilamida	5-15 %
Tris-HCl pH 8.8	0.37 M
SDS	0.1 %

Per a la polimerització de l'acrilamida i bisacrilamida s'utilitzà un agent generador de radicals lliures, persulfat amònic al 10%, i un catalitzador de la reacció, TEMED, que es van incloure en una proporció de 125  $\mu$ L i 7.5  $\mu$ L per cada 10 mL de gel respectivament.

Les mostres de proteïnes es mesclen amb tampó de càrrega i es desnaturalitzen bullint-les durant 5 minuts. Finalment són sotmeses a electroforesi (15 mA gel apilador i 30 mA gel separador).

**Tampó de càrrega per proteïnes 2X (Laemmli Buffer):**

Tris-HCl pH 6.8	50 mM
SDS	2%
Glicerol	10%
Blau de bromofenol	0.012%
$\beta$ -mercaptoetanol	5%

**Tampó d'electroforesi:**

Tris-HCl pH 8.8	25 mM
Glicina	0.19 M
SDS	0.1%

Com a patrons de pes molecular de proteïnes s'emprà el marcador *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas ref. SM0441).

**7.4. Anàlisi de proteïnes per tinció de *Coomassie Brilliant Blue*.**

Després de l'electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS, les proteïnes poden ser visualitzades per tinció amb blau de *Coomassie* (*Coomassie*® *Brilliant Blue* R-250, Bio-Rad ref. 161-0400). El procés inclou la tinció del gel durant 30 minuts a temperatura ambient en solució de tinció i la posterior submersió en solució de destinció.

**Solució de tinció:**

Blau de <i>Coomassie</i>	0.025%
Metanol	40%
Àcid acètic glacial	7%

**Solució de destinció:**

Metanol	40%
Àcid acètic glacial	7%

### 7.5. Anàlisi de proteïnes per immunotransferència: *Western blot*.

En la tècnica de *Western blot*, les mostres proteiques són fraccionades en un gel de poliacrilamida-SDS i transferides a un suport sòlid per ser incubades amb anticossos específics que permeten la identificació de proteïnes específiques.

Després de l'electroforesi, el gel de poliacrilamida-SDS va ser col·locat en contacte amb una membrana de PVDF (*Immobilon-P*, 0,45µm, Millipore ref. IPVH00010), entre peces de paper Whatman® 3MM i dues esponges humides en tampó de transferència. El conjunt es va disposar, submergit en tampó de transferència, en un suport entre dos elèctrodes on el gel va quedar en el càtode i la membrana encarada a l'ànode. La transferència es realitzà en un *Mini Trans blot* (Bio-Rad) durant un temps mínim de 3 hores, a 4 °C i 120 mA.

#### Tampó de transferència

Tris	25 mM
Glicina	0.2 M
Metanol	20% (v/v)

Per a la immunodetecció de les proteïnes s'emprà el kit *EZ-ECL™ Western blotting detection reagent* (Reactiva ref. 20-500-120). Excepte en aquells casos on s'empraren anticossos comercials i amb protocols específics, es seguí el protocol recomanat per la casa comercial. Breument, un cop realitzada la transferència es va saturar la membrana amb PBS-T (PBS1x amb 1% de Tween20) amb un 5% de llet en pols desnatada durant tota la nit i a 4°C. Seguidament, aquesta membrana fou incubada durant 1 hora amb l'anticòs primari i una altra hora amb el secundari, realitzant-se 3 rentats amb PBS-T entre les dues incubacions i abans de la detecció.

A continuació es mostra una relació dels anticossos utilitzats en aquest treball així com la seva dilució i el *blotto* emprat (PBS-T = 1 % tween; TBS-T = 0.1 % tween)

<u>Bloqueig</u>	<u>Ab primari</u>	<u>dilució</u>	<u>Blotto</u>	<u>Ab secundari</u>	<u>dilució</u>	<u>Blotto</u>
PBS-T 5% llet (o/n)	AACS (1h)	1:1000	PBS-T 5% llet	Conill (1h)	1:5000	PBS-T 5% llet
PBS-T 5% llet (o/n)	GST (1h)	1:2000	PBS-T 5% llet	Ratolí (1h)	1:2000	PBS-T 5% llet
PBS-T 5% llet (o/n)	Myc (1h)	1:200	PBS-T 5% llet	Ratolí (1h)	1:2000	PBS-T 5% llet
PBS-T 5% llet (o/n)	HA (1h)	1:200	PBS-T 5% llet	Ratolí (1h)	1:2000	PBS-T 5% llet
PBS-T 5% llet (o/n)	Flag (1h)	1:5000	PBS-T 5% llet	Ratolí (1h)	1:2000	PBS-T 5% llet
TBS-T 5% llet (1 h)	AcLys (o/n)	1:1000	TBS-T 5% BSA	Conill (1h)	1:2500	TBS-T 5% llet

Durant el procés d'immunodetecció, l'anticòs primari reconeix els punts antigènics presents a la membrana i el secundari és un anticòs que reconeix la cadena pesada del primari. Aquest segon anticòs va conjugat a una peroxidasa de rave (Amersham Biosciences, ref. NA934V i ref. NA931V) que oxida el luminol, passant-lo d'un estat relaxat a un estat excitat, i en recuperar-se emet un tipus de llum que pot ser detectada per autoradiografia.

## **7.6. Immunoprecipitació de proteïnes.**

### **7.6.1. Immunoprecipitació de proteïnes a partir d'extractes totals.**

La immunoprecipitació de proteïnes permet la purificació d'una proteïna específica present en un extracte cel·lular mitjançant la utilització d'un anticòs específic generat contra aquesta o bé emprant un anticòs contra una etiqueta a la que està fusionada la proteïna d'interès. El complex anticòs-antigen és recuperat, posteriorment, mitjançant l'addició a l'extracte cel·lular d'una suspensió de proteïna A o G conjugada a agarosa, gràcies a l'afinitat que presenten aquestes proteïnes a la regió constant de les immunoglobulines de gran nombre d'espècies.

En aquest treball es dugueren a terme immunoprecipitacions en extractes totals de proteïna en cèl·lules HeLa transfectades amb la construcció mycAACS amb anticossos contra l'epítip myc i HA (emprat com a control negatiu) seguit de *Western blot* amb anticossos contra acetil-lisina amb l'objectiu d'estudiar l'acetilació de la proteïna AACS. Així mateix, s'emprà l'anticòs contra acetil-lisina conjugat a proteïna G agarosa per tal d'immunoprecipitar l'AACS acetilada i realitzar *Western blot* contra l'etiqueta myc. En ambdós casos, el tampó d'immunoprecipitació era suplementat, a més de amb PMSF i inhibidors de proteases, amb NAM (10 mM) i TSA (5  $\mu$ M) per tal d'inhibir les possibles proteïnes desacetilases presents durant la immunoprecipitació. Aquestes mateixes aproximacions es dugueren a terme per a l'anàlisi de les diferents construccions mycAACS delecionades o amb Lys mutades.

També es cotranfectaren cèl·lules HeLa amb els plasmidis mycAACS i *flagHMGCS1* i es realitzaren experiments de coimmunoprecipitació amb l'anticòs contra myc i posterior anàlisi per *Western blot* amb l'anticòs contra *flag* amb l'objectiu d'estudiar si ambdues proteïnes formaven part d'un mateix complex proteic.

En tots els casos es realitzà *Western blot* amb l'anticòs contra myc o bé contra AACS de l'immunoprecipitat per tal de comprovar que la immunoprecipitació era realitzada amb èxit.

Generalment, s'immunoprecipitaren 500 µg d'extracte proteic obtingut en NP-40 *buffer* (veure apartat 7.1) que eren diluïts a una concentració d'1 µg/µL amb PBS per tal de disminuir la concentració de detergents presents en el tampó. Prèviament a la immunoprecipitació es dugué a terme un pre-reatat afegint 60 µL d'una suspensió de proteïna G-agarosa al 50 %, deixant-ho rodar a 4°C durant 1 hora. Després d'eliminar la proteïna G per centrifugació a 2000 rpm 5 minuts, s'incubà l'extracte proteic amb l'anticòs immunoprecipitant d'interès o bé amb l'anticòs control (o sèrum preimmune) i es deixà rodant tota la nit a 4°C. Els complexos eren recollits amb 60 µL de proteïna G (50% *slurry*) durant 2 hores i rentats 3 vegades amb PBS fred. El *pellet* fou resuspès en 60 µL de tampó de càrrega per a proteïnes (veure apartat 7.4) i es bullí durant 10 minuts. Es centrifugaren les mostres i es recuperaren els sobrenedants; s'empraren 30 µL per al *Western blot* control (contra AACS o bé contra myc) i 30 µL per al *Western blot* objectiu de la immunoprecipitació.

**Relació d'anticossos emprats per a immunoprecipitar:**

Myc (130 µg).

HA (130 µg).

Acetil-lisina (12.5 µg).

**7.6.2. Assajos d'immunoprecipitació de cromatina (ChIPs).**

La tècnica d'immunoprecipitació de cromatina constitueix una eina potent en l'estudi de la interacció de proteïnes amb seqüències específiques de DNA en l'entorn de cromatina *in vivo*. Aquesta tècnica implica la utilització de formaldehid per a fixar, en les cèl·lules intactes, els complexos proteïna-proteïna i proteïna-DNA, seguit de la immunoprecipitació d'aquests complexos amb anticossos específics. El DNA associat a les proteïnes immunoprecipitades pot ser analitzat, després de la reversió del *crosslink* i la purificació d'aquest, per tècniques de *Southern blot* o PCR.

**7.6.2.1. Obtenció de cromatina.**

Es procedí a la fixació o *crosslink* de les proteïnes entre elles i al DNA d'1x10<sup>6</sup> cèl·lules en cultiu en una placa de 100 mm de diàmetre, afegint un 1% de formaldehid al medi de cultiu i incubant a 37°C durant 10 minuts. Després d'enretirar el medi i rentar les cèl·lules amb PBS, es continuà realitzant tots els processos a 4°C i les incubacions en gel.

Per a l'obtenció de cromatina per a la posterior immunoprecipitació amb l'anticòs contra Sp1, es van recollir les cèl·lules en PBS, es van centrifugar a 700g durant 4 minuts i van ser resuspeses en 1,5 mL de solució d'obtenció de nuclis. Després d'incubar 10 minuts, s'homogeneitzà emprant un homogeneitzador manual de vidre (10 cicles amb pistil *tight*). Es van obtenir els nuclis per centrifugació a 250g durant 10 minuts i foren resuspesos en 300 µL

de tampó de lisi. Les mostres s'incubaren 10 minuts en gel abans de dur a terme el procés de sonicació de la cromatina.

Per a l'obtenció de cromatina per a la posterior immunoprecipitació amb l'anticòs contra PPAR $\gamma$ , es va seguir el protocol descrit per Hartmant *et al.* (2002). Es van recollir les cèl·lules en PBS, es van centrifugar a 700g durant 4 minuts i van ser resuspeses 200  $\mu$ L de tampó de lisi. Les mostres s'incubaren 20 minuts abans de dur a terme el procés de sonicació de la cromatina.

En el cas d'Sp1, es realitzaren 4 cicles de sonicació de 10 segons al 50 % de potència per tal de fragmentar el DNA fixat a les proteïnes, generant-se fragments de entre 200 i 800 pb. En el *ChIP* de PPAR $\gamma$  es realitzaren 5 cicles de sonicació de 10 segons al 90 % de potència. Els extractes foren centrifugats a 13000 rpm durant 10 minuts i els sobrenedants diluïts 10 vegades en tampó de dilució de cromatina.

Les preparacions de cromatina es poden conservar a -80°C fins al seu anàlisi.

**Solució d'obtenció de nuclis per Sp1:**

Pipes-KOH pH 8	5 mM
KCl	85 mM
NP-40	0,5% (v/v)

**Tampó de lisi per Sp1:**

Tris-HCl pH 8	50 mM
SDS	1% (p/v)
EDTA	10 mM

**Tampó de lisi per PPAR $\gamma$ :**

Tris-HCl pH 8	50 mM
SDS	1% (p/v)
EDTA	5 mM

**Tampó de dilució de cromatina per Sp1:**

Tris-HCl pH 8	16.7 mM
Triton X-100	1% (v/v)
EDTA	1.2 mM
NaCl	167 mM

**Tampó de dilució de cromatina per PPAR $\gamma$ :**

Tris-HCl pH 8	20 mM
Triton X-100	1% (v/v)
EDTA	2 mM
NaCl	150 mM

Tots els tampons van ser suplementats amb inhibidors de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail* Sigma ref. P8340) de forma extemporània.

**7.6.2.2. Immunoprecipitació de proteïnes a partir de cromatina.**

Es va sotmetre la cromatina a un pre-rentat amb 80  $\mu$ L proteïna G Agarosa/DNA esperma de salmó (Upstate Biotechnology ref. 16-201) durant 1 hora a 4°C. En aquest punt, es va prendre una alíquota d'un 1% de la cromatina (10  $\mu$ L), que encara no ha estat sotmesa a immunoprecipitació, com a control o *Input*. La immunoprecipitació d'1 mL de cromatina es va realitzar durant tota la nit amb 20  $\mu$ g d'anticòs contra Sp1 o 10  $\mu$ g d'anticòs contra PPAR $\gamma$  i la quantitat equivalent, en cada cas, de sèrum preimmune. A continuació s'afegiren 60  $\mu$ L de proteïna G Agarosa/DNA esperma de salmó i es continuà la incubació durant 4 hores més en el cas d'Sp1 i 1 hora en el cas de PPAR $\gamma$ . Les boles d'agarosa foren recuperades per centrifugació i sotmeses a rentats consecutius de 5 minuts en plataforma oscil·lant. Per a Sp1 s'emprà un únic tampó amb el que es dugueren a terme 4 rentats. Per a PPAR $\gamma$  es realitzaren rentats consecutius en un tampó de baix contingut en sals, un tampó d'elevat contingut en sals i un tampó amb LiCl per a finalment dur a terme dos rentats més amb TE.

**Tampó de rentat per Sp1:**

Tris-HCl pH 8	20 mM
Triton X-100	0,1% (v/v)
EDTA	2 mM
NaCl	150 mM

**Tampó de baix contingut en sals (PPAR $\gamma$ ):**

Tris-HCl pH 8.1	20 mM
Triton X-100	1% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)
EDTA	2 mM
NaCl	150 mM

**Tampó d'elavat contingut en sals (PPAR $\gamma$ ):**

Tris-HCl pH 8.1	20 mM
Triton X-100	1% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)
EDTA	2 mM
NaCl	500 mM

**Tampó amb LiCl (PPAR $\gamma$ ):**

Tris-HCl pH 8.1	10 mM
NP-40	1% (v/v)
Deoxicolat	1% (p/v)
EDTA	1 mM
LiCl	250 mM

Tots els tampons van ser suplementats amb inhibidors de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma ref. P8340 ) de forma extemporània.

**7.6.2.3. Purificació del DNA i anàlisi per PCR.**

El *pellet* obtingut fou incubat 2 cops amb 250  $\mu$ L de tampó d'elució durant 15 minuts a temperatura ambient per tal de recuperar els complexos DNA-proteïna. Es van ajuntar els dos eluïts i es va revertir el *crosslink* entre proteïnes i DNA, de l'immunoprecipitat i de l'*input* per separat, incubant a 65°C durant 4-16 hores en presència de NaCl 0.3 M.

**Tampó d'elució:**

SDS	1%
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 M
Preparar al moment. No posar en fred	

Les proteïnes van ser digerides amb proteïnasa K, afegint 10  $\mu$ L d'EDTA 0.5 M, 20  $\mu$ L de Tris-HCl pH 6.5 1 M i 20  $\mu$ g d'enzim durant 1 hora a 45°C. A continuació, les mostres es sotmeteren a una extracció amb fenol:cloroform, seguida d'una precipitació del DNA amb 2 volums d'etanol i 20  $\mu$ g de glicogen. El DNA va ser dissolt en 50  $\mu$ L d'aigua i analitzat per PCR.

Els oligonucleòtids emprats en l'amplificació del promotor del gen AACCS de ratolí foren: DH916*ChIP* i 917*ChIP* (posicions -263/+15 respecte a l'inici de transcripció) i les condicions d'amplificació les següents: 95°C 5 minuts, 35 cicles de 95°C 30 segons, 60°C 30 segons, 72°C 30 segons i, finalment, 10 minuts a 72°C.



Els oligonucleòtids emprats en l'amplificació de l'exó 17 del gen AACS de ratolí foren: DH969*ChIP* i 970*ChIP* i les condicions d'amplificació les següents: 95°C 5 minuts, 35 cicles de 95°C 30 segons, 55°C 30 segons, 72°C 30 segons i, finalment, 10 minuts a 72°C.

### **8. OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS.**

#### **8.1. Síntesi de l'immunogen, inoculació i sagnat dels conills.**

S'obtingueren anticossos específics contra la proteïna AACS humana mitjançant la casa comercial Sigma Genosys. Per això s'encarregà la síntesi del pèptid RLNYAENLLRHKENDC conjugat a hemocianina de lapa amb el que s'immunitzaren dos conills diferents. El protocol d'immunització dut a terme fou el següent:

Dia 0: Obtenció de sèrum preimmune, injecció de l'antigen.

Dia 14: Injecció de l'antigen.

Dia 28: Injecció de l'antigen.

Dia 35: Sagnat del conill i obtenció del sèrum 1.

Dia 42: Injecció de l'antigen.

Dia 49: Sagnat del conill i obtenció del sèrum 2.

Dia 56: Injecció de l'antigen.

Dia 63: Sagnat final i obtenció del sèrum 3.

Els sèrums obtinguts foren analitzats mitjançant la tècnica de *Western blot*.

#### **8.2. Purificació de les Immunoglobulines.**

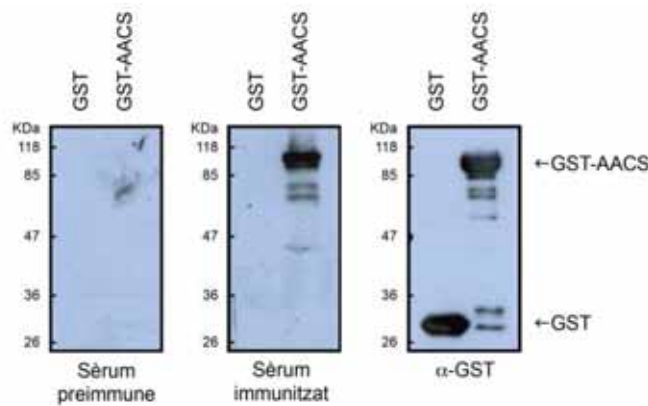
Les immunoglobulines presents en el sèrum precipiten quan aquest és mesclat amb un 45% de sulfat amònic.

S'afegí al sèrum un volum de solució de sulfat amònic saturat i es deixà en agitació a 4°C durant tota la nit. Es centrifugà a 3000g durant 30 minuts i el *pellet* obtingut es va resuspendre en 0.5 vegades el volum inicial de PBS1x. Posteriorment es dialitzà contra PBS1x durant tota la nit i es tornà a centrifugar a 3000g durant 30 minuts, recollint, aquest cop, el sobrenedant.

#### **8.3. Anàlisi dels anticossos mitjançant la tècnica de *Western blot*.**

Els sèrums obtinguts s'analitzaren mitjançant *Western blot* emprant extractes proteics de GST-AACS i de diferents línies cel·lulars disponibles en el laboratori.

La figura M-1 mostra que el sèrum del conill produeix anticossos específics contra l'AACS humana, que no es detecta en el sèrum preimmune del mateix. Amb l'anticòs contra la GST es detecta tant l'AACS recombinant (GST-AACS) com la glutatió-S-transferasa (GST).



**FIGURA M-1. Obtenció d'anticossos contra l'AACS humana I.** S'analitzaren extractes proteics de GST i de GST-AACS amb el sèrum preimmune d'un conill, amb el sèrum del conill ja immunitzat (dilució 1/10000) i amb l'anticòs contra la GST (dilució 1/2000). Es carregaren 10 µg de proteïna en cada carril.

Malgrat l'AACS s'expressa en la majoria de línies cel·lulars (resultats no mostrats), quan es du a terme la immunodetecció amb l'anticòs contra l'AACS obtingut en el laboratori no es detecten els nivells endògens de la proteïna i apareix una banda inespecífica:



**FIGURA M-2. Obtenció d'anticossos contra l'AACS humana II.** *Western blot* amb l'anticòs contra l'AACS (dilució 1:1000) d'extractes proteics de diferents línies cel·lulars disponibles en el laboratori; es carregaren 10 µg de proteïna total en cada carril i s'emprà com a control positiu la línia cel·lular induïble HeLa Tet-On AACS. S'indica amb una fletxa la banda corresponent a la proteïna AACS i amb asterisc una banda inespecífica.

## 9. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ.

L'expressió i purificació de proteïnes de fusió permet l'obtenció de grans quantitats de proteïnes eucariotes. Aquestes proteïnes, clonades en plasmidis específics, s'obtenen fusionades a proteïnes de fàcil purificació. L'expressió d'aquests cDNAs es pot dur a terme en cèl·lules bacterianes o de llevat, segons el vector de clonatge.

Durant aquest treball es va clonar el cDNA de la proteïna AACS humana i el cDNA de la proteïna HMGCS1 de hámster (Gil et. al. 1986) en el vector pGEX4T3. Posteriorment, es van expressar i purificar, a partir de cèl·lules bacterianes d'*E.coli* BL21, les proteïnes de fusió GST-AACS, per al posterior assaig enzimàtic, i les proteïnes GST-HMGCS1, GST-PPAR $\gamma$  (prèviament clonada en el laboratori) i GST, per a la realització d'experiments de GST *pull-down*.

### 9.1. Inducció dels cultius.

Una colònia aïllada es va fer créixer en un pre-inòcul de 50 mL de LB/ampicil·lina durant tota la nit a 37°C. Al dia següent es diluí 1:50 en 500 mL de medi LB/ampicil·lina fresc i es deixà créixer a 30°C fins que assolís una O.D<sub>600</sub> de 1.6 (GST-AACS; GST-PPAR $\gamma$  i GST) o una O.D<sub>600</sub> de 0.6-0.9 (GST-HMGCS1). En aquest punt es va iniciar la inducció de la proteïna de fusió afegint al medi IPTG (isopropil- $\alpha$ -D-tiogalactosidasa; AppliChem ref. A1008) 0.5 mM i mantenint el cultiu a temperatura ambient. Aquesta inducció es va repetir 4 hores més tard i es recolliren les cèl·lules al dia següent.

### 9.2 Obtenció de proteïnes.

Les cèl·lules es recolliren per centrifugació (8000 rpm 15 min), es van resuspendre en 30 mL de tampó NETN (GST-AACS; GST-PPAR $\gamma$  i GST) o Tampó A (GST-HMGCS1) i finalment, es lisaren per sonicació (6-7 polsos de 30 segons, 90% potència). El sonicat fou centrifugat (10000 rpm 10 minuts 4°C) per eliminar les restes cel·lulars i s'inicià la purificació de la proteïna de fusió aprofitant la capacitat de la glutatió-S-transferasa (GST) d'unir-se al glutatió.

El sobrenedant de la centrifugació del sonicat es va incubar durant mínim 1 hora amb una suspensió al 50% de resina glutatió-sefarosa (Amersham Biosciences, ref. 17-0756-01), seguint les instruccions de la casa comercial. Després de rentar tres vegades la resina amb NETN, la proteïna purificada fou eluïda de la glutatió-sefarosa mitjançant el tampó d'elució durant 1 hora a 4°C en rotació. Finalment es dialitzà contra una solució de Tris-HCl 100 mM pH 7.2 durant 12 hores a 4°C.

#### **Tampó NETN:**

Tris-HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	0.5%

#### **Tampó A:**

Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0	20 mM
EDTA	1 mM
Glicerol	10%

Ambdós tampons es suplementaren extemporàniament amb inhibidors de proteasa (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma ref. P8340), PMSF 0.1 mM (Sigma ref. P7626), DTT 1 mM i Tritó 1%.

**Tampó d'elució:**

Tris-HCl pH 9.0	50 mM
Glutatió reduït	20 mM

**10. ASSAIG AACs.**

L'activitat AACs es va mesurar per la formació de la forma enòlica de l'acetoacetil-CoA a 303 nm i 30°C (Stern *et al.*, 1956), emprant un coeficient d'extinció molar aparent de l'acetoacetil-CoA de  $7.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

ATP (Sigma ref. A7699) i CoA (Sigma ref. C3144) s'empraren com a les sals de Na o Tris, i l'acetoacetat (Sigma ref. A8509) com a sal de Li, ja que els cations monovalents,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Tris}^+$  i  $\text{Li}^+$ , no afecten a l'activitat enzimàtica sota les condicions experimentals assajades.

Les reaccions es van realitzar en un volum final de 500  $\mu\text{L}$ .

**Mescla de reacció:**

Tris-HCl pH 8.4	100 mM
$\text{MgCl}_2$	2.5 mM
KCl	50 mM
Acetoacetat	0.2 mM
CoA	0.05 mM
ATP	2 mM

Les reaccions es van incubar a 30°C durant 3 minuts en cubeta de quars, s'afegí la proteïna recombinant i purificada GST-AACS (1 $\mu\text{g}$ ) sobre la mescla de reacció, es va mesclar i es va mesurar l'absorbància a 303 nm (UV-1603 *spectrophotometer*, Shimadzu) en el temps indicat.

**10.1.  $K_m$  per acetoacetat.**

La constant d'afinitat per l'acetoacetat ( $K_m$ ) es va obtenir assajant la proteïna GST-AACS en presència de concentracions creixents d'acetoacetat (de 0.01 mM a 0.2 mM), mantenint constant la concentració d'ATP (2 mM) i de CoA (0.05 mM). El temps d'assaig va ser d'1 minut.

**10.2.  $K_m$  per ATP.**

La constant d'afinitat per l'ATP ( $K_m$ ) es va obtenir assajant la proteïna GST-AACS en presència de concentracions creixents d'ATP (de 0.05 mM a 2 mM), mantenint constant la concentració d'acetoacetat (0.2 mM) i de CoA (0.05 mM). El temps d'assaig va ser de 5 minuts.

### 10.3. $K_m$ per CoA.

La constant d'afinitat pel CoA ( $K_m$ ) es va obtenir assajant la proteïna GST-AACS en presència de concentracions creixents de CoA (de 0.0025 mM a 0.2 mM), mantenint constant la concentració d'acetoacetat (0.2 mM) i d'ATP (2 mM). El temps d'assaig va ser de 20 segons.

Es van representar els inversos de la velocitat de cada punt d'assaig respecte als inversos de concentració de substrat (representació de Lineweaver-Burk) per tal d'obtenir els valors de  $K_m$ .

## 11. TRANSCRIPCIÓ I TRADUCCIÓ *IN VITRO*.

Els protocols de transcripció i traducció *in vitro* permeten l'obtenció de proteïna directament de plasmidis que contenen els cDNAs de les proteïnes a sintetitzar clonats immediatament a continuació dels promotors T7 o SP6 (descrits en els Apèndix). Aquestes proteïnes transcrites i traduïdes *in vitro* s'empraren en experiments de GST *pull-down*, ja que es va substituir la metionina freda de la mescla de reacció per [<sup>35</sup>S]-metionina, obtenint-se proteïnes marcades radioactivament.

Els kits emprats van ser TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation i TNT® SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, ref. L1170 i L2080, respectivament), amb els que la transcripció (RNA polimerasa) i la traducció (en lisats de reticulòcit de conill) es realitzen de manera seqüencial i simultània en un sol tub. Les incubacions es van realitzar, seguint les instruccions de la casa comercial, a 30°C durant 90 minuts.

#### Reacció de TnT (Reacció completa Vf=50µL):

DNA plasmídic	1 µg
Extracte de reticulòcits	40 µL
Metionina	1 µL
Aigua lliures de nucleases q.s.p.	50 µL

## 12. ASSAIG DE GST *PULL-DOWN*.

Els assaigs de GST *pull-down* permeten descriure interaccions proteïna-proteïna *in vitro*, estant una de les proteïnes fusionada a la glutatió-S-transferasa (GST). El mètode es basa en posar en contacte la proteïna de fusió amb una segona proteïna i purificar els complexos proteics formats entre ambdues, aprofitant la unió de la GST al glutatió. La presència o no de la segona proteïna unida a la proteïna de fusió serà revelada mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS seguit de fluorografia o *Western blot*.

En aquest treball s'estudià la interacció entre la AACS i la HMGCS1 així com de les proteïnes Sp1 i PPAR $\gamma$  mitjançant experiments de *GST pull-down*.

### 12.1. Reacció d'unió.

S'incubaren 10  $\mu$ g de proteïna de fusió indicades en cada cas amb 10  $\mu$ L de proteïna traduïda i transcrita *in vitro* en 1 mL de tampó d'unió durant 3 hores a 4°C en rotació. Passat aquest temps, s'afegí a la mescla de reacció 50  $\mu$ L de resina glutatió sefarosa per la posterior purificació i s'incubaren durant 1 hora més a 4°C en rotació.

#### **Tampó d'unió (preparació extemporània):**

Llet desnatada	0.5%
DTT	1 mM
Inhibidors de proteases	1x
NETN q.s.p.	1 mL

### 12.2. Recuperació dels complexos proteïna GST i detecció de la interacció.

Es recolliren les mostres per centrifugació a 2000 rpm durant 1 minut. La resina obtinguda es va rentar a temperatura ambient amb NETN tres vegades i es va barrejar amb tampó de càrrega de proteïnes per poder ser resolta en un gel de poliacrilamida-SDS. La interacció va ser detectada per fluorografia.

### 12.3. Fluorografia.

Aquesta tècnica s'utilitza per detectar proteïnes resoltes en un gel de poliacrilamida-SDS marcades radioactivament amb [<sup>35</sup>S]-metionina.

Després de l'electroforesi, es fixà el gel amb una solució d'àcid acètic al 7% durant com a mínim 1 hora i es deshidratà amb DMSO (dos rentats de 30 minuts). Seguidament, s'incubà durant 3 hores amb una solució de PPO al 20% en DMSO i finalment fou rehidratat amb aigua durant 1 hora. El gel rehidratat es va mantenir durant 30 minuts submergit en una solució de glicerol 5%/metanol 30%, intentant minimitzar les possibilitats de trencament en sotmetre'l al procés d'assecament (80°C 120 minuts en un assecador per buit de BioRad).

Alternativament, després del procés de fixació, s'incubà el gel en *Amplify Solution* (GE Healthcare ref. NAMP100) durant 15-30 minuts per finalment ser incubat en una solució de glicerol 5%/metanol 30%, intentant minimitzar les possibilitats de trencament en sotmetre'l al procés d'assecament (80°C 120 minuts en un assecador per buit de BioRad).

Un cop sec, s'exposà el gel a una pel·lícula autoradiogràfica amb pantalla intensificadora (*intensifying screen* Sigma ref. Z37,425-3).

### 13. EXPERIMENTS DE *PULL-DOWN* AMB OLIGOS BIOTINILATS.

Aquesta tècnica permet determinar si una proteïna és capaç d'unir-se a un fragment de DNA conegut que es troba biotinitat. La biotinitació permet recuperar els complexos proteics associats al DNA a l'incubar la mescla amb una resina amb avidina (KD interacció avidina-biotina = 10-15 M). La identitat de les proteïnes que formen part d'aquest complex proteic es posa de manifest mitjançant SDS-PAGE i posterior anàlisi per *Western blot*.

Es realitzaren experiments de *pull-down* emprant els oligonucleòtids biotinitats DH925 i DH926 (coordenades -97/-33 respecte a l'inici de transcripció), per tal d'estudiar el reclutament de les proteïnes Sp1 i PPAR $\gamma$  sobre aquesta seqüència. S'empraren els oligonucleòtids biotinitats Sp1-AACS-MutF i Sp1-AACS-MutR, com a control negatiu.

#### 13.1. *Annealing* dels oligonucleòtids biotinitats.

Per a la hibridació dels oligonucleòtids biotinitats, es realitzà una incubació de 5  $\mu$ g de l'oligonucleòtid A i 5  $\mu$ g de l'oligonucleòtid B en presència de 3  $\mu$ L de NaCl 5 M i TE pH 8.0 en un volum final de 100  $\mu$ L a 65°C durant 10 minuts seguit d'una incubació a temperatura ambient durant 20 minuts més.

#### 13.2. Obtenció dels extractes proteics.

Després d'enretirar el medi i rentar les cèl·lules amb PBS, es continuà realitzant tots els processos a 4°C. Es recolliren les cèl·lules en 300  $\mu$ L de tampó HKMG i s'incubaren en gel durant 20 minuts. Posteriorment foren sonicades realitzant 2 cicles de 30 segons cada un (reposant 30 segons) i centrifugades a 14000 rpm durant 10 minuts i a 4°C.

##### Tampó HKMG:

HEPES pH 7.9	10 mM
KCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Glicerol	10%
NP-40	0.5%

Es suplementa extemporàniament amb 1 mM DTT, inhibidors de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma ref. P8340) i PMSF 0.1 mM (Sigma ref. P7626).

### 13.3. Reacció d'unió de la proteïna al DNA biotinitat.

Un cop equilibrada la resina *Tetralink™ avidin Resin* (Promega ref. V2591) amb tampó d'unió durant 1 hora a 4°C, es realitzà un pre-rentat mitjançant la incubació de 200 µg d'extractes proteics en un volum final de 500 µL (amb tampó HKMG) amb 40 µL de resina durant 1 hora en plataforma rotatòria. Passat aquest temps es centrifugà a 1000 rpm durant 5 minuts i el sobrenedant s'incubà, durant tota la nit en agitació amb 1 µg d'*annealing* d'oligos biotinitats i 10 µg de polidIdC per tal d'afavorir les unions específiques.

### 13.4. Recuperació dels complexos proteïna-DNA biotinitat i identificació de les proteïnes implicades.

Les proteïnes unides al DNA foren recol·lectades amb 40 µL de resina (equilibrada) durant 2 hores en agitació i es realitzaren 4 rentats amb el tampó HKMG. Els complexos foren dissociats mitjançant l'addició de 36 µL de tampó de càrrega de proteïnes 2x i bullint les mostres durant 5 minuts. Les proteïnes es van sotmetre a SDS-PAGE seguit de *Western blot* amb els anticossos especificats en cada cas.

## 14. ANÀLISI DE LÍPIDS: EXPERIMENTS D'INCORPORACIÓ DE <sup>14</sup>C ACETAT A COLESTEROL.

Aquesta tècnica permet l'anàlisi de la síntesi *de novo* de colesterol, després d'incubar les cèl·lules en un medi lliure d'esterols i amb [1-<sup>14</sup>C] àcid acètic, i realitzar una extracció de lípids pel mètode de Folch (1969). Finalment s'analitza el contingut lipídic mitjançant cromatografia en capa fina i s'identificà la identitat del colesterol per addició d'un patró.

Es realitzaren aquest tipus d'experiments en cèl·lules HeLa Tet-On® i HeLa Tet-On AACs amb la finalitat d'analitzar l'efecte de la sobreexpressió del gen AACs en la síntesi *de novo* de colesterol a partir de cossos cetònics. Així mateix, es realitzaren experiments de competició del <sup>14</sup>C acetat mitjançant la incubació de les cèl·lules en concentracions creixents d'acetoacetat i β-hidroxibutirat no marcats radioactivament.

### 14.1. Incubació de les cèl·lules amb [1-<sup>14</sup>C] àcid acètic.

Es plaquejaren  $0,5 \times 10^6$  cèl·lules en plaques de 35 mm de diàmetre i al matí següent es substituï el medi de cultiu per un medi amb un 2% de sèrum deficient en lipoproteïnes (Sigma ref. S-5394) i 2 µCi de [1-<sup>14</sup>C] acetat sòdic (sal sòdica, 57 mCi/mmol, Amersham ref. B287). Després de 24 hores, es recolliren les cèl·lules per tal de dur a terme l'extracció de lípids.



## 14.2. Extracció de lípids.

El mètode d'extracció de lípids és el descrit per Folch *et al.* (1969) i consisteix en successives extraccions de lípids cel·lulars mitjançant una mescla de cloroform:metanol en proporció 2:1.

Es netejaren les cèl·lules amb PBS i es recolliren en 1 mL de metanol: PBS (2:3). Es centrifugà a 3000 g durant 10 minuts i es netejà el *pellet* amb 1 mL de PBS. Es repetí la centrifugació i es va resuspendre el *pellet* amb 200 µL NaCl 0.2 M i es congelà ràpidament en N<sub>2</sub>. S'afegiren 700 µL de reactiu de Folch (cloroform:metanol en proporció 2:1) i 50 µL KOH 0.1 M. Es vortejà realitzant tres polsos de 10 segons i es centrifugà a 2000 g durant 5 minuts. La fase inferior o orgànica es netejà amb 200 µL d'una solució de metanol:H<sub>2</sub>O:cloroform (48:47:3) que es vortejà, realitzant tres polsos de 10 segons. Finalment es centrifugà l'emulsió a 2000 g durant 5 minuts i es recollí la fase orgànica inferior, que es passà a un nou tub i que fou evaporada en *Speed Vac® Plus SC110A* (Savant).

## 14.3. Sistema cromatogràfic.

Els lípids cel·lulars extrets foren resuspesos en 30 µL de cloroform i es separaren mitjançant cromatografia en capa fina sobre sílica gel TLC (Merck ref. 1.05748) en el solvent èter de petroli:etil èter:àcid acètic (80:20:1). La identitat del colesterol format es determinà emprant com a patró [<sup>14</sup>C] colesterol (NEN Products ref. NEC-018).

Les membranes foren exposades a plaques d'europi per al posterior escaneig emprant el *software STORM 840 Gel and Blot Imaging System* (Amersham Biosciences) i es quantificaren amb el programa *Image Quant TL* (Amersham Biosciences).

## 15. CULTIUS CEL·LULARS.

### 15.1. Línies cel·lulars establertes.

#### 15.1.1. Condicions de cultiu.

<u>Línia cel·lular</u>	<u>Medi de cultiu</u>	<u>Sèrum</u>
HepG2	MEM	10 % FBS
Hek293	DMEM	10 % FBS
Cos7	DMEM	10 % FBS
HeLa	DMEM	10 % FBS
Mev-1	Ham's F12	10 % FBS
3T3L1	DMEM	10 % FBS
3T3-F422A	DMEM	10 % FBS
HIB-1B	DMEM:F12	10 % FBS
CaCo-2	DMEM	10 % FBS

Els medis de cultiu DMEM i MEM foren suplementats amb bicarbonat sòdic (3 g/L i 2.19 g/L, respectivament) i tots els medis de cultiu amb L-glutamina (2 mM), antibiòtics (100 U.I./ mL penicil·lina G i 0.1 mg/mL d'estreptomicina; GibcoBRL ref. 15140-122 ) i 10% FBS. Les cèl·lules es van créixer adherides a una placa, a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>, en un incubador humidificat. Periòdicament les plaques es tripsinitzaren a diferents dilucions, depenent del número de cèl·lules i del tipus cel·lular. Es va treballar en campana estèril de flux laminar amb reactius i material estèrils.

### **15.1.2. Congelació de cèl·lules.**

Les cèl·lules es conservaren congelades en nitrogen líquid. Un cop tripsinitzades i centrifugades (1500 rpm 5 minuts), les cèl·lules a congelar es van resuspendre en medi de creixement suplementat amb 5-10% de Dimetilsulfòxid (DMSO), segons indicacions de l'ATCC. El procés de congelació es va realitzar en un criotub, disminuint la temperatura de les cèl·lules gradualment durant 2-3 dies, mantenint-les a -80°C en un tanc d'isopropanol.

### **15.1.3. Descongelació de cèl·lules.**

Les cèl·lules es van descongelar a 37°C, augmentant la temperatura ràpidament. El contingut d'un vial congelat de les línies amb què es va treballar es va resuspendre en 10 mL de medi de creixement fresc i es va afegir a una placa de 100 mm. El medi es canvià quan les cèl·lules s'adheriren (5-6 h) per tal d'eliminar el DMSO.

Alternativament, es va descongelar el vial cel·lular i es va resuspendre en 10 mL de medi de creixement. Es centrifugaren les cèl·lules (1500 rpm 5 minuts) i es va resuspendre el *pellet* cel·lular amb 10 mL més de medi fresc. D'aquesta manera s'eliminà el DMSO que és tòxic per la majoria de línies cel·lulars.

### **15.1.4. Línia cel·lular 3T3L1.**

La línia cel·lular 3T3L1 deriva de la línia cel·lular murínica 3T3, que fou obtinguda a partir de cèl·lules disgregades d'embrions de ratolí Swiss albino. Es tracta d'una línia cel·lular preadipocitària, amb morfologia de fibroblast, capaç de diferenciar-se a adipòcits blancs ja que arresta el creixement de manera espontània quan arriba a confluència i pot ser induïda a la diferenciació pel tractament amb hormones o drogues com ara la insulina, glucocorticoides o isobutimetilxantina (revisat per Spiegelman *et al.*, 1993).

**15.1.4.1. Diferenciació de cèl·lules 3T3L1.**

48 hores després de que el cultiu assolís la confluència, la línia cel·lular fou induïda a la diferenciació per addició de medi de diferenciació 1 (dia 0). Dos dies després es canvià el medi a medi 2 (dia 2) i a dia 4 es mantingueren les cèl·lules en DMEM 10%FBS. El medi de cultiu es substituï per medi fresc cada 48 hores. La diferenciació és complerta a dia 8.

**Medi de diferenciació 1:**

DMEM suplementat amb 10% FBS, L-Glutamina 2 mM, antibiòtics (estreptomicina 100 U/mL i penicil·lina 0.1 mg/mL)

insulina (Sigma ref. I1882)	5 µg/mL
Dex (Sigma ref. D4902)	0.25 µM
IBMX (Sigma ref. I7018)	0.5 mM

**Medi de diferenciació 2:**

DMEM suplementat amb 10% FBS, L-Glutamina 2 mM, antibiòtics (estreptomicina 100 U/mL i penicil·lina 0.1 mg/mL)

Insulina	5 µg/mL
----------	---------

**Medi de cultiu:**

DMEM suplementat amb 10% FBS, L-Glutamina 2 mM, antibiòtics (estreptomicina 100 U/mL i penicil·lina 0.1 mg/mL)

**15.1.4.2. Tinció *Oil Red O*.**

La tinció *Oil Red O* permet la tinció de lípids de les cèl·lules per a la seva posterior observació al microscopi òptic. Permet distingir els vacúols lipídics presents als adipòcits diferenciats, essent doncs un índex del grau de diferenciació que presenten les cèl·lules.

Després de rentar les cèl·lules amb isopropanol al 65%, s'incubaren durant 20 minuts en solució de tinció (solució sobresaturada de *Oil Red O* (Sigma ref. O0625) en isopropanol al 65%). Després de realitzar un primer rentat amb isopropanol al 65% i de dos a tres més, amb aigua destil·lada, s'observaren les cèl·lules al microscopi òptic.

**15.2. Cultius primaris.****15.2.1. Cultiu primari de teixit adipós.**

El teixit adipós blanc (TAB) emprat per a la generació del cultiu primari es va obtenir a partir del dipòsit subcutani de rates mascle de la soca Sprague-Dawley d'uns 200 grams de pes

i 6 setmanes de vida, mantingudes en unes condicions d'estabulació estàndard i alimentades amb una dieta equilibrada de laboratori i aigua *ad libitum*. El protocol que es va seguir és una adaptació del descrit per Björntorp *et al.* (1978).

Prèviament a la dissecció, els animals foren anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal d'una mescla de ketamina (90 mg/Kg; Imalgène 1000 (Merial)) i de xilacina (10 mg/kg; Rompum (Bayer Healthcare)). Un cop extret el TAB es disposà en una placa de Petri amb 10 mL de solució de rentat i es passà a treballar en campana. Es dugueren a terme dos rentats més en la mateixa solució i es realitzà una digestió mecànica del teixit amb tisores. El teixit disgregat s'introduí dins un tub amb solució de digestió prèviament temperada (10 mL/ g de teixit) i s'incubà a 37°C en agitació durant 1 h ora, realitzant-se una agitació manual cada 10-15 minuts. Passat aquest temps, el teixit, totalment disgregat, fou filtrat a través d'una maia de niló de 250 µ i es centrifugà a 250g durant 10 minuts a temperatura ambient. El sobrenedant, que contenia els adipòcits blancs madurs i el medi de digestió, fou eliminat amb pipeta *Pasteur*. El *pellet*, amb la fracció estromal vascular, fou resuspès en 2 mL de DMEM. Es filtrà i es centrifugà així com s'ha indicat anteriorment i es resuspengué el *pellet* en 1 mL de tampó de lisi per tal de lisar els eritròcits. Es tornà a centrifugar i el *pellet* obtingut fou resuspès en el medi de cultiu. Finalment es contaren les cèl·lules per plaquejar-les a una densitat de  $4.5 \times 10^5$  cèl·lules per placa de 60 mm.

**Solució de rentat:**

NaCl	0.135 M
KCl	4.7 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.25 mM
Hepes	10 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.25 mM
afegir 1% (w/v) BSA extemporàniament (Sigma ref. A7906)	

**Solució de digestió:**

Solució de rentat suplementada extemporàniament amb:

BSA	3.5% (w/v)
Glucosa (Sigma ref. G7528)	0.5 mg/mL
Colagenasa tipus II (Sigma ref. C6885)	1 mg/mL

**Solució de lisi:**

Tris	17 mM
NH <sub>4</sub> Cl	0,83%

**Medi de cultiu:**

DMEM suplementat amb 10% FBS, L-Glutamina 2 mM, antibiòtics (estreptomicina 100 U/mL i penicil·lina 0.1 mg/mL), fungizona 1.25 µg/mL (Gibco ref. 15290-026).

**15.2.1.2. Diferenciació del cultiu.**

48 hores després de que el cultiu assolís la confluència, fou induït a la diferenciació per l'addició de medi de diferenciació 1 (dia 0). Dos dies després es substituï el medi de cultiu per medi 2 i es mantingué el cultiu cel·lular en aquest medi fins al final de l'experiment, canviant el medi per medi fresc cada 48 hores. La diferenciació és completa a dia 8.

**Medi de diferenciació 1:**

DMEM suplementat amb 10% FBS, L-Glutamina 2 mM, antibiòtics (estreptomicina 100 U/mL i penicil·lina 0.1 mg/mL), fungizona 1.25 µg/mL (Gibco ref. 15290-026).

Insulina (Sigma ref. I1882)	10 µg/mL
Dex (Sigma ref. D4902)	0.25 µM
IBMX (Sigma ref. I7018)	0.5 mM

**Medi de diferenciació 2:**

DMEM suplementat amb 10% FBS, L-Glutamina 2 mM, antibiòtics (estreptomicina 100 U/mL i penicil·lina 0.1 mg/mL), fungizona 1.25 µg/mL (Gibco ref. 15290-026).

Insulina	10 µg/mL
----------	----------

**15.2.2. Obtenció d'hepatòcits.**

L'obtenció d'hepatòcits es realitzà segons el protocol de Seglen *et al.* (1973). S'empraren rates mascle de la soca Sprague-Dawley d'uns 200 grams de pes i 6 setmanes de vida, mantingudes en unes condicions d'establució estàndard i alimentades amb una dieta equilibrada de laboratori i aigua *ad libitum*.

Els animals foren anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal d'una mescla de ketamina (90 mg/Kg; Imalgène 1000 (Merial)) i de xilacina (10 mg/kg; Rompum (Bayer Healthcare)) i es realitzà una laparotomia que permetés l'accés al fetge. Es va canular la vena porta amb un catèter de 16G x 2" i es tallà la vena cava inferior per tal d'iniciar un circuit a una velocitat de 50 mL/min mitjançant una bomba peristàltica (*Minipuls 3 Peristaltic Pump MP3* de Wilson) amb diferents tampons temperats a 37° i sota constant oxigenació (oxigen C-45; puresa 99.95% de *Carburos Metálicos*). Primerament, es perfusionà el fetge amb 500 mL de tampó 1 amb l'objectiu de netejar el circuit sanguini; durant aquesta fase el fetge adquireix una tonalitat blanquinosa. Posteriorment, es feren passar 500 mL de tampó 2, que conté col·lagenasa A de tipus IV (Sigma ref. C5138), iniciant-se així la disgregació del teixit. Es tallà el fetge i es posà en

un vas de precipitats amb 50 mL de tampó 2, que continuà essent oxigenat i es dugué a terme una disgregació mecànica amb l'ajut d'unes pinces fins a obtenir una suspensió completament tèrbola. Per tal de netejar i purificar les cèl·lules vives, aquesta suspensió cel·lular fou filtrada a través d'una maia de niló i fou sotmesa a tres centrifugacions seguides (1000 rpm 3 minuts a 4°C) resuspenent-se cada cop amb el tampó 3. El precipitat final fou resuspès en medi de diferenciació i es sembraren  $9 \times 10^6$  cèl·lules per placa de 100 mm. A les 4 hores es substituï el medi per medi de cultiu fresc i es mantingué en aquestes condicions durant tot l'experiment.

El cultiu d'hepatòcits es pot mantenir durant 4-5 dies; passat aquest temps, les cèl·lules es desdiferencien a fibroblasts.

**Tampó 1: medi equilibrat de sals de Hanks, lliure de calci i magnesi:**

KCl	5.4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44 mM
NaCl	137 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.33 mM
Extemporàniament es suplementà amb:	
NaHCO <sub>3</sub>	4.2 mM
Hepes	20 mM
Glucosa	5.5 mM
EGTA	0.5 mM

**Tampó 2: medi L-15 de Leibovitz:**

KCl	5.4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.98 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.81 mM
NaCl	137 mM
NaHPO <sub>4</sub>	0.33 mM
Extemporàniament es suplementà amb:	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5 mM
Hepes	20 mM
Glucosa	5.5 mM
Colagenasa tipus IV	0.15 mg/mL

**Tampó 3: medi L-15 de Leibovitz:**

Extemporàniament es suplementa amb:

CaCl $\cdot$ 2H $_2$ O	1.3 mM
Hepes	20 mM
Glucosa	5.5 mM
Albúmina Sèrica Bovina fracció V	1%

Prèviament a la suplementació, els tres tampons es gasejaren amb carbogen durant 20 minuts i s'ajustà el pH a 7.4

**Medi de diferenciació:**

DMEM suplementat amb 10% FBS, L-Glutamina 2 mM, antibiòtics (estreptomicina 100 U/mL i penicil·lina 0.1 mg/mL)

Glucosa	10 mM
Insulina (Sigma ref. I1882)	100 nM
Dex (Sigma ref D4902)	100 nM

**Medi de cultiu:**

DMEM suplementat amb 10% FBS, L-Glutamina 2 mM i antibiòtics (estreptomicina 100 U/mL i penicil·lina 0.1 mg/mL)

**16. TRANSFECCIONS CEL·LULARS.**

Els protocols d'introducció de DNA en l'interior de les cèl·lules eucariotes (transfecció) són molt variats i conceptualment molt diferents. En aquest treball es van emprar dos mètodes de transfecció diferents depenent del tipus cel·lular: la formació de precipitats de fosfat càlcic i DNA que poden ser incorporats per les cèl·lules, i la creació de complexos lipídics que embolcallen el DNA i en faciliten la seva entrada.

**16.1. Transfecció transitòria.**

L'estudi de la regulació transcripcional de promotors per factors de transcripció i/o determinats tractaments es va dur a terme mitjançant transfeccions transitòries de cèl·lules eucariotes. També es va emprar per a la sobreexpressió de la proteïna AACCS etiquetada amb myc. La transfecció transitòria permet la introducció de DNA a l'interior de cèl·lules eucariotes durant un període de temps curt (2-3 dies) ja que no es força de cap forma el manteniment del DNA a les cèl·lules durant les successives replicacions.

**16.1.1. Mètode del fosfat càlcic.**

El mètode del fosfat càlcic (Wigler *et al.*, 1977; Maitland *et al.*, 1977) es basa en la formació de precipitats de DNA que poden ser internalitzats per la cèl·lula. El DNA coprecipita amb el fosfat càlcic, que l'engloba i facilita la seva entrada a la cèl·lula fins al nucli. Un cop en el nucli, els plasmidis utilitzen la maquinària de la cèl·lula per expressar els gens clonats.

El dia abans de l'experiment, es plaquejaren les cèl·lules a una densitat de  $0.5-1 \times 10^5$  cèl·lules/ pou de 35 mm (*Multiwells* 6 pous; NUNC, ref. 150239). Tots els punts de cada experiment es van realitzar per duplicat. 2-3 hores abans de començar la transfecció, es canvià el medi de cultiu i es prepararen els precipitats de la transfecció afegint la solució A (DNA-clorur càlcic) gota a gota i en agitació constant sobre la solució B (HBS2x). En tot moment s'evità la formació de concentracions locals elevades de clorur càlcic que provocarien la precipitació brusca del DNA i la reducció de l'eficiència de transfecció. Els precipitats formats foren incubats a temperatura ambient durant 20 minuts, i posteriorment es van afegir, gota a gota, a la placa que contenia les cèl·lules a transfectar. 24 hores després de la transfecció, es netejaren les cèl·lules amb PBS per tal d'eliminar els precipitats no internalitzats i s'afegí el medi de creixement nou, que en determinats casos contenia lligants específics (o vehicle). Al dia següent es recolliren les cèl·lules i es procedí al seu anàlisi (veure apartat 16.3).

**Solució A (per plaques de 35mm):**

DNA	3-5 µg
CaCl <sub>2</sub> 2M	12.5 µL
Aigua q.s.p.	125 µL

**Solució B (per plaques de 35mm):**

HBS2x	125 µL
-------	--------

**HBS2X (Hepes Buffered saline) pH 7.1:**

HEPES pH7.1	50 mM
NaCl	280 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 mM

**PBS (Phosphat Buffered Saline) pH 7.1:**

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4 mM



Generalment, s'emprà el mètode del fosfat càlcic per a la transfecció de la línia cel·lular HepG2. En plaques de 35 mm es transfectaren 0.5 µg de plasmidi reporter, 1µg de plasmidi d'expressió i 60 ng de plasmidi control de la transfecció (pRL-CMV). La quantitat de DNA transfectat a cada punt d'un mateix experiment es va ajustar amb pBluescript SK+/- o vector buit perquè sempre fos la mateixa.

### 16.1.2. Mètode de formació de liposomes.

Es basen en la formació de complexos entre lípids catiónics i DNA, que tenen afinitat per la membrana, permetent així l'entrada en l'interior cel·lular. Els mètodes de transfecció amb reactius lipídics van ser utilitzats en aquelles línies que presentaven eficiències de transfecció baixes amb el mètode del fosfat càlcic, ja que ofereixen percentatges de transfecció més elevats, però són més cars.

#### 16.1.2.1. *Lipofectamine™ LTX Reagent*.

Les transfeccions amb *Lipofectamine™ LTX Reagent* (Invitrogen ref. 15338-100) es van realitzar segons les indicacions de la casa comercial.

El dia abans de l'experiment, es plaquejaren les cèl·lules a una densitat de  $1 \times 10^6$  cèl·lules/placa de 100 mm (Cultek, ref. 430167). Es diluïren 10 µg de plasmidi a sobreexpressar en 2.5 mL de DMEM lliure d'antibiòtic i s'afegiren 19.5 µL de *Lipofectamine™ LTX Reagent* en condicions d'esterilitat. La mescla de transfecció s'incubà durant 30 minuts a temperatura ambient i s'afegí sobre el medi de cultiu de les cèl·lules a transfectar. 12 hores després de la transfecció es canvià el medi de cultiu per medi fresc i es dugueren a terme tractaments amb reactius específics. 24 hores després del tractament es recolliren les cèl·lules i es procedí a l'anàlisi de la sobreexpressió de les proteïnes transfectades.

#### 16.1.2.2. FuGENE®6.

Les transfeccions amb FuGENE®6 (Roche, ref. 18115075) es van realitzar segons les indicacions de la casa comercial, preparant primer els complexos DNA-FuGENE®6 i dipositant-los, després, sobre les cèl·lules a transfectar.

El dia abans de l'experiment es plaquejaren les cèl·lules a una densitat determinada depenent de la superfície de placa a transfectar ( $0.5-1 \times 10^5$  cèl·lules/ placa de 35mm i  $10^5$  cèl·lules/ pou en placa de 12 pous). Tots els punts de cada experiment es van realitzar per duplicat. Els complexos DNA-FuGENE®6 es prepararen a partir de dues solucions, A i B, que contenien, respectivament, el DNA a transfectar i el FuGENE®6. La solució B (reactiu lipídic + medi de cultiu lliure de sèrum) es preparà en condicions d'esterilitat i es va deixar reposar a

temperatura ambient durant 5 minuts abans d'afegir-la sobre la solució A (DNA). La mescla de transfecció s'incubà durant 20 minuts a temperatura ambient i s'afegí sobre el medi de cultiu de les cèl·lules a transfectar. 24 hores després de la transfecció es tractaren les cèl·lules amb lligants específics (o vehicle) i al dia següent es recolliren les cèl·lules i es procedí al seu anàlisi (veure apartat 16.3).

#### **Solució A:**

FuGENE®6	2.5 µL/µg DNA transfectat
DMEM lliure de sèrum q.s.p	100 µL/cada 2 mL de medi de cultiu

#### **Solució B:**

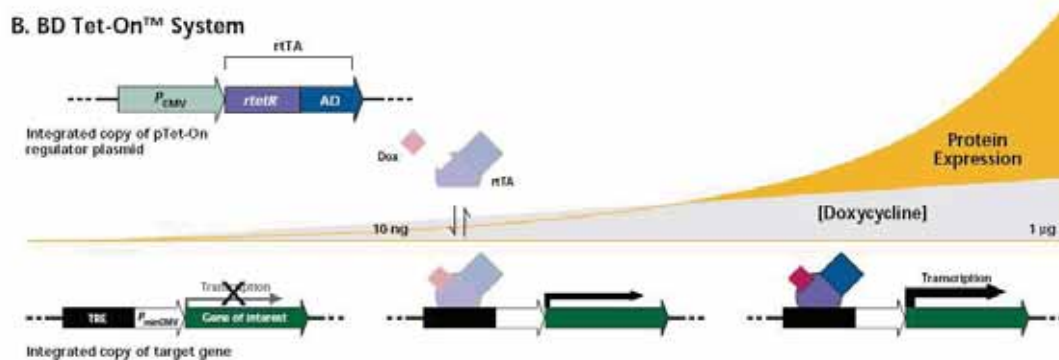
DNA	3-5 µg DNA
-----	------------

S'emprà el reactiu comercial FuGENE®6 per a la transfecció de les línies cel·lulars HIB-1B i Hek293. En la línia cel·lular HIB-1B es seguí el protocol descrit per Hondares *et al.* (2006). En placa de 35mm (*Multiwells* 6 pous; NUNC, ref. 150239) es transfectaren 1.5 µg de plasmidi reporter, 0.3 µg de plasmidi d'expressió i 50 ng de plasmidi control de la transfecció (pRL-CMV).

En el cas de les cèl·lules Hek293 es seguí el protocol descrit per Amemiya-Kudo *et al.* (2000). En plaques de 12 pouets (Fisher Bioblock Scientific S.L., ref. B22421) es transfectaren 0.5 µg de plasmidi reporter, 0.5 µg de plasmidi d'expressió i 30 ng de plasmidi control de la transfecció (pRL-CMV). En ambdós casos, la quantitat de DNA transfectat a cada punt d'un mateix experiment es va ajustar amb pBluescript SK+/-.

### **16.2. Transfecció estable: *BD™ Tet-On Gene Expression Systems.***

El *BD™ Tet-On Gene Expression system* permet l'obtenció d'elevats nivells d'expressió del gen d'interès, transfectat en cèl·lules eucariotes, d'una manera regulada per l'addició de doxiciclina en el medi de cultiu (Gossen *et al.*, 1995).



**FIGURA M-3. Esquema del *Tet-On gene expression system.***

Aquesta tècnica es basa en els components reguladors de l'operó de resistència a tetraciclina d'*E. coli*, on la proteïna repressora Tet (TetR) reprimeix la transcripció dels gens per la unió a les seqüències de l'operó (tetO) en absència de tetraciclina. Així doncs, el sistema consta de dos elements (TetR i tetO) que s'han optimitzat per a l'ús en cèl·lules de mamífer:

- **Vector regulador pTet-On:** inclou la regió codificant de la proteïna reguladora (rTetR), que es creà per reversió de la proteïna repressora Tet (TetR) (Hillen *et al.*, 1994; Gossen *et al.*, 1995). El vector pTet-On confereix resistència a geneticina.
- **Plasmidi resposta pTRE2Hyg:** expressa el gen d'interès sota el control de l'element de resposta a tetraciclina (TRE) i confereix resistència a higromicina.

Així, quan es crea una línia cel·lular doble estable, que conté el plasmidi regulador (pTet-On) i el plasmidi de resposta (pTRE2Hyg-GenX), per addició de doxiciclina en el medi de cultiu, la proteïna rTetR s'uneix al TRE, activant l'expressió del gen d'interès.

La línia cel·lular HeLa Tet-On® (Clontech ref. 632110) està establement transfectada amb el plasmidi pTet-On. El plasmidi pTet-On conté el gen neo<sup>r</sup>, que codifica per a una proteïna kanamicina-neomicina fosfotransferasa, conferint resistència a l'antibiòtic geneticina. Aquesta línia cel·lular es va mantenir addicionant medi fresc amb antibiòtic (geneticina 100 µg/ mL) cada 4 dies.

Per a la obtenció de la línia cel·lular HeLa Tet-On AACS es va transfectar el constructe pTRE2hygAACS pel mètode del fosfat càlcic en la línia cel·lular HeLa Tet-On®. El plasmidi pTRE2hygAACS conté el gen higromicina fosfotransferasa (HPT), conferint resistència a l'antibiòtic higromicina B, que és tòxic per a cèl·lules procariotes i eucariotes. El protocol que es va dur a terme és idèntic al de la transfecció transitòria excepte que a les 48 hores de la transfecció s'addicionà al medi de cultiu l'antibiòtic higromicina a una concentració de selecció (400 µg/mL) i l'antibiòtic de selecció de la primera estable a una concentració de manteniment (geneticina, 100 µg/mL). Cada 4 dies es canvià el medi de cultiu per medi fresc amb ambdós antibiòtics i després de 15 dies, les cèl·lules no transfectades havien mort de manera que es visualitzaren clons resistents que no estaven presents en una placa control on no s'havia transfectat el plasmidi pTRE2HygAACS. Aquests clons foren aïllats, emprant cilindres de clonatge, i transferits a noves plaques de cultiu.

La línia cel·lular HeLa Tet-On AACS es va mantenir addicionant medi fresc amb ambdós antibiòtics de selecció (geneticina 100 µg/ mL i higromicina 200 µg/mL) cada 4 dies. Per tal d'estudiar l'efecte de la sobreexpressió del gen AACS en la biosíntesi d'esterols, es tractaren les cèl·lules amb Doxiciclina (1 µg/mL) durant 48 hores.

### 16.3. Obtenció d'extractes nuclears i assaig dual d'activitat Luciferasa-Renilla.

En experiments de gen reporter les cèl·lules transfectades, per qualsevol dels mètodes de transfecció descrits, van ser lisades en *Passive Lysis Buffer* (Promega, ref. E1941) per tal de ser assajats amb el kit comercial *Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter Assay System* (Promega ref. E1960), seguint les instruccions de la casa comercial. En general es van analitzar 10µL d'extracte cel·lular amb 20µL de cada un dels reactius, segons indicacions de la casa comercial. Es van obtenir així, els valors de luciferasa de *Photinus pyralis* (representativa de l'activitat del promotor o de la regió promotora estudiada) i de *Renilla reniformis* (control intern de transfecció). Les mesures de luminescència es van realitzar en un luminòmetre Sirius (*Berthold Detection System*).

## 17. EXPERIMENTACIÓ ANIMAL.

En general sempre que no s'especifiqui, els animals emprats durant la realització del treball foren rates mascle de 200-250 g, alimentades *ad libitum* amb una dieta estàndard i mantingudes en unes condicions d'estabulació constants (22°C, 80-90% d'humitat relativa, cicle de llum fosc 12:12).

Tots els protocols utilitzats han sigut prèviament autoritzats pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona.

### 17.1. Estudi de l'expressió del gen Acetoacetil-CoA sintetasa (AACS) durant el ritme circadiari en rates Sprague-Dawley adultes.

Es sacrificaren un total de 21 animals distribuïts de la següent manera:

Dia	Grup experimental	Sacrifici	Nº d'animals
Dia 1	Ct 0	8:00 h	n = 3
Dia 1	Ct 4	12:00 h	n = 3
Dia 1	Ct 8	16:00 h	n = 3
Dia 1	Ct 12	20:00 h	n = 3
Dia 2	Ct 16	24:00 h	n = 3
Dia 2	Ct 20	4:00 h	n = 3
Dia 2	Ct 24	8:00 h	n = 3

Un cop anestesiats els animals, es van extreure el teixit adipós blanc, el fetge i el cervell que ràpidament foren congelats amb N<sub>2</sub> líquid i guardats a -80°C per al posterior processament i anàlisi de l'expressió del gen AACS.

### 17.2. Estudi de l'expressió del gen Acetoacetil-CoA sintetasa (AACS) durant el ritme circadiari en rates Sprague-Dawley adultes. Efecte de la realimentació.

Els animals es dejunaren a les 8:00h, coincidint amb el canvi foscor/llum, durant 11,5 hores (just abans de l'inici de la fase fosca). Posteriorment, es dividiren en dos grups experimentals, dejunats i realimentats, segons el següent protocol experimental:

Dia	Grup experimental	Dejuni	Realimentació	Sacrifici	Nº d'animals
Dia 1	Dejunats	8:00 h	-	21:00 h	n = 3
Dia 1	Realimentats	8:00 h	19:30 h	21:00 h	n = 3

Un cop anestesiats els animals, es va extreure el fetge que ràpidament fou congelat amb N<sub>2</sub> líquid i guardat a -80°C per al posterior processament i anàlisi de l'expressió del gen AACS.

### 17.3. Estudi de l'expressió del gen Acetoacetil-CoA sintetasa (AACS) durant el ritme circadiari en rates Sprague-Dawley adultes. Efecte de l'administració d'insulina.

Els animals es dejunaren a les 8:00h, coincidint amb el canvi foscor/llum, durant 11,5 hores (just abans de l'inici de la fase fosca). Posteriorment, es dividiren en dos grups experimentals, insulina i control, als que s'administrà per via subcutània 2 U.I./Kg d'insulina (Actrapid®, NovoNordisk) o bé l'equivalent en volum de sèrum salí, respectivament.

Dia	Grup experimental	Dejuni	Administració (19:30 h)	Sacrifici	Nº d'animals
Dia 1	Control	8:00 h	sèrum salí	21:00 h	n = 3
Dia 1	Insulina	8:00 h	2 U.I./ Kg ins	21:00 h	n = 3

Un cop anestesiats els animals, es va extreure el fetge que ràpidament fou congelat amb N<sub>2</sub> líquid i guardat a -80°C per al posterior processament i anàlisi de l'expressió del gen AACS.

### 17.4. Estudi de l'expressió del gen Acetoacetil-CoA sintetasa (AACS) en resposta al dejuni i realimentació en rates Sprague-Dawley adultes.

Els animals es dejunaren a les 8:00h del dia 1 i es mantingueren dejunats durant 24 hores. Posteriorment, s'alimentaren amb dieta estàndard *ad libitum* i foren sacrificats a diferents temps segons el següent protocol experimental:

Dia	Grup experimental	Dejuni	Realimentació	Sacrifici	Nº d'animals
Dia 1	Control	-	-	8:00 h	n = 3
Dia 2	Dejunats	24 h	-	8:00 h	n = 3
Dia 2	RA 0.33 h	24 h	20'	8:20 h	n = 3
Dia 2	RA 1 h	24 h	1 h	9:00 h	n = 3
Dia 2	RA 2.5 h	24 h	2h 30'	10:30 h	n = 3
Dia 2	RA 5 h	24 h	5 h	13:00 h	n = 3

Un cop anestesiats els animals, s'obtingué 1 mL de sang per punció cardíaca per tal de mesurar la concentració de cossos cetònics en plasma. A continuació, es van extreure el teixit adipós blanc, el fetge i el cervell que ràpidament foren congelats amb N<sub>2</sub> líquid i guardats a -80°C per al posterior processament i anàlisi de l'expressió del gen AACS.

#### 17.4.1. Determinació de cossos cetònics en plasma.

Per a la determinació de cossos cetònics en plasma s'emprà el *kit* comercial Autokit 3-HB (Wako Chemicals GmbH). El *kit* permet la mesura de 3-hidroxiacetat mitjançant l'acoblament de dues reaccions enzimàtiques. En la primera reacció, l'acetoacetat present en la mostra és convertit a acetona per acció de l'enzim acetoacetat descarboxilasa. En la segona reacció, el 3-hidroxiacetat és oxidat en presència de l'enzim 3-hidroxiacetat deshidrogenasa i Tio-NAD<sup>+</sup>. Com l'acetoacetat present en la mostra ha sigut eliminat (reacció 1), sols s'assaja el 3-hidroxiacetat mitjançant la mesura espectrofotomètrica de la taxa de Tio-NADH produït.

La sang, obtinguda per punció cardíaca, fou mantinguda a temperatura ambient en tubs que contenien agents que promouen la coagulació (*Blood tubes with serum clotting activator*, SARSTEDT ref. 32.329 PP). Un cop que la sang havia coagulat, es centrifugà a 4000 rpm durant 10 minuts i el sobrenedant obtingut, el sèrum, es recollí i es guardà a -20°C.

S'assajaren 40 µL de sèrum diluït amb H<sub>2</sub>O en un volum final de 640 µL mesurant l'absorbància a 405 nm a 37°C (UV-1603 *spectrophotometer* Shimadzu) segons les indicacions de la casa comercial. Breument, als 640 µL de sèrum diluït i temperat a 37°C s'afegiren 270 µL de reactiu 1 i s'incubà durant 5 minuts a 37°C. Pas sat aquest temps, s'afegiren 90 µL del reactiu 2 i es mesurà l'absorbància als 6 i 8 minuts. La variació de l'absorbància entre ambdues lectures són reflex de la producció de tio-NADH i, mitjançant extrapolaració amb una recta patró, de la concentració de 3-hidroxiacetat present en el sèrum.

#### 17.5. Estudi de la regulació del gen acetoacetyl-CoA sintetasa (AACS) pel factor de transcripció PPAR $\gamma$ en rates Sprague-Dawley.

S'administrà als animals oralment 10 mg/Kg de rosiglitazona (Alexis ref. 350-103) o el volum equivalent de solució salina durant 7 dies. 6 hores després de la darrera administració foren sacrificats. A continuació es detalla el protocol experimental seguit:

Dia	Grup experimental	Administració (10:00 h)	Sacrifici	Nº d'animals
Dia 1-7	Control	sèrum salí	Dia 7 16:00 h	n = 3
Dia 1-7	RSG	10 mg/ Kg RSG	Dia 7 16:00 h	n = 3

Un cop anestesiats els animals, es va extreure el teixit adipós blanc (dipòsit subcutani), que ràpidament fou congelat amb N<sub>2</sub> líquid i guardat a -80°C per al posterior processament i anàlisi de l'expressió del gen AACS.





**RESULTATS**



**ESTUDIS AMB LA PROTEÏNA ACETOACETIL-CoA  
SINTETASA HUMANA**



# DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES CINÈTICS DE LA PROTEÏNA AACS HUMANA

En la dècada dels 80s, es purificà la proteïna acetoacetil-CoA sintetasa (AACS) a partir del bacteri *Zoogloea ramigera* I-16-M (Fukui *et al.*, 1982) i a partir de fetge de rata (Ito *et al.*, 1984). Quan l'enzim purificat, tant de bacteri com de rata, s'incubà amb acetoacetat, ATP i CoA en presència de  $Mg^{2+}$  i  $K^+$ , els únics productes de la reacció formats foren acetoacetil-CoA, AMP i  $PP_i$  en quantitats aproximadament equimolars.

No fou fins a l'any 2000 quan s'aïllà el cDNA de rata (Iwahori *et al.*, 2000) i poc després va aïllar-se el cDNA humà (Ohgami *et al.*, 2003), però no es va comprovar que aquests cDNAs predits codificaven per una proteïna AACS funcional.

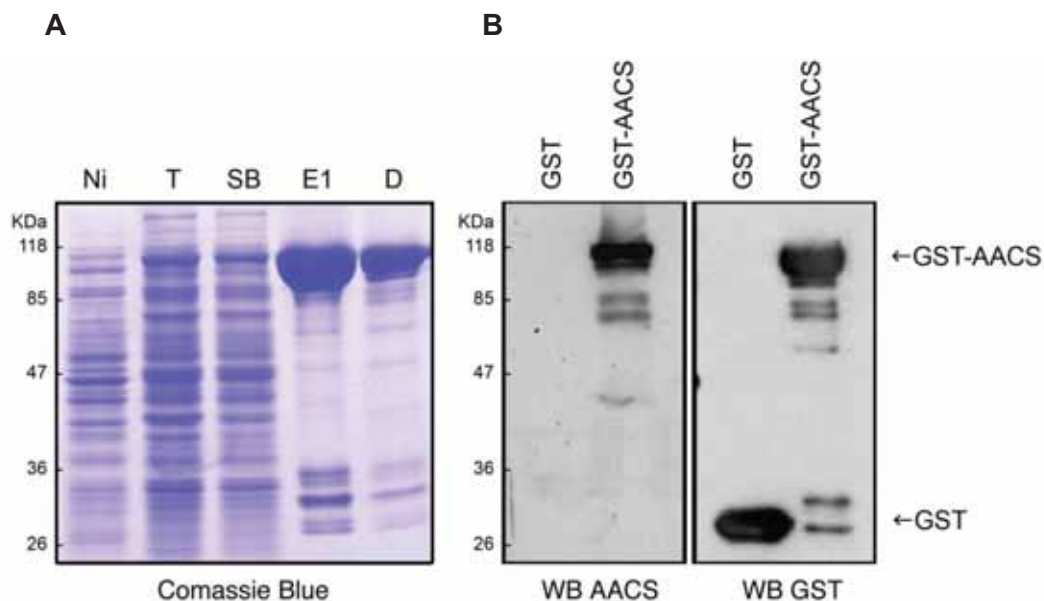
## 1. CLONATGE DEL cDNA DEL GEN AACS HUMÀ.

Amb l'objectiu de determinar la funcionalitat enzimàtica de la seqüència publicada del cDNA del gen AACS humà i caracteritzar cinèticament l'enzim, s'amplificà, aquesta seqüència, a partir de DNA genòmic de cèl·lules Caco-2 (NM 023928; oligonucleòtids DH 475 i DH 476) i es clonà en el plasmidi d'expressió pcDNA3. Posteriorment, tal i com es detalla en l'apèndix, es subclonà en el vector pGEX4T3, produint-se una proteïna de fusió amb la glutatió-S-transferasa.

## 2. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA AACS HUMANA RECOMBINANT.

L'expressió i purificació de proteïnes de fusió permet l'obtenció de grans quantitats de proteïnes eucariotes. Aquestes proteïnes, clonades en plasmidis específics, s'obtenen fusionades a altres proteïnes de fàcil purificació.

Es va expressar i purificar, a partir de cèl·lules bacterianes d'*E.coli* BL21, la proteïna de fusió GST-AACS per al posterior assaig enzimàtic. Per això, un cop que el cultiu assolí una  $O.D_{600}$  d'1.6, s'inicià la inducció de la proteïna de fusió afegint al medi IPTG 0.5 mM. Aquesta inducció es va repetir 4 hores més tard i es recolliren les cèl·lules després d'aproximadament 16 hores (veure materials i mètodes secció 9).



**FIGURA R-1. Expressió de la proteïna AACS humana en *E. coli*.** (A) Es mostra la tinció de *Coomassie* d'un gel d' SDS-poliacrilamida al 10% d'un cultiu cel·lular d'*E. coli* BL21 transformat amb el plasmidi pGEX4T3AACS (Ni = extracte proteic total no induït; T= extracte proteic total induït; SB= sobrenedant; E1= eluït 1; D= proteïna dialitzada). Es carregaren 10 µg de proteïna en cada carril (B) Comprovació de la identitat de la proteïna mitjançant transferència *Western* amb l'anticòs contra AACS (1:1000) i contra GST (1:2000) de les proteïnes purificades GST-AACS i GST. Es carregaren 10 µg de proteïna en cada carril.

La purificació de la proteïna es va comprovar per tinció amb *Coomassie Blue* d'un gel de SDS-poliacrilamida i per *Western blot* (figura R-1). Aquesta proteïna correspon a l'AACS baix tres criteris: 1) Presenta el pes molecular esperat (98 KDa; 72 KDa de la proteïna AACS humana i 26 KDa de la glutatí S-transferasa); 2) S'indueix per IPTG; 3) És reconeguda en experiments de transferència *Western* amb anticossos específics contra l'AACS.

### 3. ESTUDIS CINÈTICS AMB LA PROTEÏNA AACS HUMANA.

Els estudis cinètics de l'acetoacetil-CoA sintetasa s'han dut a terme tant amb l'enzim purificat com amb extractes citosòlics, essent, en aquest darrer cas, l'assaig de l'activitat AACS complicat, per la presència dels elevats nivells de l'acetoacetil-CoA tiolasa. Per a l'assaig enzimàtic de l'AACS a partir de la proteïna purificada, s'han emprat diferents aproximacions, totes elles espectrofotomètriques, que consisteixen en la mesura de l'acetoacetil-CoA produït a partir d'acetoacetat, en la mesura de la conversió de NADH a NAD<sup>+</sup> i en la mesura de la producció d'AMP (Fukui *et al.*, 1982).

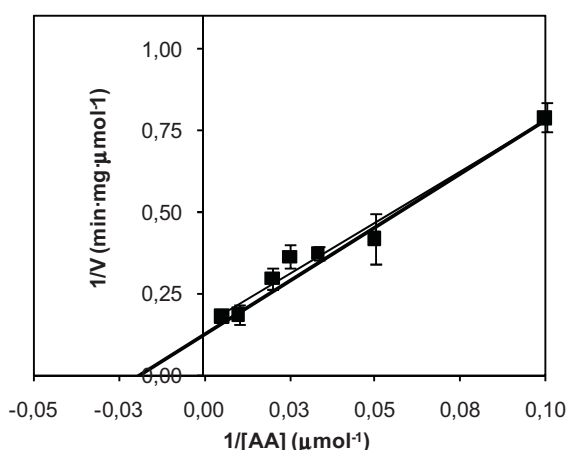
En aquest treball es va assajar l'activitat AACS com a reflex de l'acetoacetil-CoA produït, mesurant l'absorbància a 303 nm i 30 °C (Stern *et al.*, 1956), emprant un coeficient d'extinció molar aparent de l'acetoacetil-CoA de  $7.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

ATP i CoA s'empraren com a sals de sodi o Tris, i l'acetoacetat com a sal de liti, ja que els cations monovalents,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Tris}^+$  i  $\text{Li}^+$ , no afecten a l'activitat enzimàtica sota les condicions experimentals assajades. Per a assajar l'activitat acetoacetil-CoA sintetasa, a més d'acetoacetat, ATP i CoA, es requereix un catió divalent ( $\text{Mg}^{2+}$ , que es pot reemplaçar per  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$ ) i un catió monovalent ( $\text{K}^+$  substituïble per  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{Cs}^+$ ) (Fukui *et al.*, 1982).

Es van assajar 1 o 2  $\mu\text{g}$  de proteïna recombinant i purificada GST-AACS en un volum final de 500  $\mu\text{L}$  de tampó d'assaig i a pH 8.4 (veure materials i mètodes secció 10).

### 3.1. Determinació de la $K_m$ per l'acetoacetat.

La constant de Michaelis-Menten per l'acetoacetat ( $K_m$ ) es va obtenir assajant la proteïna GST-AACS en presència de concentracions creixents d'acetoacetat (de 0.01 mM a 0.2 mM) i mantenint constant la concentració d'ATP (2 mM) i de CoA (0.05 mM). El temps d'assaig va ser d'1 minut.

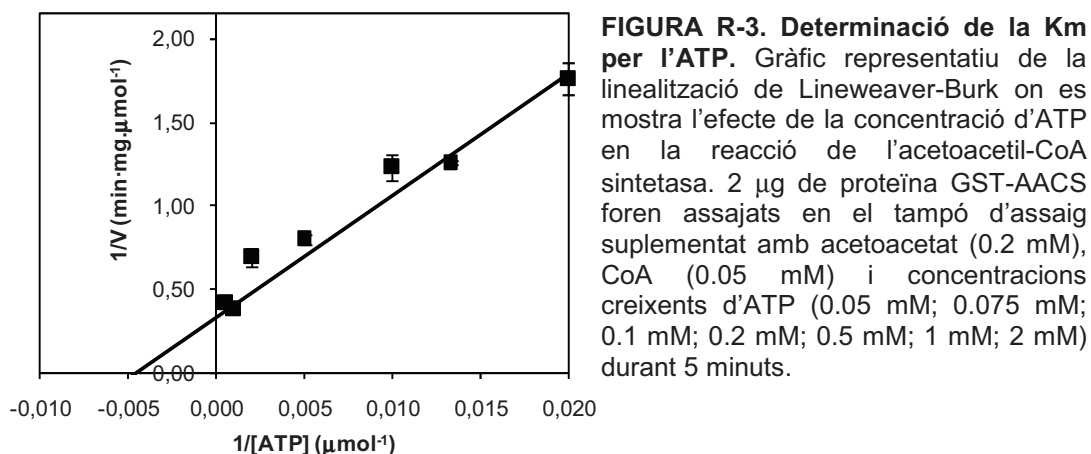


**FIGURA R-2. Determinació de la  $K_m$  per l'acetoacetat.** Gràfic representatiu de la linealització de Lineweaver-Burk on es mostra l'efecte de la concentració d'acetoacetat en la reacció de l'acetoacetil-CoA sintetasa. 2  $\mu\text{g}$  de proteïna GST-AACS foren assajats en el tampó d'assaig suplementat amb ATP (2 mM), CoA (0.05 mM) i concentracions creixents d'acetoacetat (0.01 mM; 0.02 mM; 0.03 mM; 0.04 mM; 0.05 mM; 0.1 mM; 0.2 mM) durant 1 minut.

La  $K_m$  per l'acetoacetat de la proteïna GST-AACS purificada a partir de 3 cultius diferents assajats per duplicat és de  $37.6 \mu\text{M} (\pm 6.1)$  (figura R-2).

### 3.2. Determinació de la $K_m$ per l'ATP.

La constant d'afinitat per l'ATP ( $K_m$ ) es va obtenir assajant la proteïna GST-AACS en presència de concentracions creixents d'ATP (de 0.05 mM a 2 mM) i mantenint constant la concentració d'acetoacetat (0.2 mM) i de CoA (0.05 mM). El temps d'assaig va ser de 5 minuts.



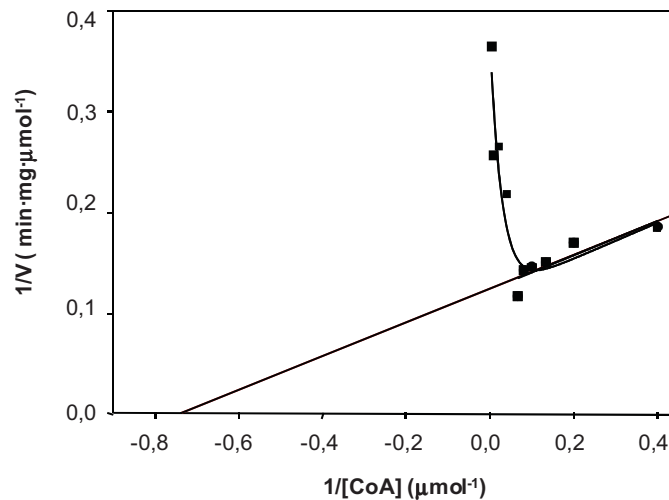
La  $K_m$  per l'ATP de la proteïna GST-AACS purificada a partir de 3 cultius diferents assajats per duplicat és de 155.24  $\mu$ M ( $\pm$  23.36) (figura R-3).

### 3.3. Determinació de la $K_m$ pel CoA.

L'enzim AACS de rata és inhibit, a nivell proteic, pel coenzim A (Ito *et al.*, 1984; Bergstrom *et al.*, 1985). Aquesta inhibició per substrat és dependent del pH de manera que elevades concentracions de CoA, desplacen el pH òptim de l'enzim cap a un pH més àcid, produint-se la supressió de l'activitat enzimàtica. L'enzim AACS purificat a partir de *Z. ramigera* no presenta inhibició per substrat, indicant que aquest mecanisme de regulació de l'activitat enzimàtica és intrínsec de mamífers (Ito *et al.*, 1987).

La constant d'afinitat pel CoA ( $K_m$ ) es va obtenir assajant la proteïna GST-AACS purificada en presència de concentracions creixents de CoA (de 0.0025 mM a 0.2 mM) i mantenint constant la concentració d'acetoacetat (0.2 mM) i d'ATP (2 mM). El temps d'assaig va ser d'1 minut.





**FIGURA R-4. Determinació de la Km pel CoA.** Gràfic representatiu on es mostra l'efecte de la concentració del CoA en la reacció de l'acetoacetil-CoA sintetasa. 1 μg de proteïna GST-AACS fou assajat en el tampó d'assaig suplementat amb acetoacetat (0.2 mM), ATP (2 mM) i concentracions creixents de CoA (0.0025 mM; 0.005 mM; 0.0075mM; 0.010 mM; 0.0125 mM; 0.015 mM; 0.025 mM; 0.050 mM; 0.1 mM; 0.2 mM) durant 1 minut. La Km pel CoA es va obtenir a partir de les concentracions de CoA de 0.0025 mM; 0.005 mM; 0.0075mM; 0.010 mM; 0.0125 mM i 0.015 mM. A concentracions superiors a 0.015 mM de CoA s'obté una corba d'inhibició pel substrat.

La Km pel CoA de la proteïna GST-AACS purificada a partir de 3 cultius diferents assajats per duplicat és de 2.3 μM (± 1.5). A concentracions superiors a 15 μM de CoA s'observa inhibició de l'activitat enzimàtica de l'AACS humana (figura R-4).

## UTILITZACIÓ DE COSSOS CETÒNICS PER A LA COLESTEROGÈNESI

Existeix nombrosa bibliografia on es mostra que el fetge (Endemann *et al.*, 1982; Geelen *et al.*, 1983; Bergstrom *et al.*, 1984) i d'altres teixits perifèrics, com ara el teixit adipós (Williamson *et al.*, 1985), el cervell (Patel *et al.*, 1977; Yeh *et al.*, 1977) i la glàndula mamària (Robinson *et al.*, 1978), tenen la capacitat d'emprar cossos cetònics com a substrats lipogènics, suggerint que l'acetoacetat podria estar actuant com un transportador d'unitats acetil des del mitocondri cap al citoplasma, de manera anàloga i alternativa al citrat produït en el mitocondri, transferit al citoplasma i escindit per l'ATP citrat liasa (Watson *et al.*, 1970).

En els treballs que fan referència al fetge, el tractament de rates o d'hepatòcits aïllats de rata amb  $[3-^{14}\text{C}]$ acetoacetat o D- $\beta$ -hidroxi $[3-^{14}\text{C}]$ butirat, i la posterior quantificació de  $^{14}\text{C}$  incorporat a àcids grassos i colesterol, reflex de la contribució de cadascun dels substrats a la biosíntesi lipídica, indiquen que a nivell hepàtic existeix una incorporació preferencial de cossos cetònics cap a la colesterogènesi.

La utilització de l'acetoacetat per a la síntesi lipídica ve mitjançada per l'activitat AACS, que activa l'acetoacetat a acetoacetil-CoA, primer intermediari citosòlic de la via del mevalonat. L'acetoacetil-CoA també pot ser escindit per acció de l'acetoacetil-CoA tiolasa donant lloc a dos molècules d'acetil-CoA que poden contribuir a la biosíntesi d'àcids grassos.

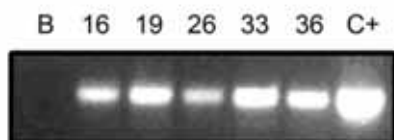
Un cop comprovat que la seqüència publicada del cDNA de l'AACS codificava per una proteïna AACS funcional, s'analitzà l'efecte de la sobreexpressió induïda d'aquesta proteïna en la biosíntesi lipídica, concretament sobre la síntesi de colesterol, en el sistema cel·lular HeLa.

#### 4. OBTENCIÓ D'UNA LÍNIA ESTABLE INDUÏBLE PER DOXICICLINA: *BD<sup>TM</sup> Tet-On Gene Expression system*.

El *BD<sup>TM</sup> Tet-On Gene Expression system* permet l'obtenció d'elevats nivells d'expressió del gen d'interès, transfectat en cèl·lules eucariotes, d'una manera regulada per l'addició de doxiciclina en el medi de cultiu (Gossen *et al.*, 1995). El sistema consta de dos elements: el plasmidi regulador pTet-On, que inclou la regió codificant de la proteïna reguladora (rTetR), i el plasmidi resposta (pTRE2Hyg) que expressa el gen d'interès sota el control de l'element de resposta a tetraciclina (TRE).

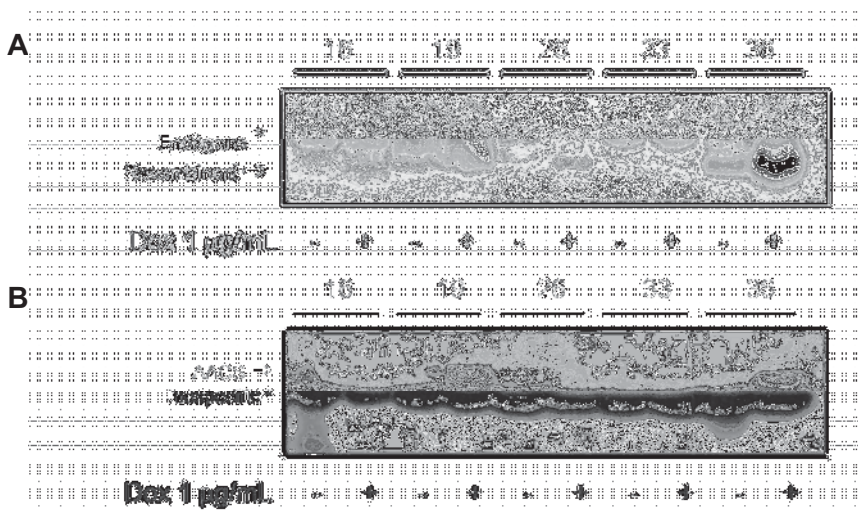
Es clonà el cDNA que codifica per a la proteïna AACS humana en el vector pTRE2Hyg (veure apèndix) i es transfectà el constructe pel mètode del fosfat càlcic, en la línia cel·lular HeLa Tet-On® (BD Biosciences), obtenint-se diferents clons de la línia cel·lular HeLa Tet-On AACS.

A continuació, es confirmà la presència del constructe pTRE2HygAACS integrat en el genoma, mitjançant la tècnica de la PCR, emprant els oligonucleòtids pTREHyg *forward* i DH 486 (figura R-5).



**FIGURA R-5. Integració del vector pTRE2HygAACS en el genoma de les cèl·lules HeLa Tet-On®.** Electroforesi en gel d'agarosa a l'1% on es mostra el producte de PCR (oligonucleòtids pTREHyg *forward* i DH 486) a partir de DNA genòmic dels clons 16, 19, 26, 33 i 36. S'emprà com a control positiu el plasmidi pTRE2HygAACS (C+) i com a negatiu H<sub>2</sub>O (B).

Per provar la funcionalitat dels diferents clons, és a dir, la sobreexpressió del gen AACS en resposta a doxiciclina, es tractaren les cèl·lules amb l'antibiòtic (1 µg/mL) durant 48 hores i s'analitzà l'expressió del gen AACS en termes d'mRNA i proteïna (figura R-6). En el panell superior (figura R-6A) s'observen dues bandes amb mobilitats electroforètiques diferents, detectades després de la hibridació amb una sonda específica contra l'AACS, que corresponen al gen endogen (3365 pb) i al recombinant (2730 pb; 2050 pb d'insert AACS + 625 pb de la cua de poli A de la β-globina). Tant per la tècnica de transferència *Northern* com per transferència *Western* s'observa una inducció del gen AACS després del tractament amb doxiciclina en els clons 19 i 36, mentre que els clons 16, 26 i 33, malgrat hagin inserit el plasmidi pTRE2HygAACS en el genoma (figura R-5), no responen a l'antibiòtic.



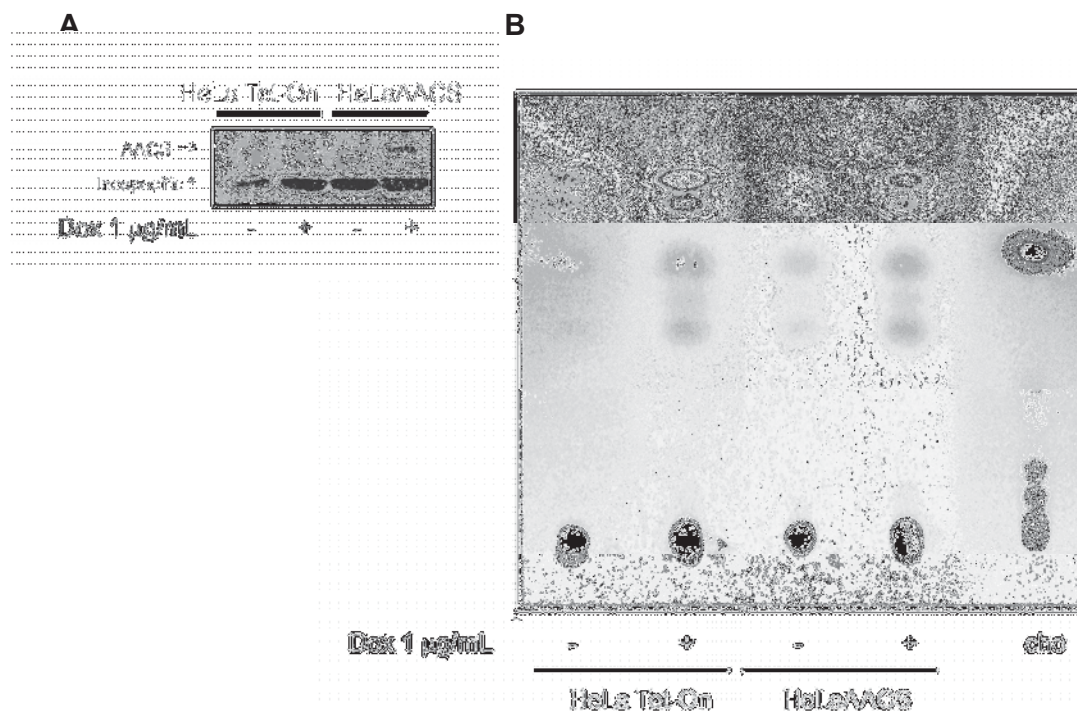
**FIGURA R-6. Anàlisi de la inducció de l'expressió gènica en la línia cel·lular HeLa Tet-On AACS.** Diferents clons de cèl·lules HeLa Tet-On AACS foren tractats amb doxiciclina (+; 1 µg/mL) o vehicle (-; DMSO) durant 48 hores. **(A)** 20 µg d'RNA total foren analitzats per transferència *Northern* emprant una sonda específica contra l'AACS. Amb asterisc s'indica l'mRNA corresponent a l'AACS endògena i amb fletxa a l'AACS recombinant. **(B)** 10 µg de proteïna total foren analitzats per transferència *Western* utilitzant un anticòs específic contra l'AACS (dilució 1:1000). Amb fletxa es mostra la banda corresponent a la proteïna AACS i amb asterisc, una banda inespecífica.

Els següents experiments de cromatografia que es presenten en el treball es dugueren a terme amb el clon 36 que s'anomenarà, d'ara en endavant, HeLaAACS.

## 5. EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIÓ DEL GEN AACS EN LA SÍNTESI D'ESTEROLS.

Per tal d'estudiar si la sobreexpressió de la proteïna AACS produïa algun efecte en la síntesi *de novo* d'esterols, cèl·lules HeLa Tet-On® i HeLaAACS, prèviament tractades o no amb doxiciclina, foren incubades durant 24 hores en 2 % de sèrum deslipoproteïnitzat i [<sup>14</sup>C]acetat. Un cop comprovat, mitjançant la tècnica de transferència *Western*, que s'havia produït la sobreexpressió de la proteïna AACS per l'addició de doxiciclina en el medi de cultiu, es sotmeteren els extractes lipídics de les cèl·lules a cromatografia en capa fina i posterior autoradiografia.

Tant en la línia cel·lular HeLa Tet-On® com en HeLaAACS, s'observa un increment de la síntesi *de novo* de colesterol després del tractament amb doxiciclina, que és independent de la sobreexpressió de la proteïna AACS (figura R-7). La major incorporació del [<sup>14</sup>C]acetat a colesterol, observada quan es tractà amb l'antibiòtic el cultiu cel·lular HeLa Tet-On®, va dificultar els posteriors estudis realitzats amb ambdues línies cel·lulars.



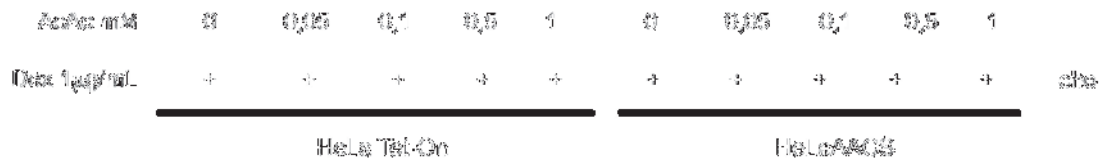
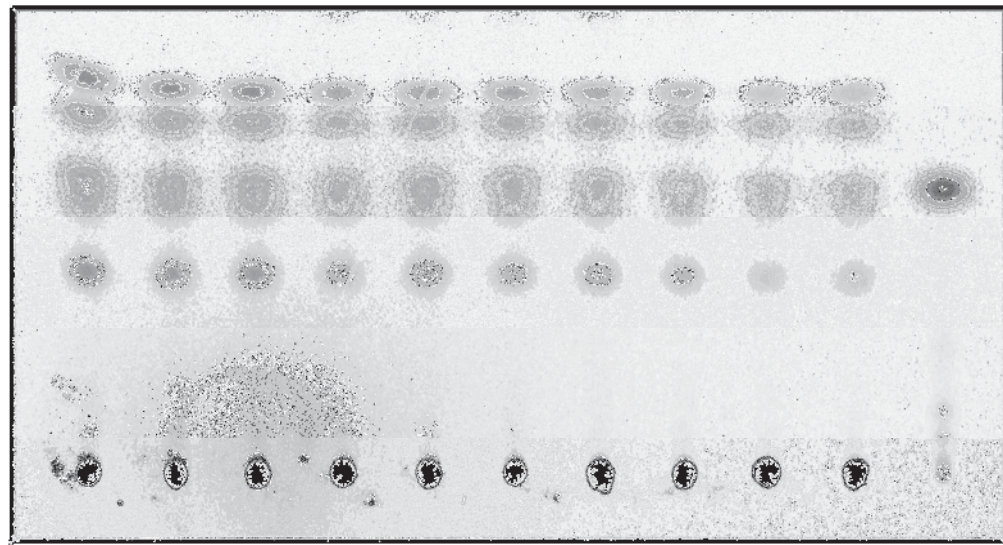
**FIGURA R-7. Efecte de la sobreexpressió de la proteïna AACS en la síntesi d'esterols.** Cèl·lules HeLa Tet-On® i HeLaAACS prèviament tractades amb doxiciclina (+; 1 µg/ mL) o vehicle (-; DMSO) durant 48 hores, foren incubades en 2 % de sèrum deslipoproteïnitzat i [<sup>14</sup>C]acetat durant 24 hores més. **(A)** Es sotmeteren 10 µg de proteïna total a *Western blot* contra l'AACS (dilució 1:1000). Amb fletxa s'indica la banda corresponent a l'AACS i amb asterisc, la banda inespecífica. **(B)** Autoradiografia corresponent a cromatografia d'extractes lipídics de cèl·lules HeLa Tet-On® i HeLaAACS. (Cho: colesterol pur marcat radioactivament, que s'emprà com a marcador; Dox: doxiciclina).

## 6. EFECTE DE L'ACETOACETAT EN LA SÍNTESI D'ESTEROLS.

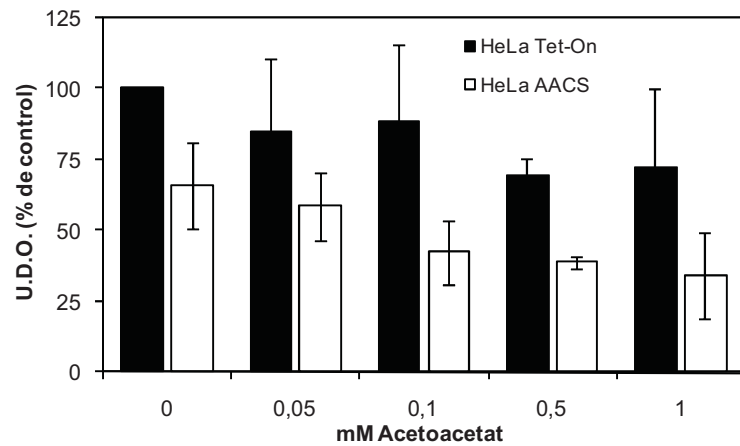
L'acetoacetat, a través de l'enzim AACS, és transformat a acetoacetil-CoA, primer intermediari citosòlic en la síntesi de mevalonat. Amb l'objectiu de comprovar si existia algun efecte en la síntesi *de novo* d'esterols pel tractament amb acetoacetat i la sobreexpressió de la proteïna AACS, cèl·lules HeLa Tet-On® i HeLaAACS, prèviament tractades amb doxiciclina durant 48 hores, foren incubades durant 24 hores més en 2 % de sèrum deslipoproteïnitzat, [<sup>14</sup>C]acetat i concentracions creixents d'acetoacetat. Després de realitzar la cromatografia en capa fina dels extractes lipídics de les cèl·lules i la corresponent autoradiografia, es quantificà la incorporació de [<sup>14</sup>C]acetat a colesterol mitjançant el programa informàtic *Image Quant TL* (figura R-8).



A



B



**FIGURA R-8. Efecte de l'acetoacetat en la síntesi d'esterols en les línies cel·lulars HeLa Tet-On® i HeLaAACS. (A)** Cromatografia representativa d'extractes lipídics de cèl·lules HeLa Tet-On® i HeLaAACS tractades amb doxiciclina (Dox; 1 µg/ mL) durant 48 hores. Passat aquest temps, les cèl·lules s'incubaren en 2 % de sèrum deslipoproteïnitzat, [<sup>14</sup>C]acetat i concentracions creixents d'acetoacetat (0; 0.05; 0.1; 0.5 i 1 mM) durant 24 hores més. Cho indica colesterol pur marcat radioactivament, que s'emprà com a marcador. **(B)** Quantificació de la radioactivitat incorporada a colesterol sintetitzat *de novo* amb el programa informàtic *Image Quant TL* (negre: HeLa Tet-On®; blanc: HeLaAACS). Es representen les unitats de densitat òptica (U.D.O.) en funció de la dosi d'acetoacetat emprada de dos experiments independents. El valor del control (no tractament) de la línia cel·lular HeLa Tet-On® es representa com al 100% i la resta com a valors relatius a aquest.

El senyal radioactiu corresponent al colesterol en la línia cel·lular HeLa Tet-On AACs, en absència de tractament amb doxiciclina, és menys intens que el observat en les mateixes condicions en cèl·lules HeLa Tet-On®. En ambdues línies cel·lulars s'observa una disminució del senyal radioactiu en afegir al medi de cultiu quantitats creixents d'acetoacetat, essent aquesta disminució superior en les cèl·lules HeLa Tet-On AACs (fins a un 50% d'inhibició pel tractament amb 1 mM d'acetoacetat).

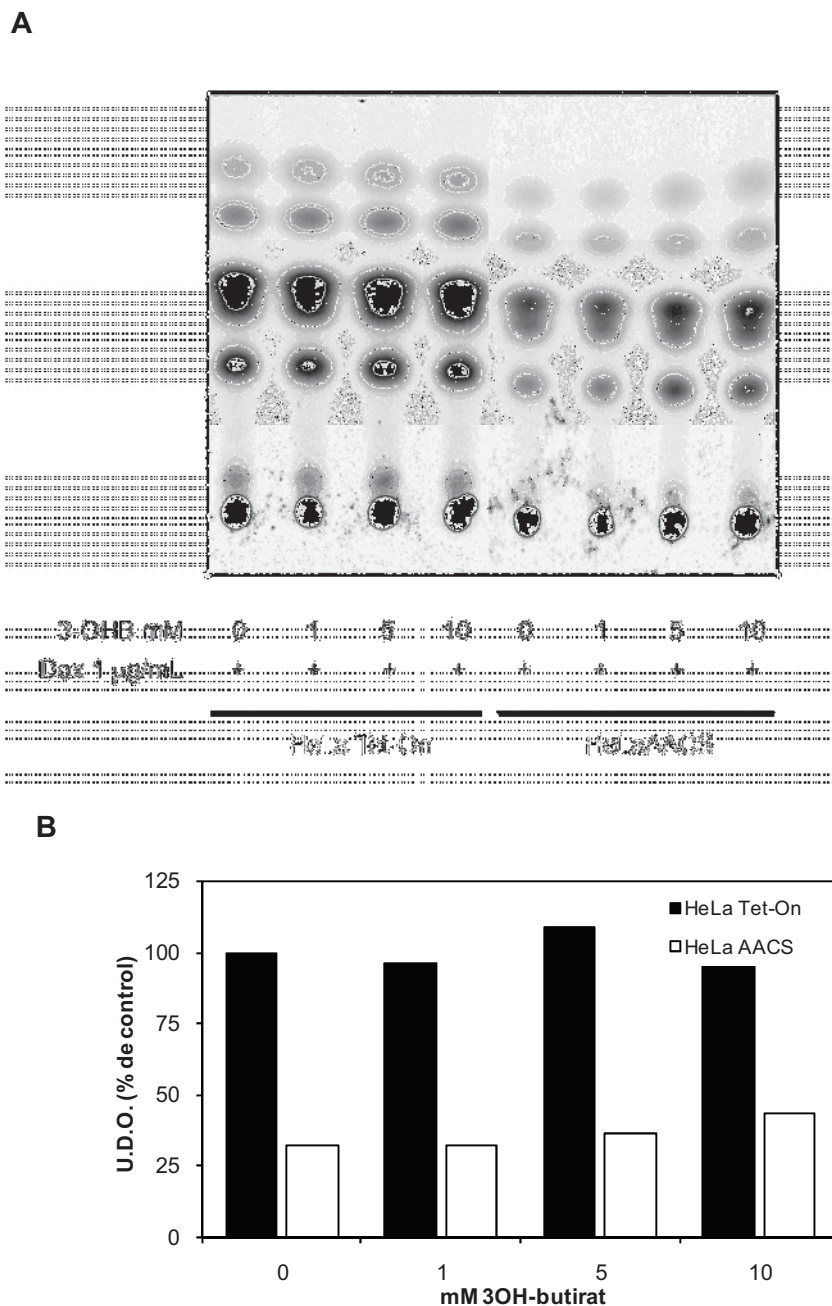
Aquest efecte podria ser degut a que l'acetoacetat no radioactiu, transformat en acetoacetyl-CoA mitjançant l'activitat AACs, està contribuint a la síntesi *de novo* de colesterol, disminuint el senyal radioactiu del colesterol per la competició amb el [<sup>14</sup>C]acetat, transformat a acetyl-CoA per l'enzim acetyl-CoA sintetasa (ACS).

## **7. EFECTE DEL 3-HIDROXIBUTIRAT EN LA SÍNTESI D'ESTEROLS.**

El 3-hidroxitirat abans de ser emprat per a la biosíntesi de lípids és transformat a acetoacetat en el mitocondri, per acció de l'enzim 3-hidroxitirat deshidrogenasa.

Per tal d'estudiar si el 3-hidroxitirat té algun efecte en la síntesi *de novo* d'esterols, cèl·lules HeLa Tet-On® i HeLaAACs, prèviament tractades amb doxiciclina durant 48 hores, foren incubades durant 24 hores més en 2 % de sèrum deslipoproteïnitatzat, [<sup>14</sup>C]acetat i concentracions creixents de 3-hidroxitirat. Després de realitzar una cromatografia en capa fina dels extractes lipídics de les cèl·lules i autoradiografia, es quantificà la incorporació de [<sup>14</sup>C]acetat a colesterol mitjançant el programa informàtic *Image Quant TL* (figura R-9).

En ambdues línies cel·lulars assajades, no s'observen canvis en la síntesi *de novo* de colesterol pel tractament amb 3-hidroxitirat (figura R-9), indicant que aquest compost no passaria a formar part de la via del mevalonat. Aquest efecte pot ser degut a la ineficiència de la línia cel·lular assajada per transformar el 3-hidroxitirat a acetoacetat.



**FIGURA R-9. Efecte del 3-hidroxi-butirat en la síntesi d'esterols en les línies cel·lulars HeLa Tet-On® i HeLaAACS. (A)** Cromatografia representativa d'extractes lipídics de cèl·lules HeLa Tet-On® i HeLaAACS tractades amb doxiciclina (Dox; 1 µg/ mL) durant 48 hores. Passat aquest temps, les cèl·lules s'incubaren en 2 % de sèrum deslipoproteïnitzat,  $[^{14}\text{C}]$ acetat i concentracions creixents de 3-hidroxi-butirat (0; 1; 5 i 10 mM) durant 24 hores més. Cho indica colesterol pur marcat radioactivament, que s'emprà com a marcador. **(B)** Quantificació de la radioactivitat incorporada a colesterol sintetitzat *de novo* mitjançant el programa informàtic *Image Quant TL* (negre: HeLa Tet-On®; blanc: HeLaAACS). Es representen les unitats de densitat òptica (U.D.O.) en funció de la dosi de 3--hidroxi-butirat emprada. El valor del control (no tractament) de la línia cel·lular HeLa Tet-On® es representa com al 100% i la resta de valors relatius a aquest.



## ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE LES PROTEÏNES AACS I HMGCS1

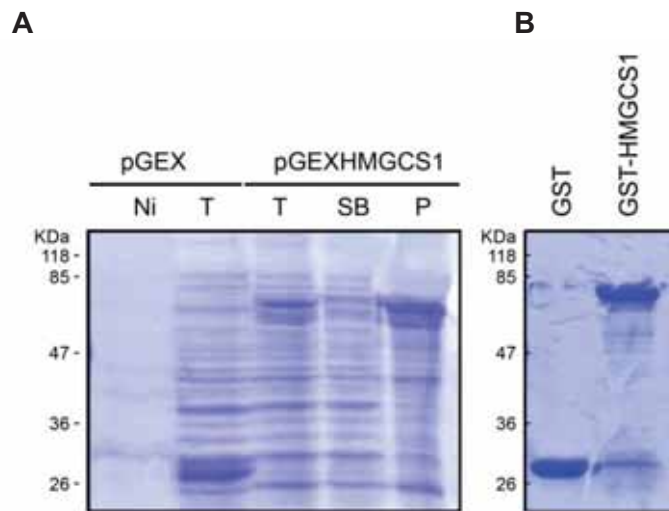
L'eficiència del flux de compostos fisiològics a través de vàries vies metabòliques ha portat a l'estudi de l'organització enzimàtica. La possible existència d'un *channeling* en les primeres etapes de la colesterogènesi ha sigut documentat en fetge i cervell de rata (Geelen *et al.*, 1983; Webber *et al.*, 1979). Això implica que l'esquelet de quatre carbonis de l'acetoacetat o bé la seva forma activa, l'acetoacetyl-CoA, no s'equilibra completament amb el *pool* de dos carbonis representat per l'acetat i l'acetyl-CoA (Miziorko *et al.*, 1990). No obstant això, no s'ha demostrat la possible associació física dels dos primers enzims de la via de la colesterogènesi: l'AACS i l'HMG-CoA sintasa citosòlica (HMGCS1).

### 8. CLONATGE DEL cDNA DEL GEN HMGCS1 DE HÀMSTER.

En el moment en que es va iniciar l'estudi de la interacció entre les proteïnes AACS i HMGCS1 no es disposava de la proteïna GST-AACS soluble però sí s'havia descrit un protocol per a l'obtenció de l'HMGCS1 recombinant (Misra *et al.*, 1993). En base a aquest treball, s'amplificà, amb els oligonucleòtids DH 839 i DH 847, el cDNA que codifica per a la proteïna HMGCS1 de hàmster a partir del plasmidi p53K-312 (Gil *et al.*, 1986) i es clonà en el vector d'expressió procariota pGEX4T3 (veure apèndix), produint-se una proteïna de fusió amb la glutatió-S-transferasa.

### 9. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA HMGCS1 DE HÀMSTER RECOMBINANT.

Es va expressar i purificar, a partir de cèl·lules bacterianes d'*E.coli* BL21, la proteïna de fusió GST-HMGCS1. Es van créixer cèl·lules bacterianes transformades fins a una O.D<sub>600</sub> de 0.6-0.9 i s'inicià la inducció de la proteïna de fusió afegint al medi IPTG 1 mM. Es recolliren les cèl·lules un cop el cultiu havia assolit una O.D<sub>600</sub> de 2.2 i es purificà la proteïna recombinant seguint el protocol descrit (Misra *et al.*, 1993). El rendiment i bon funcionament de la purificació es van comprovar per electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida de les diferents fraccions obtingudes i posterior tinció amb *Coomassie Blue* (figura R-10).



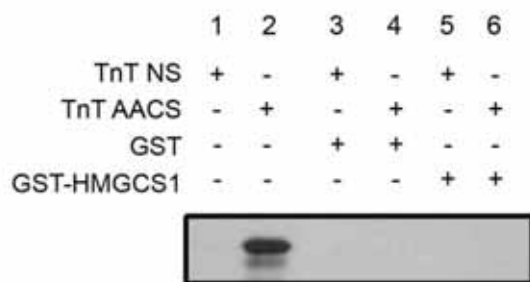
**FIGURA R-10. Expressió i purificació de l'HMGCS1 de hámster en *E.coli*.** (A) Tinció de *Coomassie* d'un gel d'SDS-poliacrilamida al 10% on s'analitzaren els extractes proteics obtinguts a partir d'un cultiu cel·lular d'*E.coli* BL21 transformat amb pGEX o amb pGEX4T3HMGCS1 (Ni= no induït; T= extracte proteic total induït; SB= sobrenedant; P= *pellet*). Es carregaren 10 µg de proteïna en cada carril. (B) Tinció de *Coomassie* d'un gel d'SDS-poliacrilamida al 10% on es carregaren 10 µg de proteïnes GST i GST-HMGCS1 un cop purificades i dialitzades.

Malgrat que la majoria de la proteïna induïda es localitzà en la fracció insoluble o sediment (figura R-10A), incrementant el volum del cultiu procariota es va obtenir una proteïna HMGCS1 recombinant soluble (figura R-10B)

Aquesta proteïna correspon a l'HMGCS1 baix dos criteris: 1) Presenta el pes molecular esperat (79 kDa; 53 kDa de la proteïna HMGCS1 i 26 kDa de la glutatió S-transferasa); 2) S'indueix per IPTG.

## 10. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ DIRECTA ENTRE LES PROTEÏNES AACCS I HMGCS1.

Amb l'objectiu de comprovar si les proteïnes AACCS i HMGCS1 podien interaccionar físicament es realitzaren experiments de GST *pull-down* (materials i mètodes secció 12) amb la proteïna de fusió GST-HMGCS1 purificada d'un cultiu d'*E.coli* BL21 i la proteïna AACCS humana transcrita i traduïda *in vitro* (*TnT*).



**FIGURA R-11. L'HMGCS1 no interacciona amb la proteïna AACS traduïda i transcrita *in vitro*.** Assaig de GST *pull-down* en el que s'incubaren 10 µg de proteïnes GST (carrils 3 i 4) o GST-HMGCS1 (carrils 5 i 6) amb *TnT* de l'AACS humana (carrils 2, 4 i 6) o de pcDNA3 (NS; carrils 1, 3 i 5) marcats amb <sup>35</sup>S. Després de 4 hores de incubació a 4°C i la purificació amb sefarosa, es va resoldre l'assaig en un gel d' SDS-poliacrilamida al 10 % i es revelà per fluorografia. Els carrils 1 i 2 representen el 10 % del volum del *TnT* de pcDNA3 i AACS, respectivament, emprats en l'assaig.

Sota les nostres condicions experimentals, l'HMGCS1 no interacciona directament amb la proteïna AACS traduïda i transcrita *in vitro* (figura R-11).

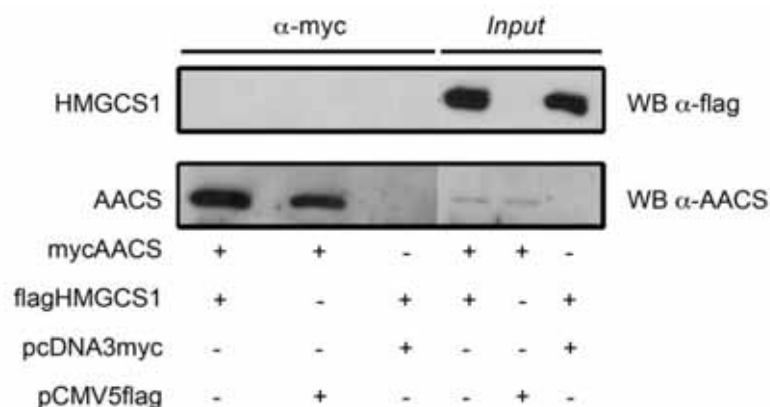
## 11. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ A TRAVÉS D'UN COMPLEX MULTIPROTEIC.

Donat que no es va poder demostrar una interacció física directa entre l'AACS i l'HMGCS1 ens vam plantejar la hipòtesi que ambdues proteïnes poguessin estar formant part d'un complex multiproteic. Per tal de comprovar aquesta possibilitat es dugueren a terme experiments de coimmunoprecipitació de proteïnes en la línia cel·lular HeLa.

S'amplificà el cDNA que codifica per la proteïna HMGCS1 humana (NM\_001098272; oligonucleòtids DH 1025 i DH 1026) a partir de DNA genòmic de cèl·lules HepG2 i es clonà en el vector d'expressió pCMV5*flag*, produint-se una proteïna de fusió amb l'etiqueta *flag*. Per altra banda, tal i com es detalla en l'apèndix, a partir de la construcció pGEX4T3AACS, s'etiquetà el cDNA que codifica per la proteïna AACS humana amb la proteïna myc, mitjançant el subclonatge en el vector d'expressió pcDNA3myc.

Es cotransfectaren ambdues construccions, juntament amb una combinació de vectors buits emprats com a controls, en la línia cel·lular HeLa. Després de 12 hores de transfecció, es substituï el medi de cultiu per un medi lliure d'esterols (DMEM + sèrum deficient en lipoproteïnes + 10 µM de pravastatina) per tal de promoure la colesterogènesi i, per tant, la formació del hipotètic complex multiproteic. Passades 24 hores del canvi de medi es duqué a terme la immunoprecipitació amb un anticòs específic contra myc i el posterior *Western blot* utilitzant un anticòs específic contra

l'etiqueta *flag* (per revelar la presència de proteïna HMGCS1 en els immunoprecipitats) o contra la pròpia proteïna AACS (control de la immunoprecipitació).



**FIGURA R-12. La proteïna HMGCS1 no coimmunoprecipita amb la proteïna AACS.** Es cotransfectaren cèl·lules HeLa amb 6 µg dels plasmidis mycAACS i *flagHMGCS1* o bé amb una combinació d'aquests i els plasmidis buits pcDNA3myc o pCMV5*flag* així com s'indica. 500 µg d'extracte proteic foren immunoprecipitats amb 130 µg d'anticòs contra myc (α-myc). Es carregà la meitat del immunoprecipitat per a la detecció amb l'anticòs contra *flag* (1:5000) i l'altra meitat per a la detecció amb anticòs contra la proteïna AACS (1:1000). En ambdós casos es carregà un 1% de l'*input* (2.5 µg).

Quan es transfectaren les cèl·lules HeLa amb la construcció pcDNA3mycAACS i es dugué a terme la immunoprecipitació amb l'anticòs contra myc, es va enriquir la quantitat de proteïna AACS en el immunoprecipitat (figura R-12, panell inferior: WB α-AACS). No obstant això, l'HMGCS1 no va coimmunoprecipitar amb l'AACS (figura R-12, panell superior: WB α-*flag*), indicant que ambdues proteïnes no estarien formant part d'un mateix complex multiproteic o dit complex seria inestable i es desfaria en les condicions d'assaig descrites.

Per tal d'incrementar l'estabilitat del complex, s'incubaren cèl·lules HeLa transfectades amb les construccions pcDNA3mycAACS i pCMVHMGCS1*flag* en presència del *crosslinker* Di-(N-succinimidil) glutarat, que reaccionant amb amines primàries, permet la unió covalent de proteïnes a pH fisiològic. Es realitzà el mateix procediment experimental que el descrit anteriorment i s'obtingueren els mateixos resultat que en absència del *crosslinker* (resultats no mostrats).

Aquests experiments mostren que ambdues proteïnes, AACS i HMGCS1, no interaccionen ni *in vitro* ni *in vivo*, de manera que l'ús preferencial dels cossos cetònics cap a la síntesi de colesterol, sota les nostres condicions experimentals, no pot atribuir-se a l'existència d'un *channeling* en les primeres etapes de la colesterogènesi.

## ACETILACIÓ REVERSIBLE DE LISINES

L'acetilació reversible de lisines és una modificació posttraduccional molt regulada, que és controlada per proteïnes desacetilases (HDACs) i acetiltransferases (HAT). Encara que la importància de l'acetilació reversible de lisines en histones (Vidali *et al.*, 1968; Grunstein, 1997) i d'altres proteïnes nuclears està ben estudiada (revisat per Kouzarides, 2000; Yang, 2004a/b) el paper de la modificació proteica en el citosol roman desconegut.

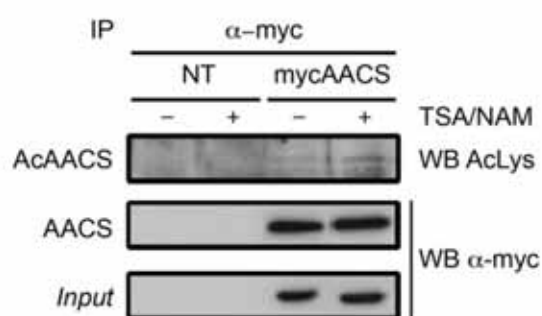
Generalment, l'acetilació afecta a la unió de proteïnes al DNA, a les interaccions proteïna-proteïna, a l'estabilització proteica, a la localització cel·lular i a l'activitat enzimàtica (Carron *et al.*, 2003; Hallows *et al.*, 2006; Schwer *et al.*, 2006). A més, l'acetilació de lisines està íntimament relacionada amb l'envelliment i diferents processos patològics com ara el càncer, els desordres neurodegeneratius i les malalties cardiovasculars (Blander *et al.*, 2004; Carrozza *et al.*, 2003; McKinsey *et al.*, 2004; Yang, 2004a/b). En particular, l'acetilació té el potencial d'estar connectada amb la restricció calòrica i la longevitat, ja que l'activitat de Sirt1, l'ortòleg en mamífers de la desacetilasa de llevats Sir2, és modulada per restricció calòrica (Imai *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2004).

Aquesta diversitat en funcions fisiològiques i cel·lulars implica l'existència d'un gran ventall de proteïnes com a possibles substrats d'acetilació de lisines (Kim *et al.*, 2006).

## 12. ESTUDI DE L'ACETILACIÓ DE LA PROTEÏNA AACS HUMANA.

La tricostatina A (TSA) és un àcid hidroxàmic, producte de la fermentació d'*Streptomyces*, que bloqueja l'accés al centre actiu de les HDAC de classe I i II, inhibint la seva activitat a concentracions de l'ordre de nanomolar (Yoshida *et al.*, 1990). Per altra banda, la nicotinamida (NAM), producte de la reacció de desacetilació catalitzada per les desacetilases dependents de NAD<sup>+</sup>, és un inhibidor d'aquestes proteïnes (revisat per Blander *et al.*, 2004).

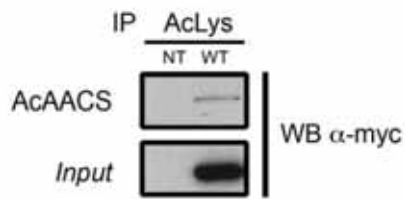
Per provar si l'enzim AACS humà és diana de proteïnes acetiltransferases, es dugueren a terme experiments d'immunoprecipitació en la línia cel·lular HeLa, transfectada de manera transitòria amb la construcció pcDNA3mycAACS, per al posterior anàlisi de l'estat d'acetilació de la proteïna mitjançant transferència *Western* amb anticossos específics contra acetil-Lys. 12 hores després de la transfecció, es tractaren les cèl·lules amb inhibidors de proteïnes desacetilases (NAM i TSA) o vehicle (DMSO) i 24 hores després dels tractaments es dugué a terme la immunoprecipitació de la proteïna AACS humana amb un anticòs específic contra myc, en un tampó suplementat amb els anomenats inhibidors (5  $\mu$ M TSA i 10 mM NAM) així com es detalla en els materials i mètodes (secció 7.6).



**FIGURA R-13. L'enzim AACS humà s'acetila *in vivo*.** Cèl·lules HeLa foren transfectades amb 10  $\mu$ g de la construcció mycAACS. 12 hores després de la transfecció es mantingueren les cèl·lules en absència (-) o presència (+) de TSA (0.3  $\mu$ M) i NAM (10 mM) durant 24 hores. S'immunoprecipitaren 500  $\mu$ g d'extracte proteic amb 130  $\mu$ g d'anticòs contra myc ( $\alpha$ -myc) durant tota la nit. Es dividí la meitat del immunoprecipitat per a la detecció amb l'anticòs contra myc (1:200), on es carregà un 1% de l'*input* (2.5  $\mu$ g), i l'altra meitat, per a la detecció amb l'anticòs contra acetil-Lys (AcLys; 1:1000). S'empraren cèl·lules HeLa no transfectades (NT; panell esquerra) com a control negatiu.

A la figura R-13 es mostra que l'enzim AACS humà s'acetila *in vivo*, ja que l'acetilació basal en la immunoprecipitació de la proteïna AACS, en absència del tractament amb TSA i NAM, és promoguda pel tractament amb els inhibidors de proteïnes desacetilases (panell superior). En els dos panells inferiors de la figura R-13 es mostren el *Western blot* control de la immunoprecipitació i els *inputs* de la mateixa.

Degut a la dificultat que suposa treballar amb anticossos contra acetyl-Lys comercials, obtinguts contra una cua de poli-Lys acetilades (i no específics per a la proteïna AACS acetilada) es realitzà el mateix experiment descrit anteriorment però a la inversa. Així, s'immunoprecipità la proteïna AACS, expressada de manera transitòria, amb anticossos contra Ac-Lys i s'analitzà la presència de la proteïna AACS en el immunoprecipitat, mitjançant transferència *Western* amb anticossos específics contra l'etiqueta myc (figura R-14).



**FIGURA R-14. L'enzim AACS humà s'acetila *in vivo* (II).** Es transfectaren cèl·lules HeLa amb 10 µg de la construcció pcDNA3mycAACS. S'empraren cèl·lules HeLa no transfectades (NT) com a control negatiu. 12 hores després de la transfecció es tractaren les cèl·lules amb TSA (0.3 µM) i NAM (10 mM) durant 24 hores. 1 mg d'extracte proteic fou immunoprecipitat amb 12.5 µg d'anticòs contra acetil-lisina (AcLys) i es duagué a terme la detecció per *Western blot* amb l'anticòs contra myc (1:200). Es carregà un 1% de l'*input* (10 µg).

El resultat obtingut confirma que l'enzim AACS humà s'acetila *in vivo* ja que és detectat en experiments de transferència *Western* contra myc després de la immunoprecipitació amb anticossos contra acetil-Lys (figura R-14).

### 13. IDENTIFICACIÓ DE LA Lys633 DE L'ENZIM AACS HUMÀ COM A PUTATIU LLOC D'ACETILACIÓ.

En el centre actiu de la família de proteïnes acil:CoA ligasa, *formador d'AMP*, existeix un motiu conservat PX4GK on s'hi localitza un residu de Lys identificat com a putatiu substrat d'acetilació (Starai *et al.*, 2002) (figura R-15).

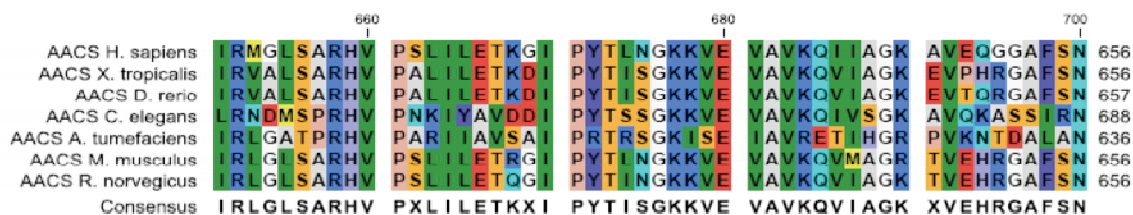
Acs	600	D	S	L	P	K	T	R	S	G	K	I	M	R	612
PrpE	583	S	Q	L	P	K	T	R	S	G	K	M	L	R	595
Acs2p	628	R	D	L	P	R	T	R	S	G	K	I	M	R	640
luciferase	520	D	E	V	P	K	G	L	T	G	K	L	D	A	532
GrsA	508	D	K	M	P	L	T	S	N	G	K	I	D	R	520
CepA A1	470	D	A	L	P	L	T	A	N	G	K	V	D	R	482
CepA A2	1490	D	A	L	P	L	T	A	H	G	K	I	D	R	1502
CepA A3	3022	D	A	L	P	L	T	T	N	G	K	V	D	R	3034

**FIGURA R-15. Motiu conservat que conté el residu de Lys acetilable en membres representatius de la família de proteïnes acil:CoA ligasa, *formador d'AMP* (adaptat de Starai *et al.*, 2002).** Acs, acetil-CoA sintetasa (gi:16767525, *S. enterica*); PrpE, propionil-CoA sintetasa (gi: 14917034, *S. enterica*); Acs2p, acetil-CoA sintetasa (gi: 6323182, *Saccharomyces cerevisiae*); luciferasa (gi:126635337, *P. Pyralis*); GrsA, gramicidin S sintetasa I (gi: 3334467, *Brevibacillus brevis*), CepA, una de les tres subunitats que sintetitzen cloroeremomicina (*European Molecular Biology Laboratory* nombres X98690 i S46968; gi: 7522085, *Amycolotopsis orientalis*).

La Lys609 de l'Acs (Starai *et al.*, 2002), la Lys592 de la propionil-CoA sintetasa (Horswill *et al.*, 2002), la Lys529 de la luciferasa (Lee *et al.*, 1981; Branchini *et al.*, 2000) i la Lys517 de la gramicidina sintetasa 1 (Conti *et al.*, 1997), són essencials per a l'activitat catalítica d'aquests enzims.

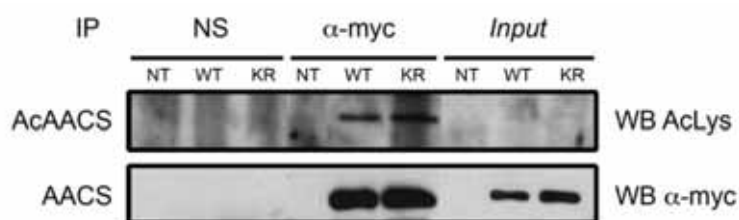


El motiu PX4GK és present en la proteïna AACS humana i es troba conservat al llarg de l'evolució (figura R-16):



**FIGURA R-16. El motiu PX4GK de l'AACS es troba conservat entre les diferents espècies.** Alineament de seqüències múltiple del motiu PX4GK (subratllat) de l'acetoacetil-CoA sintetasa de diferents espècies (*CLC Sequence Viewer* 4.6.1.). Es marca el putatiu lloc d'acetilació amb una fletxa. *Homo sapiens* (gi:74750446); *Xenopus tropicalis* (gi:123892212); *Danio rerio* (gi:166198270); *Caenorhabditis elegans* (sur-5; gi:74965144); *Agrobacterium tumefaciens* (gi:15159138), *Mus musculus* (gi:81904891); *Rattus norvegicus* (gi:81906806).

Per tal d'estudiar si el residu Lys633 era un substrat d'acetilació de la proteïna AACS humana es mutà aquest residu, mitjançant mutagènesi dirigida (oligonucleòtids KR-AACS-F i KR-AACS-R), a arginina (R, que posseeix una cadena lateral carregada positivament mimetitzant així un residu de Lys no acetilat) i es realitzà la mateixa aproximació experimental que en l'apartat anterior.



**FIGURA R-17. El residu Lys633 de la proteïna AACS humana no s'acetila *in vivo*.** Cèl·lules HeLa foren transfectades o no (NT) amb 10 µg de la construcció mycAACS *wild type* (WT) o amb la construcció que conté la Lys633 mutada a Arg (KR). 12 hores després de la transfecció es tractaren les cèl·lules amb TSA (0.3 µM) i NAM (10 mM) durant 24 hores. 500 µg d'extracte proteic foren immunoprecipitats amb 130 µg d'anticòs contra myc (α-myc) o contra HA (NS) durant tota la nit. En el panell superior es mostra la immunodetecció amb l'anticòs contra acetil-Lys (1:1000) i en l'inferior, contra myc (1:200). Es carregà un 1% de l'*input* (2.5 µg).

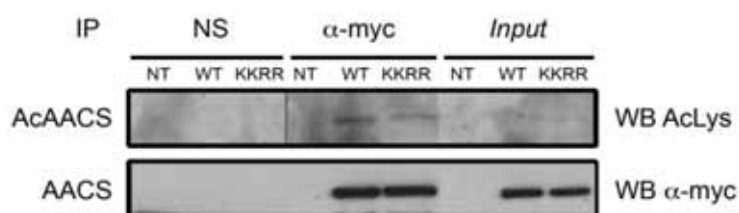
En el *Western blot* contra acetil-Lys realitzat sobre els extractes immunoprecipitats amb myc no s'observa una reducció de l'acetilació en la construcció mycAACSKR comparat amb la construcció *wild type* (figura R-17; panell superior). Aquest resultat indica que el residu de Lys633 de l'enzim AACS humà, malgrat es trobi dins d'un motiu conservat en les proteïnes de la família acil:CoA ligasa, *formador d'AMP*, no és diana de proteïnes acetiltransferases.



## 14. ALTRES PUTATIUS LLOCS D'ACETILACIÓ EN LA PROTEÏNA AACS HUMANA.

Dels 41 residus de Lys presents en la seqüència aminoacídica corresponent a la proteïna AACS humana, 19 d'ells estan predits com a putatius llocs d'acetilació pel programa informàtic PAIL (sigles corresponents a l'anglès *Prediction of Acetylation on Internal Lysines*) disponible en <http://bioinformatics.lcd-ustc.org/pail> (Liu *et al.*, 2007).

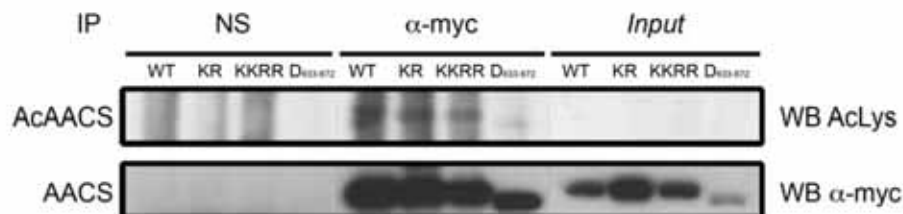
El residu Lys634 de la proteïna AACS humana, també conservat entre les diferents espècies (figura R-16), és un dels predits com a putatiu lloc d'acetilació de manera que sobre la construcció mycAACS<sub>KR</sub>, on s'havia mutat la Lys633, es mutà la Lys634 a Arg (oligonucleòtids KKRR-AACS-F i KKRR-AACS-R), obtenint-se la construcció mycAACS<sub>KKRR</sub>. Amb la construcció mycAACS<sub>KKRR</sub> es duagué a terme la mateixa aproximació que en l'apartat 12 d'aquest bloc de resultats.



**FIGURA R-18. El residu Lys634 de l'enzim AACS humà s'acetila *in vivo*.** Cèl·lules HeLa foren transfectades o no (NT) amb 10 µg de la construcció mycAACS *wild type* (WT) o amb la construcció que conté les Lys633 i Lys634 mutades a Arg (KKRR). 12 hores després de la transfecció es tractaren les cèl·lules amb TSA (0.3 µM) i NAM (10 mM) durant 24 hores. 500 µg d'extracte proteic foren immunoprecipitats amb 130 µg d'anticòs contra myc (α-myc) o contra HA (NS) durant tota la nit. Es dividí la meitat del immunoprecipitat per a la detecció amb l'anticòs contra myc (1:200) i l'altra meitat, contra acetil-Lys (1:1000). Es carregà un 1% de l'*input* (2.5 µg).

A la figura R-18 s'observa una reducció de l'acetilació en la construcció mycAACS<sub>KKRR</sub> comparat amb la construcció *wild type* (panell superior) de manera que la Lys634 de l'enzim AACS és diana de proteïnes acetiltransferases. No obstant això, no es produeix una abolició total de l'acetilació, suggerint que existeixen múltiples residus de Lys susceptibles de ser acetilats en la proteïna AACS humana.

A continuació, amb la finalitat d'eliminar altres putatius llocs d'acetilació predits pel programa informàtic PAIL, es duagué a terme una deleció de la regió COOH-terminal de l'enzim AACS humà (de l'aminoàcid 633 al 672) i s'assajà així com s'ha descrit anteriorment.



**FIGURA R-19. L'extrem COOH-terminal de l'enzim AACS humà és diana de proteïnes acetil transferases.** Cèl·lules HeLa foren transfectades amb 10  $\mu$ g de les construccions mycAACS *wild type* (WT), la construcció que conté la Lys633 mutada a Arg (KR), la construcció que conté les Lys633 i Lys634 mutades a Arg (KKRR) i la construcció mycAACS amb l'extrem COOH-terminal deletionat (D<sub>633-672</sub>). 12 hores després de la transfecció es tractaren les cèl·lules amb TSA (0.3  $\mu$ M) i NAM (10 mM) durant 24 hores. 500  $\mu$ g d'extracte proteic foren immunoprecipitats amb 130  $\mu$ g d'anticòs contra myc ( $\alpha$ -myc) o contra HA (NS) durant tota la nit. En el panell superior es mostra la immunodetecció amb l'anticòs contra acetil-Lys (1:1000) i, en el inferior, amb l'anticòs contra myc (1:200). Es carregà un 1% de l'*input* (2.5  $\mu$ g).

A la figura R-19 (panell superior) s'observa una reducció superior de l'acetilació en la construcció mycAACSD<sub>633-672</sub> comparat amb la construcció mycAACSKKRR. Així, malgrat no s'hagi aconseguit l'obtenció d'una construcció no acetilable, es pot concloure que l'enzim AACS posseeix múltiples llocs d'acetilació, essent l'extrem COOH-terminal de la proteïna determinant per a que es doni aquesta modificació posttraduccional.

**REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS  
HUMÀ**



# CLONATGE I CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN AACS HUMÀ

## 1. CLONATGE DEL PROMOTOR DEL GEN AACS HUMÀ.

En el moment d'iniciar el present treball no existia bibliografia de l'acetoacetyl-CoA sintetasa relacionada amb la regulació transcripcional.

Per tal d'estudiar la regulació de l'expressió del gen AACS humà es clonà la regió promotora en el vector pGL3basic, que conté el gen reporter de la luciferasa de la cuca de llum. Així mateix, es generaren varis constructes amb diferents versions del mateix promotor que permetessin la caracterització d'aquesta regió del gen.

S'analitzà la seqüència genòmica corrent amunt del cDNA humà descrit i s'amplificaren 1500 pb, just abans de l'inici de traducció per tal d'evitar la formació d'una proteïna quimèrica (oligonucleòtids DH781bis i DH782). Posteriorment, es clonà el fragment amplificat en el vector reporter pGL3basic, obtenint-se la construcció p-1425 (-1425/+79 respecte a l'*Inr* consens) i es comprovà que la seqüència clonada coincidia amb la seqüència publicada en el *GenBank*. A partir d'aquest constructe es generaren delecions de l'extrem 5' (veure apèndix), obtenint-se les construccions reporteress p-1034 (-1034/+79), p-809 (-809/+79) i p-291 (-291/+79).

Aquesta seqüència genòmica va ser analitzada amb el *software* PROSCAN (versió 1.7), (<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/>) que hi prediu un possible promotor entre les posicions -345/+15, i amb el programa informàtic *TFSearch* (versió 1.3) ([www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)), que localitza dos putatius elements de resposta a SREBP, un DR4, un RORE, una E box i cinc caixes GC, que han sigut estudiats en el present treball. Finalment, l'anàlisi amb el programa informàtic *BLAST* de l'NCBI revelà la presència de dues seqüències *Alu* en el promotor del gen AACS humà (figura R-20).

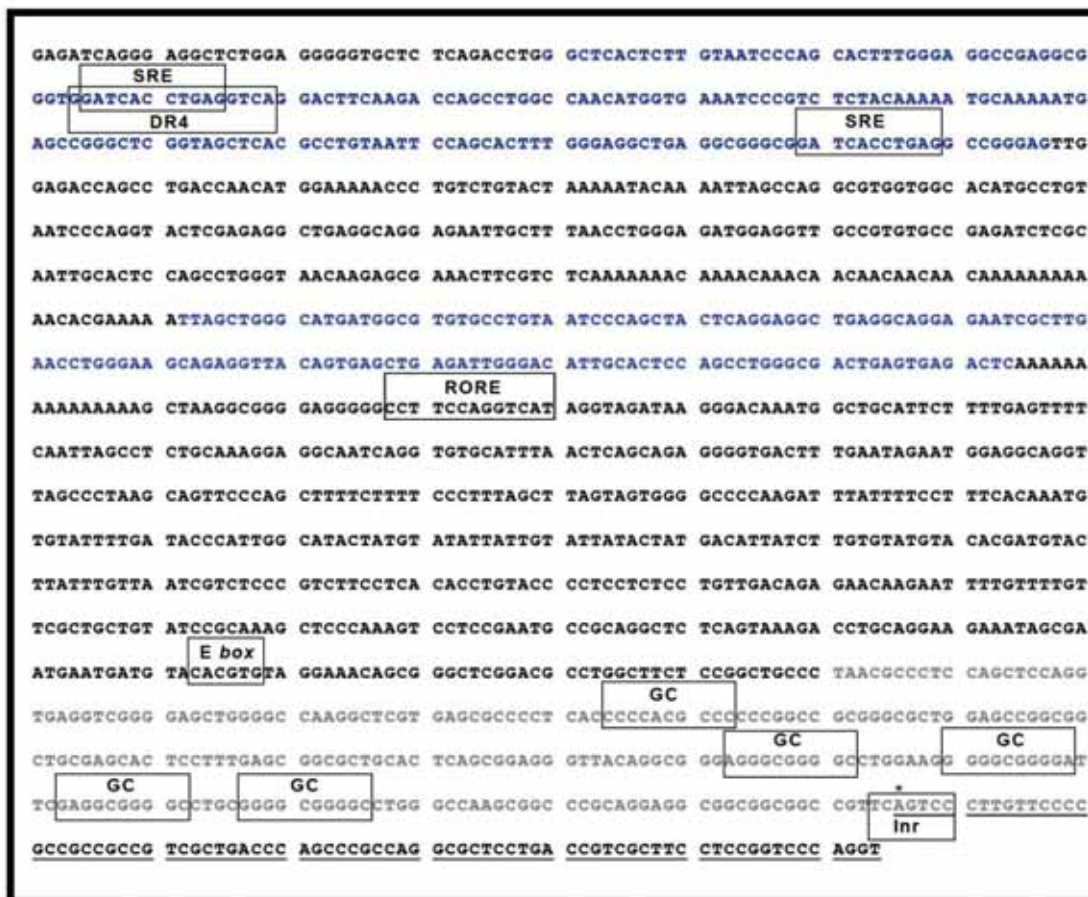
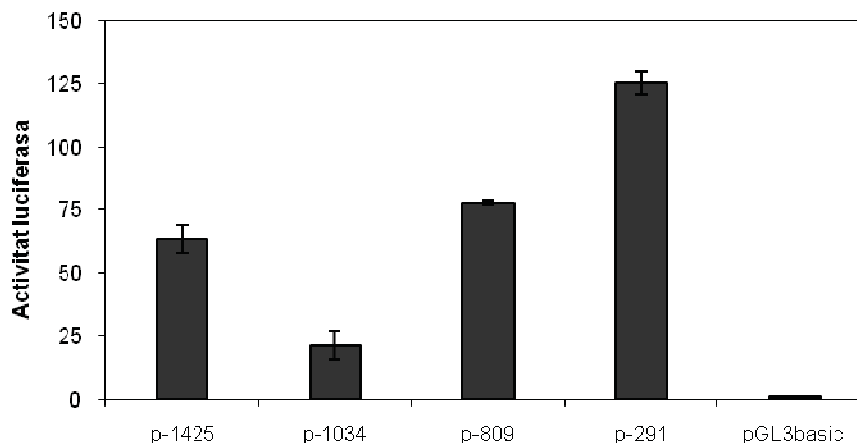


FIGURA R-20. Seqüència del promotor i extrem 5' del cDNA del gen ACS humà. Detall de la seqüència genòmica clonada (-1425/+79) a partir de DNA genòmic per PCR amb els oligonucleòtids DH781bis i DH782. S'hi detallen el promotor (gris) i dues seqüències *Alu* (blau) predits *in silico*, els dos SREs, el DR4 (putatiu LXRE), el RORE, la *E box* i l'*Inr* (enquadrats) localitzats segons la correspondència amb els consensos, el cDNA (subratllat) i el possible inici de transcripció (asterisc).

## 2. ACTIVITAT DEL PROMOTOR DEL GEN ACS HUMÀ.

Per tal de comprovar si el promotor predit *in silico* mostrava activitat, es van realitzar experiments de transfecció transitòria de les construccions p-1425, p-1034, p-809, p-291 i pGL3basic en la línia cel·lular HepG2.



**FIGURA R-21. Activitat basal del promotor del gen AACS humà.** Transfecció transitòria de la línia cel·lular HepG2 amb les construccions p-1425 (-1425/+79), p-1034 (-1034/+79), p-809 (-809/+79), p-291 (-291/+79) i pGL3basic. Es mostren els valors de luciferasa relatius a pGL3basic i normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments ± desviació estàndard).

Les construccions p-1425, p-1034, p-809 i p-291 mostren activitats relatives a pGL3basic de  $63.62 \pm 5.4$ ,  $21.20 \pm 5.46$ ,  $77.75 \pm 0.87$  i  $125.22 \pm 4.37$  respectivament (figura R-21).

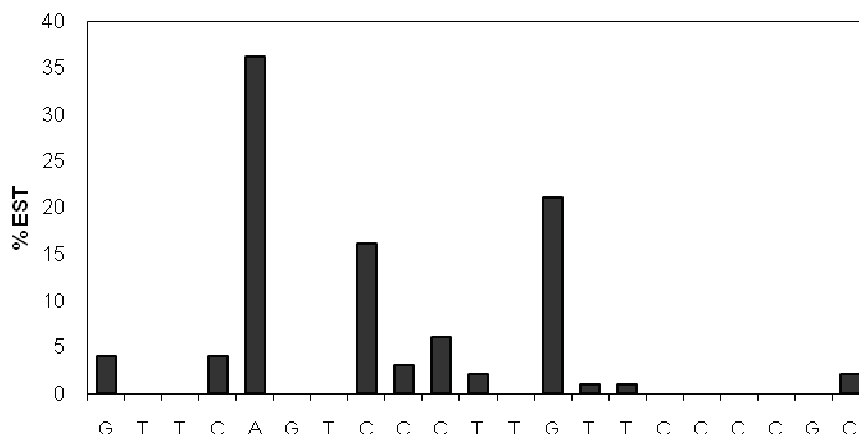
### 3. IDENTIFICACIÓ DE L'EXTREM 5' DE L'mRNA DE L'AACS HUMANA.

Una marca de seqüència expressada, també anomenada EST (acrònim de l'anglès *expressed sequence tag*), és un petit fragment de nucleòtids transcrit i processat, ja sigui un transcrit codificador de proteïna o no (revisat per Nagaraj *et al.*, 2007).

Les ESTs s'obtenen per un procés de seqüenciació a l'engròs de llibreries de cDNA. La seqüència resultant és un fragment d'entre 200 i 800 nucleòtids i de relativa baixa qualitat, però que dona molta informació sobre les regions transcripcionalment actives de qualsevol organisme.

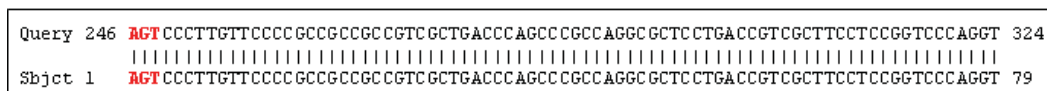
Les ESTs constitueixen una eina fonamental en el descobriment de nous gens i en la determinació de seqüències gèniques. La seqüenciació d'ESTs ha augmentat ràpidament en els últims anys, i actualment hi ha més de 50 milions d'ESTs descrites i disponibles a les bases de dades públiques.

En el present treball es realitzà un alineament de la seqüència promotora del gen AACS humà clonada en el laboratori amb les diferents EST disponibles a la base de dades del *GenBank*.



**FIGURA R-22. Percentatge d'ESTs que alineen amb una posició determinada del promotor de l'AACS.** Es mostra el percentatge d'ESTs de la base de dades del *GenBank* i la seqüència del promotor del gen AACS amb les que alineen.

Com s'observa a la figura R-22 la majoria (36%) de les ESTs disponibles a la base de dades del *GenBank* localitzen l'inici de transcripció del gen AACS humà en el nucleòtid A, inclòs dins de la seqüència (YYA<sub>+1</sub>NWYY) consens per a un *Inr*. A continuació es mostra en detall l'alineament majoritari obtingut:



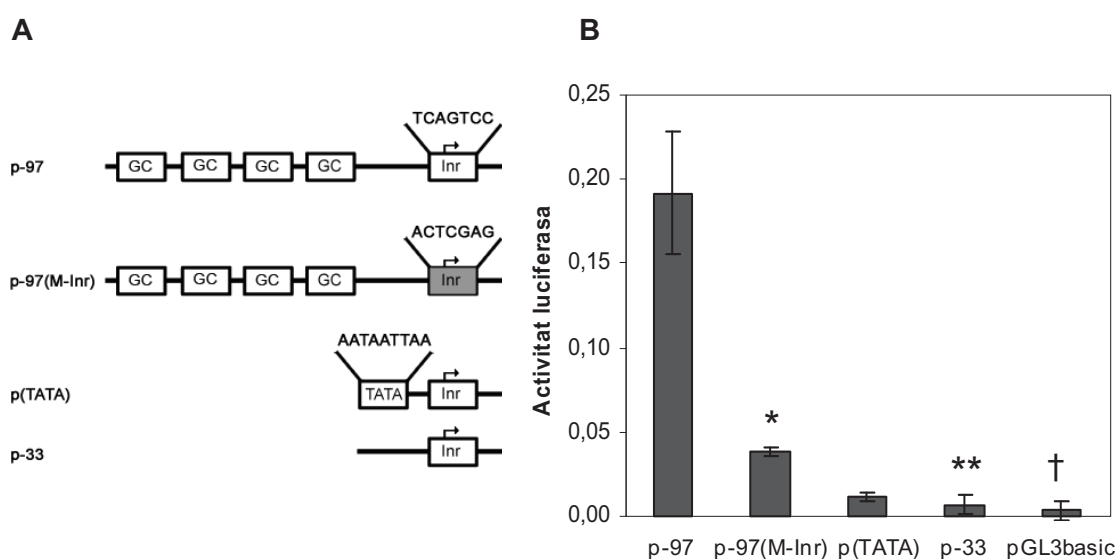
**FIGURA R-23. Alineament majoritari obtingut entre la seqüència promotora clonada i EST.** *Query* i *Sbjct* indiquen la seqüència promotora introduïda i l'EST de la base de dades del *GenBank*, respectivament.

#### 4. DESCRIPCIÓ DELS ELEMENTS NECESSARIS PER A L'ACTIVITAT BASAL DEL PROMOTOR AACS HUMÀ.

La transcripció gènica en eucariotes és controlada per múltiples factors, que inclouen descondensació del *locus*, remodelació de nucleosomes, modificació d'histones, unió d'activadors i coactivadors transcripcionals als *enhancers* i promotors, i reclutament de la maquinària basal al promotor mínim (revisat per Smale *et al*, 2003). El promotor mínim inclou elements del DNA que es poden estendre ~35 pb corrent amunt i/o corrent avall de l'inici de transcripció, i que sembla que interaccionen directament amb components de la maquinària basal. Sobre l'inici de transcripció del promotor del gen AACS, predit per alineament amb les ESTs, s'hi localitza un putatiu *Inr* (YYA<sub>+1</sub>NWYY), consens per humà, i una regió rica en seqüències GC. A més, aquest promotor manca de caixa TATA i del motiu DPE.



Utilitzant com a motlle la construcció p-291 es construí el vector reporter p-97 (-97/+79) que inclou 4 caixes GC del promotor del gen AACS humà. Sobre aquesta construcció, mitjançant la tècnica d'*overlapping extension*, es mutà el putatiu *Inr* (p-97(M-*Inr*)). Per tal d'estudiar la importància de la regió rica en GC sobre l'activitat basal del promotor, es realitzà la construcció p-33 (-33/+79) que únicament conté l'*Inr* i 79 pb corrent avall. Finalment, i després d'haver observat que dita construcció no tenia activitat basal, s'introduí una caixa TATA en la posició -33/-25 (p(TATA); Shatnawi *et al.*, 2007), amb l'objectiu de conferir activitat a la construcció p-33 (figura R-24). Aquestes construccions foren transfectades, de manera transitòria, en la línia cel·lular HepG2.



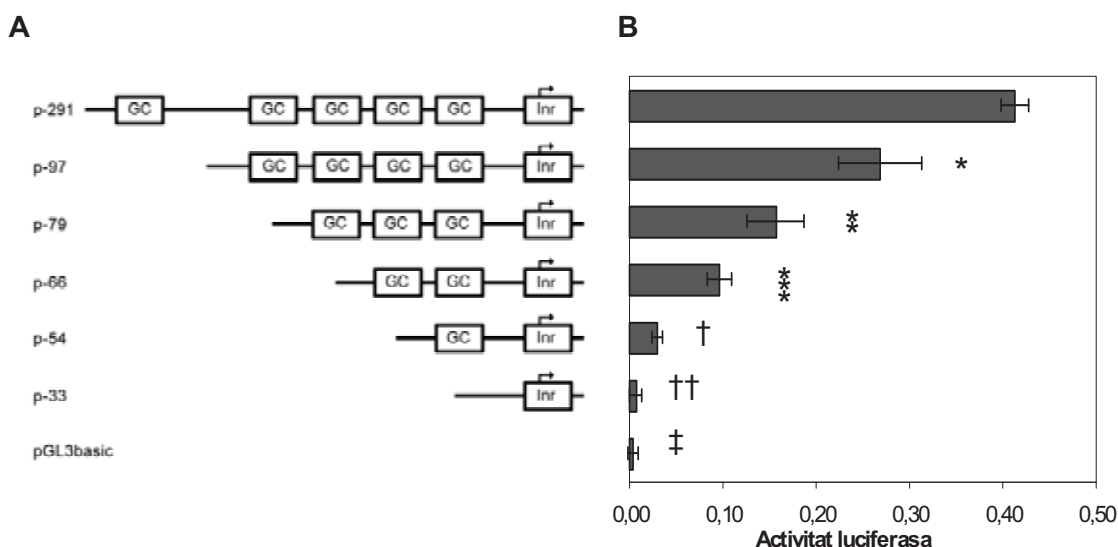
**FIGURA R-24. Paper de l'*Inr*, de les caixes GC i de la TATA en l'activitat basal del promotor de l'AACS humà. A:** Representació esquemàtica de les construccions reporteres. **B:** Transfecció transitòria de la línia cel·lular HepG2 amb les construccions reporteres esquematitzades que contenen el promotor proximal de l'AACS humà, *wt* (p-97), amb el putatiu *Inr* mutat (p-97(M-*Inr*)), la construcció sense caixes GC (p-33), amb una TATA box (p(TATA)) i pGL3basic. Es mostren els valors de luciferasa normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments  $\pm$  desviació estàndard). (\* $p < 0.001$  vs. p-97; \*\* $p$  no significatiu vs. p-33(TATA); † $p$  no significatiu vs. p-33).

Aquests resultats (figura R-24) mostren que la seqüència TCAGTCC constitueix l'*Inr* del promotor del gen AACS ja que la mutació del mateix disminueix l'activitat en un 80%. L'activitat basal de la construcció p-33 és gairebé nul·la i semblant a la de pGL3basic, mostrant la dependència de les caixes GC per a que tingui lloc la transactivació del promotor. A més, quan en aquest context s'introdueix una caixa TATA, no s'observa increment significatiu de dita activitat.

## 5. PAPER DE LES CAIXES GC EN EL PROMOTOR PROXIMAL DEL GEN AACS HUMÀ.

Un elevat nombre de promotors manquen de seqüències TATA però contenen múltiples caixes GC (Reynolds *et. al*, 1984). S'ha vist que aquestes caixes GC són necessàries perquè hi hagi una activitat promotora eficient (Blake *et. al*, 1990).

Amb l'objectiu d'aprofundir més en el paper de les caixes GC sobre l'activitat basal del promotor del gen AACS humà es realitzaren delecions successives de l'extrem 5' de la construcció p-291 (-291/+79), que conté 5 caixes GC, obtenint-se les construccions p-97 (-97/+79), p-79 (-79/+79), p-66 (-66/+79), p-54 (-54/+79) i p-33 (-33/+79) (figura R-25). Aquestes construccions foren transfectades, de manera transitòria, en la línia cel·lular HepG2.



**FIGURA R-25. Activitat basal de les diferents delecions del promotor del gen AACS. A:** Representació esquemàtica de les construccions reporteres. **B:** Transfecció transitòria de la línia cel·lular HepG2 amb les construccions p-291 (-291/+79), p-97 (-97/+79), p-79 (-79/+79), p-66 (-66/+79), p-54 (-54/+79), p-33 (-33/+79) i pGL3basic. Es mostren els valors de luciferasa normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments  $\pm$  desviació estàndard). (\* $p < 0.05$  vs. p-291; \*\* $p < 0.005$  vs. p-97; \*\*\* $p < 0.001$  vs. p-79; † $p < 0.001$  vs. p-66; †† $p < 0.001$  vs. p-54; ‡ $p$  no significatiu vs. p-33).

A la figura R-25 s'observa que l'activitat reportera del promotor del gen AACS humà és màxima en la construcció p-291, que conté 5 caixes GC. Aquesta activitat disminueix progressivament a mesura que disminueix el nombre de caixes GC presents en el promotor, essent mínima en la construcció p-33, que és semblant a l'activitat luciferasa observada per a pGL3basic, confirmant que les caixes GC constitueixen elements fonamentals per a l'activitat basal d'aquest promotor.

## 6. CARACTERITZACIÓ DELS LLOCS D'UNIÓ A Sp1.

S'han descrit varis factors que interaccionen amb les caixes GC, com ara, Sp1 (revisat per McKnight *et al.*, 1986; Dynan *et al.*, 1983), LSF (Kim *et al.*, 1987), ETF (Kageyama *et al.*, 1989), GCF-1 (Kageyama *et al.*, 1989) i AP2 (Mitchell *et al.*, 1987). En el present treball s'ha analitzat la interacció del factor Sp1 amb les caixes GC del promotor del gen AACS: *in vitro*, mitjançant *pull-down* amb oligos biotinitats i *in vivo*, per la tècnica d'immunoprecipitació de cromatina (*ChIP*).

Amb l'objectiu de determinar si Sp1 era capaç d'interaccionar *in vitro* amb la seqüència rica en GC del promotor del gen AACS, es realitzaren experiments de *pull-down* amb oligos biotinitats, corresponents a les seqüències Sp1-*wt* i Sp1-*mut* (figura R-26A), que foren incubats amb extractes proteics de la línia cel·lular HIB-1B. S'analitzà la presència d'Sp1 en els complexos proteics atrapats amb estreptavidina-agarosa mitjançant transferència *Western*, emprant un anticòs específic contra Sp1.

**A**

**Sp1-*wt*** 5'-CGGG**AGGGCGGGG**CCTGGAA**GGGGCGGGG**ATTC**GAGGC**GGGGCCTGC**GGGGCGGGG**CCTGGGC-3

**Sp1-*mut*** 5'-CGGG**AGTCTAGAGC**CCTGGAA**GGTCTAGAGA**TTC**GATCTAGAGC**CTGC**GGTCTAGAG**CCTGGGC-3

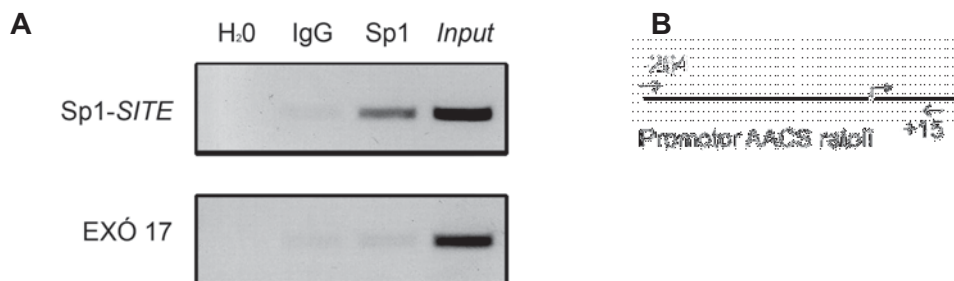
**B**



**FIGURA R-26. Reclutament d'Sp1 a través de les caixes GC del promotor de l'AACS. A:** esquema dels oligonucleòtids emprats. Es detallen les seqüències de les caixes GC en negra (Sp1-*wt*) i de les caixes GC mutades en negra i subratllades (Sp1-*mut*). **B:** Assaig de *pull-down* amb oligos Sp1-*wt* (WT) i Sp1-*mut* (Mut) biotinitats i extractes proteics de cèl·lules HIB-1B (200 µg). Els complexos atrapats amb streptavidina-agarosa foren sotmesos a SDS-PAGE i posterior *Western blot* en front a un anticòs específic contra Sp1 (dilució 1:1000).

A la figura R-26B es pot observar que Sp1 interacciona amb una sonda que conté la seqüència corresponent a les quatre caixes GC del promotor proximal del gen AACS humà i que aquesta interacció és nul·la quan s'incuben els extractes proteics amb una sonda que conté les caixes GC mutades.

Per tal d'analitzar si la proteïna Sp1 interacciona *in vivo* amb el promotor del gen AACS, es dugueren a terme experiments d'immunoprecipitació de cromatina (*ChIPs*) amb un anticòs específic contra Sp1. S'emprà com a control negatiu una regió distal continguda a l'exó 17.

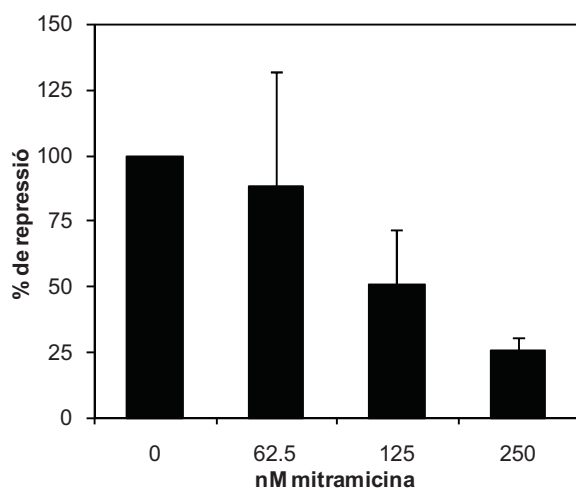


**FIGURA R-27. Sp1 interacciona amb el promotor proximal del gen AACS.** **A:** Cromatina aïllada d'adipòcits 3T3L1 fou immunoprecipitada amb l'anticòs contra Sp1 o sèrum preimmune (IgG). El DNA immunoprecipitat s'analitzà per PCR amb oligonucleòtids específics del gen AACS de ratolí. **B:** Regió del promotor amplificat i localització dels oligonucleòtids emprats.

## 8. EFECTE DE LA MITRAMICINA EN L'ACTIVITAT BASAL.

La mitramicina és una antibiòtic que, en presència de Mg<sup>2+</sup>, s'uneix a les seqüències riques en GC del DNA, impedit la unió de la proteïna Sp1 (Van Dike *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1987; Ray *et al.*, 1989).

Es transfectaren cèl·lules HepG2 amb la construcció reportera p-291, que conté 5 caixes GC, i s'incubà el cultiu cel·lular amb concentracions creixents de l'antibiòtic, observant-se una disminució significativa de l'activitat basal del promotor del gen AACS en tractaments de 125 i 250 nM de mitramicina (figura R-28). Aquests resultats confirmen que la unió d'Sp1 a les caixes GC del promotor proximal del gen AACS humà és essencial per a l'activitat basal del promotor.



**FIGURA R-28. Repressió de l'activitat luciferasa de la construcció p-291 pel tractament amb mitramicina.** Transfecció transitòria de la línia cel·lular HepG2 amb la construcció p-291 (-291/+79) en presència de concentracions creixents de mitramicina (0, 62.5, 125 i 250 nM). Es mostra el % de repressió respecte a la situació control (no tractament) normalitzat per proteïna (mitjana de 3 experiments  $\pm$  desviació estàndard) (\*p < 0.05 vs. control; \*\*p < 0.005 vs. control).

## ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS PER LXR

Els LXRs (*Liver X Receptor*; LXR $\alpha$  i LXR $\beta$ ) són receptors nuclears activats per oxisterols (Janowski *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1997) que regulen una gran varietat de processos fisiològics com ara el metabolisme i transport del colesterol, lipogènesi, gluconeogènesi i inflamació (revisat per Tontonoz *et al.*, 2003; Zelcer *et al.*, 2006).

Els LXRs són factors de transcripció dependents de lligant que formen heterodímers permissius amb RXR. Els elements de resposta a LXR (LXRE) estan formats per dos repeticions directes del motiu hexanucleòtid AGGTCA espaiats per 4 nucleòtids, anomenats DR4 (Willy *et al.*, 1995). La disponibilitat d'agonistes sintètics com ara T0901317 (Schultz *et al.*, 2000; Repa *et al.*, 2000) han permès l'estudi més profund de les conseqüències metabòliques de l'activació d'LXR.

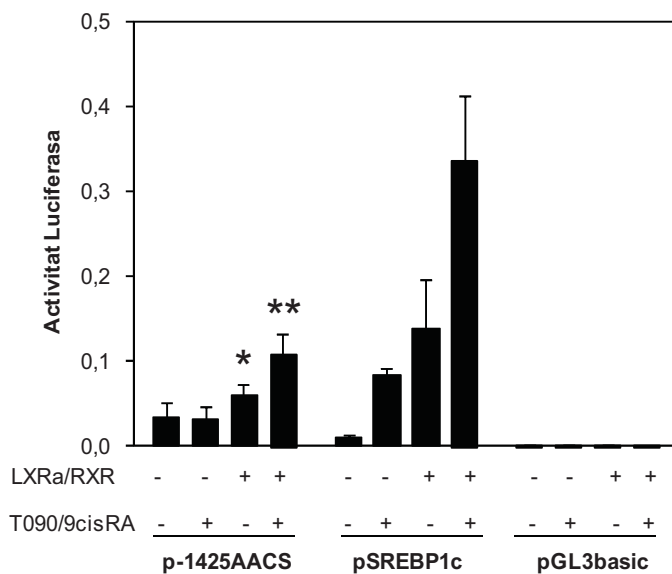
### 9. IDENTIFICACIÓ D'UN PUTATIU LXRE DINS D'UN ELEMENT *Alu* EN EL PROMOTOR DEL GEN AACS HUMÀ.

S'analitzà la seqüència promotora de -1425 a +79 del gen AACS humà amb el *software TFSearch* (versió 1.3.) i es localitzà un putatiu LXRE (-1342/-1327) idèntic al descrit pel gen de l'ApoD (Hummasti *et al.*, 2004). Aquest putatiu LXRE es troba comprès dins d'una de les dues seqüències *Alu* del promotor de l'AACS predites pel programa informàtic *BLAST* de l'NCBI (figura R-20).

Una seqüència *Alu* és un fragment de DNA d'aproximadament 300 pb que es troba altament representat en el genoma dels primats (revisat per Batzer *et al.*, 2002). Pertany a la família dels elements dispersos curts (SINE) i deriven del gen 7SL RNA, que forma part del complex ribosomal (Ullu *et al.*, 1984).

Inicialment els elements *Alu* foren considerats com a paràsits del genoma, sense cap efecte sobre la estabilitat ni l'expressió gènica (Orgel *et al.*, 1980). Actualment però, diferents línies d'evidència mostren que, mitjançant els processos de transposició, recombinació i expansió, els elements *Alu* han contribuït a l'evolució del genoma, constituint nous elements de regulació per als gens veïns (Brosius, 1999; Tomilin, 1999).

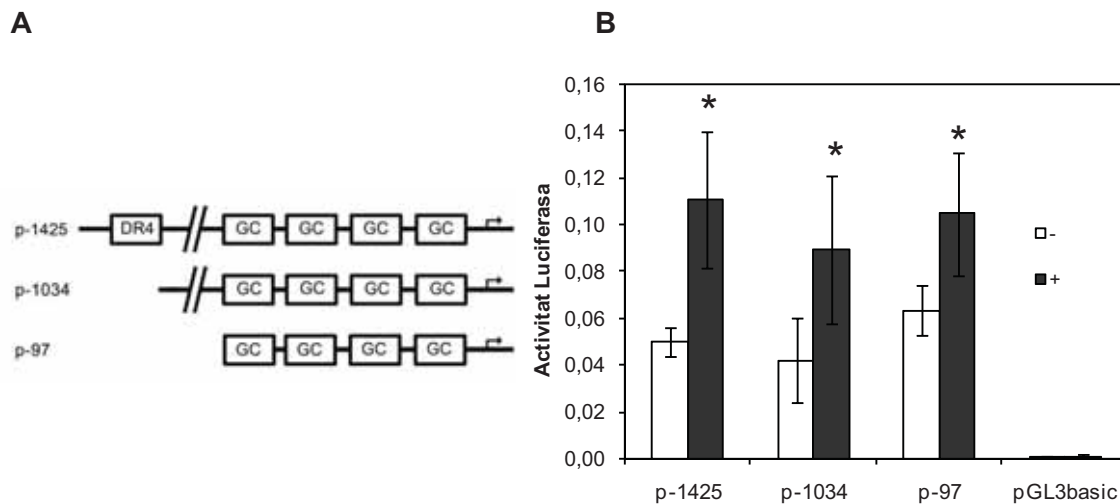
Per tal de provar la funcionalitat d'aquest putatiu LXRE i poder descriure el gen AACS com a gen diana d'LXR, es realitzaren assajos de gen reporter en la línia cel·lular HepG2, cotransfectant la construcció reportera p-1425 i els receptors nuclears LXR $\alpha$  i RXR $\alpha$ . S'emprà el promotor del gen SREBP1c com a control positiu de l'experiment (Repa *et al.*, 2000).



**FIGURA R-29. LXR $\alpha$  regula l'activitat promotora del gen AACS humà.** Transfecció transitòria de la línia cel·lular HepG2 amb les construccions reporteres p-1425 (-1425/+79), pSREBP1c i pGL3basic, cotransfectades amb (+) o sense (-) els receptors nuclears LXR $\alpha$  i RXR $\alpha$ . 24 hores després de la transfecció, es tractaren les cèl·lules amb vehicle (DMSO) o T0901317 (1  $\mu$ M) i 9-cis retinol (1  $\mu$ M) durant 24 hores. Es mostren els valors de luciferasa normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments  $\pm$  desviació estàndard). \*p < 0.005 vs. control; \*\*p < 0.001 vs. control.

Com es mostra a la figura R-29 el promotor del gen AACS humà (-1425/+79) és regulat per l'heterodímer LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ . En el gràfic s'observa que els promotors dels gens AACS i SREBP1c responen de manera diferencial al receptor nuclear LXR $\alpha$ . El promotor d'SREBP1c s'indueix per T0901317 sense l'addició exògena d'LXR $\alpha$ , indicant que els nivells de receptor endògens són suficients per la unió i activació a l'element de resposta. A més, l'addició d'LXR $\alpha$  ja promou la inducció del reporter i aquesta és encara superior quan es tracten les cèl·lules amb lligants. Al contrari, l'activació del promotor del gen AACS és dependent de l'addició tant de receptors com de lligants.

Per tal de determinar si el putatiu LXRE (-1342/-1327) del promotor de l'AACS era funcional i responsable de la inducció observada en la figura R-29, es realitzaren deleccions successives de la regió 5' de la construcció p-1425 que foren assajades en experiments de transfecció transitòria en la línia cel·lular HepG2 així com s'ha indicat anteriorment.

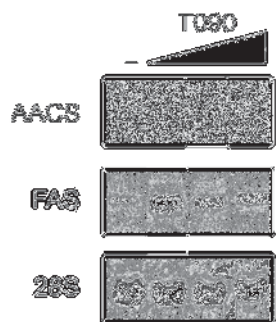


**FIGURA R-30. El putatiu LXRE localitzat en el promotor del gen AACS no és funcional. A:** Esquema de les construccions transfectades. **B:** Transfecció transitòria de la línia cel·lular HepG2 amb les construccions reporterres p-1425, p-1034, p-97 i pGL3basic, cotransfectades amb (+) o sense (-) els receptors nuclears LXR $\alpha$  i RXR $\alpha$ . 24 hores després de la transfecció, es tractaren les cèl·lules amb vehicle (DMSO; -) o T0901317 (1  $\mu$ M) i 9-cis retinol (1  $\mu$ M) (+) durant 24 hores. Es mostren els valors de luciferasa normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments  $\pm$  desviació estàndard). \*p < 0.01 vs. control no tractat.

Com es mostra a la figura R-30 el putatiu LXRE (posicions -1342/-1327 respecte a l'*Inr*) localitzat dins d'una seqüència *Alu* del promotor del gen AACS humà no és funcional, ja que en absència del mateix (construcció p-1034) es segueix observant l'increment de l'activitat luciferasa per la cotransfecció amb LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  i el tractament amb els lligands específics. De fet, la construcció p-97, que únicament conté les 4 caixes GC, també és activada per aquest receptor nuclear.

## 10. EXPRESSIÓ DEL GEN AACS EN RESPOSTA AL TRACTAMENT AMB UN AGONISTA SINTÈTIC D'LXR.

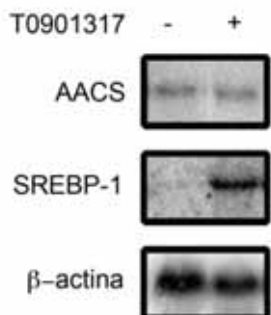
Per provar la hipòtesi que el gen AACS era diana d'LXR es tractaren cèl·lules HepG2 amb concentracions creixents de l'agonista sintètic d'LXR $\alpha$ , T0901317, i s'analitzà l'expressió del gen AACS en termes d'mRNA. S'emprà una sonda específica contra el cDNA de la FAS com a control positiu (Joseph *et al.*, 2003).



**FIGURA R-31. El gen AACS no s'indueix per T0901317 en cèl·lules HepG2.** Cèl·lules HepG2 foren incubades durant 24 hores amb concentracions creixents de T0901317 (0.5; 1 i 10  $\mu$ M) o vehicle (DMSO). Els nivells d'mRNA de l'AACS i de la FAS (20  $\mu$ g) s'analitzaren per *Northern blot*. En el panell inferior es mostra la tinció amb bromur d'etidi dels RNAs ribosomals 28S.

Com calia esperar, els nivells d'mRNA del gen AACS no s'indueixen quan es tracten cèl·lules HepG2 amb concentracions creixents de T0901317 ja que com es mostra en la figura R-29, els nivells de receptor LXR endogen en aquestes cèl·lules no són suficients per a que es produeixi la transactivació del promotor.

A continuació, amb la finalitat de comprovar el resultat anterior en un model més fisiològic, s'obtingué un cultiu primari d'hepatòcits a partir de fetge de rata que es tractà amb l'agonista d'LXR $\alpha$ , T0901317. S'analitzà l'expressió del gen AACS en termes d'mRNA i s'emprà una sonda específica contra el cDNA d'SREBP-1 com a control positiu. S'observà que, en aquest model cel·lular, el gen AACS tampoc s'indueix pel tractament amb T0901317 (figura R-32), indicant que el gen AACS no és diana d'LXR $\alpha$ .



**FIGURA R-32. El gen AACS no s'indueix per T0901317 en cultiu primari d'hepatòcits.** Hepatòcits aïllats a partir de fetge de rata foren incubats durant 16 hores en absència (-) o presència (+) de T0901317 (10  $\mu$ M). Els nivells d'mRNA de l'AACS i d'SREBP-1 (20  $\mu$ g) s'analitzaren per *Northern blot* i s'emprà la sonda específica de  $\beta$ -actina com a control de càrrega.



## ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS PER SREBP

L'homeòstasi del colesterol és mantinguda a través d'una xarxa complexa de programes transcripcionals. A nivell cel·lular, la síntesi *de novo* de colesterol i la captació de lipoproteïnes estan regulades a través d'un *feedback* negatiu que respon a elevats nivells intracel·lulars de colesterol. Aquesta via està regulada per una família de factors de transcripció anomenada *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) (Brown *et al.*, 1997; 1999).

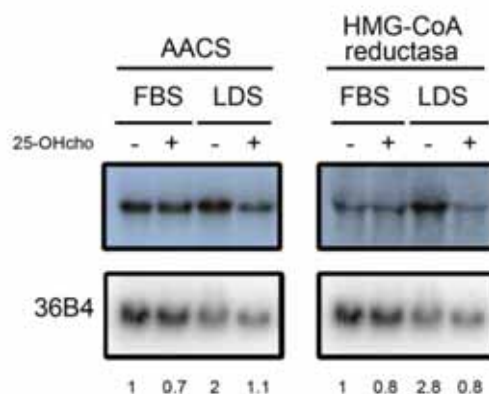
Els SREBPs es sintetitzen en forma de precursors ancorats a la membrana del reticle endoplasmàtic o del nucli; en condicions de depleció de colesterol cel·lular, el precursor pateix dues proteòlisis consecutives i es genera un fragment NH<sub>2</sub>-terminal soluble que es transloca al nucli. Aquest SREBP nuclear, que inclou el domini bHLH-*Zip*, activa la transcripció de gens implicats en la biosíntesi de colesterol i àcids grassos mitjançant la unió a elements SRE o *E boxes* presents en el promotor dels gens diana (Wang *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1995).

Existeixen tres isoformes d'SREBPs: SREBP-1a, SREBP-1c i SREBP-2 (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1993; Tontonoz *et al.*, 1993), que s'expressen de manera diferencial en els teixits (Shimomura *et al.*, 1997).

L'AACS és un gen diana d'SREBPs com es dedueix en experiments de transcriptòmica, realitzats a partir de mostres de fetge de ratolins transgènics que sobreexpressaven nSREBP-1a o nSREBP-2 o que tenien deficiència en tots els SREBPs resultat de la deficiència de la proteïna SCAP, que actua com a sensor d'esterols i que és imprescindible per a que es processï la forma madura del factor de transcripció (Horton *et al.*, 2003).

## 11. EFECTE DE LA DEPLECIÓ D'ESTEROLS EN L'EXPRESSIONIÓ DE L'AACS.

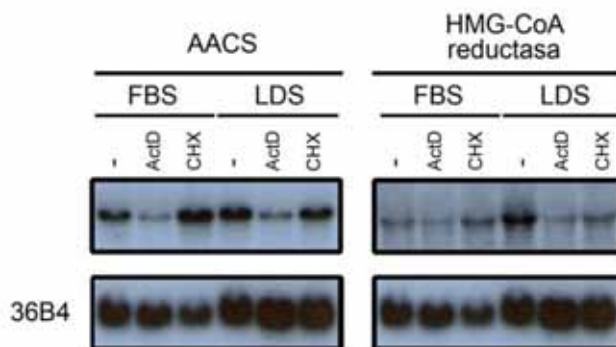
Per tal d'examinar l'efecte de la depleció d'esterols cel·lulars sobre l'expressió del gen AACS, s'incubaren cèl·lules Cos7 en sèrum deslipoproteïnitzat (LDS). Com que per a la majoria de gens sensibles al colesterol, els nivells d'mRNA es veuen disminuïts pel tractament amb oxisterols (Kawabe *et al.*, 1995), es tractà el cultiu cel·lular, incubat en un 10 % de FBS o LDS, amb 25-hidroxicolesterol. S'analitzaren els nivells d'mRNA del gen AACS per *Northern blot* i s'emprà una sonda específica contra l'HMG-CoA reductasa com a control positiu (Goldstein *et al.*, 1990).



**FIGURA R-33. Inducció de l'expressió de l'AACS en cèl·lules Cos7 incubades en medi lliure d'esterols.** Cèl·lules Cos7 foren incubades durant 24 hores en sèrum fetal boví (FBS) o sèrum deficient en lipoproteïnes (LDS) en absència (-) o presència (+) de 25-hidroxicolesterol (1 µg/mL). Els nivells d'mRNA de l'AACS i HMG-CoA reductasa (20 µg) s'analitzaren per *Northern blot*, emprant la sonda específica de 36B4 com a control de càrrega. En la part inferior es mostren les vegades d'inducció respecte al control (FBS no tractat) obtinguts per densitometria mitjançant el *software Image Quant TL*.

Tal i com es mostra a la figura R-33, quan es mantenen les cèl·lules en un medi lliure d'esterols (LDS) es produeix un increment dels nivells d'mRNA de l'AACS de 2 vegades mentre que el gen clau en la via del mevalonat, l'HMG-CoA reductasa, s'indueix 2.8 vegades sota les nostres condicions experimentals. Així mateix, a la figura R-33 s'observa que aquesta inducció de l'expressió de l'AACS i de l'HMG-CoA reductasa provocada per la incubació en LDS es reverteix quan es tracta el cultiu cel·lular amb 25-hidroxicolesterol.

Com que l'acumulació de l'RNA d'un gen pot venir donada per un increment de la taxa de transcripció i/o per la variació en l'estabilitat de l'mRNA, s'avaluà l'aportació del procés de transcripció en la inducció de l'AACS per LDS, mitjançant el tractament de cèl·lules Cos7 amb actinomicina D, que és un inhibidor de l'RNA polimerasa II. Així mateix, s'analitzà si aquesta inducció necessitava de l'aportació de nova síntesi proteica mitjançant el tractament del cultiu cel·lular amb cicloheximida.



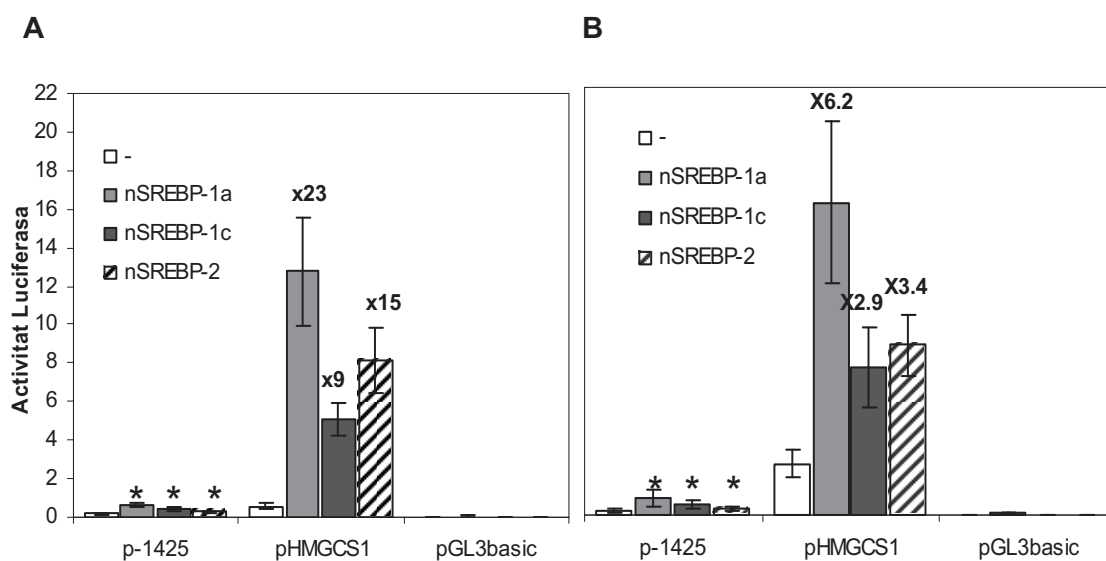
**FIGURA R-34. Anàlisi del mecanisme mitjançant el qual el sèrum deslipoproteïnitat indueix l'expressió del gen AACS.** Cèl·lules Cos7 foren incubades durant 24 hores en sèrum fetal boví (FBS) o sèrum deficient en lipoproteïnes (LDS). Passat aquest temps s'incubaren les cèl·lules en presència d'actinomicina D (1 µg/mL), cicloheximida (10 µg/mL) o vehicle (etanol i DMSO) durant 24 hores més. Els nivells d'mRNA de l'AACS i de HMG-CoA reductasa (20 µg) s'analitzaren per *Northern blot*, emprant la sonda específica de 36B4 com a control de càrrega. En la part inferior es mostren les vegades d'inducció respecte al control (FBS no tractat) obtinguts per densitometria mitjançant el *software Image Quant TL*.

A la figura R-34 (panell esquerre) s'observa que la inducció de l'AACS per LDS és abolida quan s'incuben les cèl·lules en presència d'actinomicina D, indicant que aquesta inducció es dona a través d'un mecanisme transcripcional. Per altra banda, quan s'incuba el cultiu en FBS i es tracta amb cicloheximida, s'observa una sobreexpressió del gen AACS que és superior a la observada pel tractament amb LDS. Aquest efecte podria ser degut a que el colesterol present en el sèrum entrés dins la cèl·lula i reprimís l'expressió de l'AACS d'una manera depenent de nova síntesi proteica i que aquesta inhibició es bloquegés per l'addició de cicloheximida al medi de cultiu. De fet, la inducció de l'expressió de l'HMG-CoA reductasa pel tractament amb cicloheximida (figura R-34; panell dret) ha sigut descrita anteriorment (Choi *et al.*, 1993). El tractament amb cicloheximida quan s'incuben les cèl·lules en LDS provoca una disminució de l'expressió dels gens AACS i HMG-CoA reductasa, indicant que la inducció d'ambdós en medi lliure d'esterols requereix de nova síntesi proteica. En resum, tant la repressió per colesterol com la inducció per absència del mateix en el medi de cultiu requereixen de nova síntesi proteica.

## 12. ASSAJOS DE GEN-REPORTER.

Amb l'objectiu de localitzar les seqüències responsables de la regulació per colesterol, s'analitzà la seqüència promotora del gen AACS amb el programa informàtic *TFSearch* i es localitzaren dos putatius SREs (-1341/-1331 i -1207/-1197 respecte a l'*Inr*) compresos dins de la primera seqüència *Alu* (figura R-20).

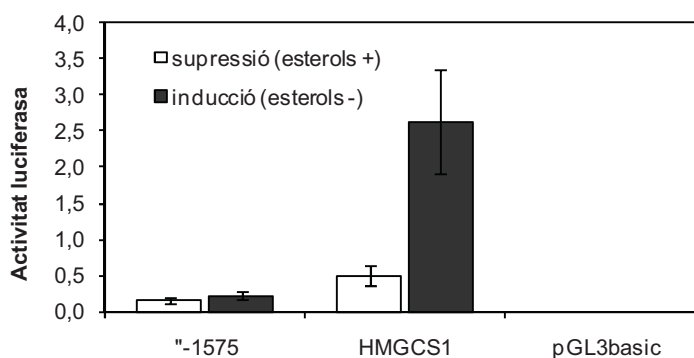
Per tal de provar la hipòtesi de que el promotor del gen AACS humà clonat era diana d'SREBPs, es realitzaren assajos de gen reporter en la línia cel·lular Hek293, cotransfectant la construcció reportera p-1425 i les diferents isoformes nuclears i, per tant, actives d'SREBPs (SREBP-1a, -1c i -2). S'emprà el promotor del gen HMGCS1 com a control positiu ja que conté tres SREs ben caracteritzats (Smith *et al.*, 1988; Jackson *et al.*, 1995; Dooley *et al.*, 1998). 5 hores després de la transfecció es mantingueren les cèl·lules en condicions d'inducció (10% LDS + 10 µM de pravastatina) o repressió (10% FBS + 1 µg/mL de 25-hidroxicolesterol + 10 µg/mL de colesterol) dels SREBPs endògens durant 16 hores més.



**FIGURA R-35. Les diferents isoformes d'SREBP no activen transcripcionalment el promotor del gen AACS humà clonat.** Transfecció transitòria de la línia cel·lular Hek293 amb les construccions reportereres p-1425 (-1425/+79), pHMGCS1 i pGL3basic cotransfectades sense (-) o amb els vectors d'expressió nSREBP-1a, nSREBP-1c i nSREBP-2. 5 hores després de la transfecció, es tractaren les cèl·lules amb 1 µg/mL de 25-hidroxicolesterol i 10 µg/mL de colesterol (repressió; figura **A**) o 10% LDS + 10 µM de pravastatina (inducció; figura **B**) durant 16 hores més. Es mostren els valors de luciferasa normalitzats *per renilla* (mitjana de 3 experiments ± desviació estàndard). \*p no significatiu vs. control.

Com s'observa a la figura R-35 cap de les isoformes testades d'SREBP indueixen significativament el promotor del gen AACS de manera que els dos putatius SREs localitzats en les posicions -1341/-1331 i -1207/-1197 respecte a l'inici de transcripció no són funcionals. Es mostra com el promotor del gen HMGCS1, que és diana d'SREBPs, s'indueix més en condicions de repressió (figura R-35A) que en condicions d'inducció (figura R-35B) ja que en condicions de repressió l'activitat basal del promotor és menor degut a què els SREBPs endògens romanen ancorats a la membrana del reticle endoplàsmic i, per tant, estan reprimits.

A continuació (figura R-36), es representen les activitats basals en presència (+) i absència (-) d'esterols, reflex de la regulació dels promotors de l'AACS i de l'HMGCS1 pels SREBPs endògens.



**FIGURA R-36. La regió promotora del gen AACS clonada no és regulada pels nivells d'esterols endògens.** Representació de les activitats basals a partir del gràfic anterior (figura R-35). En blanc es mostren les activitats basals obtingudes a partir d'un cultiu incubat amb 10% de FBS i tractat amb 25-hidroxicolesterol (1 µg/mL) i colesterol (10 µg/mL) (supressió; esterols +) i en negre, les activitats basals obtingudes a partir d'un cultiu incubat amb 10% de LDS i tractat amb pravastatina (10 µM) (inducció; esterols -). Es mostren els valors de luciferasa normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments ± desviació estàndard)

Com calia esperar, a la figura R-36 s'observa que el promotor del gen AACS, que no es regula per cotransfecció amb les diferents isoformes d'SREBPs (figura R-35), tampoc no es regula per la variació de la concentració d'esterols en el medi de cultiu i, per tant, pels nivells d'SREBPs endògens.

## ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS EN EL TEIXIT ADIPÓS

El gen AACS s'expressa principalment en els teixits lipogènics com ara el cervell, fetge i teixit adipós (Endemann *et al.*, 1982; Ito *et al.*, 1986; Ohgamni *et al.*, 2003). En el teixit adipós blanc (TAB) de rata, la seva expressió podria estar relacionada amb l'adipogènesi, concretament amb la biosíntesi d'àcids grassos durant aquest procés (Yamasaki *et al.*, 2005).

### 13. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN AACS DURANT LA DIFERENCIACIÓ ADIPOCITÀRIA.

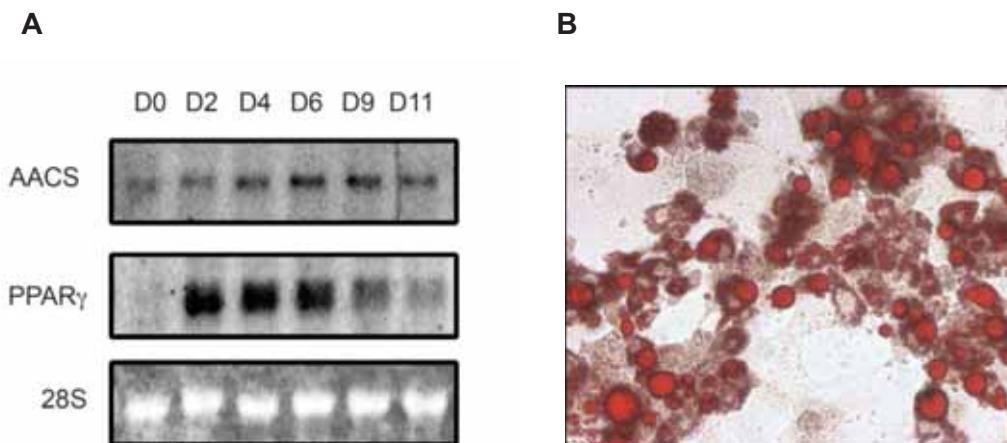
#### 13.1. Estudis realitzats en la línia cel·lular 3T3L1.

El sistema cel·lular de les 3T3L1 ha sigut àmpliament emprat per a l'estudi de la diferenciació adipocitària, permetent la dissecció dels processos moleculars i cel·lulars que tenen lloc durant la transició de l'estat de preadipòcit fibroblàstic a cèl·lula madura (Green *et al.*, 1974; Green *et al.*, 1975).

La diferenciació adipocitària és un procés multifactorial que requereix inhibició del creixement per contacte cèl·lula-cèl·lula, inducció hormonal per expansió clonal mitòtica (designat com a dia 0), parada del creixement (que es correspon a la diferenciació primerenca dels dies 1-3), acumulació de gotícules lipídiques (diferenciació tardana, dies 4-6) i diferenciació terminal (dia 7 i posterior) (revisat per Gregoire *et al.*, 1998). Durant la fase de creixement, els preadipòcits són morfològicament semblants als fibroblasts. En la confluència, en canvi, la inducció de la diferenciació pel tractament amb un còctel d'hormones, provoca canvis dràstics en la forma de la cèl·lula. Així, el preadipòcit adopta una forma esfèrica, acumula gotícules lipídiques, i progressivament adquireix les característiques morfològiques i bioquímiques de l'adipòcit blanc madur.

Per tal d'estudiar el paper del gen AACS en el teixit adipós, s'analitzà l'expressió del mateix en termes d'mRNA durant l'adipogènesi en la línia cel·lular 3T3L1, emprant una sonda específica de PPAR $\gamma$  com a marcador de diferenciació (Tontonoz *et al.*,

1994b). A continuació, amb l'objectiu de comprovar que el cultiu cel·lular de 3T3L1 s'havia diferenciat correctament, es dugué a terme una tinció *Oil Red O* del mateix i es visualitzà en el microscopi de contrast de fase (figura R-37).



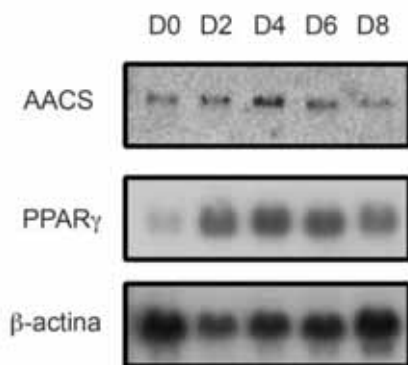
**FIGURA R-37. Anàlisi de l'expressió del gen AACS durant la diferenciació adipocitària en la línia cel·lular 3T3L1. (A)** Cèl·lules 3T3L1 proliferants foren cultivades en DMEM suplementat amb 10% de FBS fins que arribaren a la confluència. 2 dies després (dia 0), s'induí la diferenciació per addició d'un còctel d'hormones (veure material i mètodes). Les cèl·lules es recolliren en el temps indicat (dia 0, dia 2, dia 4, dia 6, dia 9 i dia 11). Els nivells d'mRNA de l'AACS i de PPAR $\gamma$  (10  $\mu$ g) s'analitzaren per *Northern blot*. En el panell inferior es mostra la tinció amb bromur d'etidi dels RNAs ribosomals 28S. **(B)** Es mostra una fotografia (20x augments) a partir de microscopi de contrast de fase de cèl·lules 3T3L1 a dia 11 de diferenciació fixades i tenyides amb *Oil Red O*.

Com es mostra a la figura R-37, el gen AACS és regulat durant l'adipogènesi. Així, els nivells d'mRNA de l'AACS es detectaren en l'estat de prediferenciació (dia 0), s'incrementaren durant la diferenciació primerenca, arribant a un màxim d'expressió en el dia 6 i disminuïren progressivament durant la fase de diferenciació terminal. Els nivells d'mRNA de PPAR $\gamma$  foren indetectables en el dia 0, s'incrementaren a partir del dia 2 fins al dia 6, igual que el gen AACS, i disminuïren en la fase de diferenciació terminal.

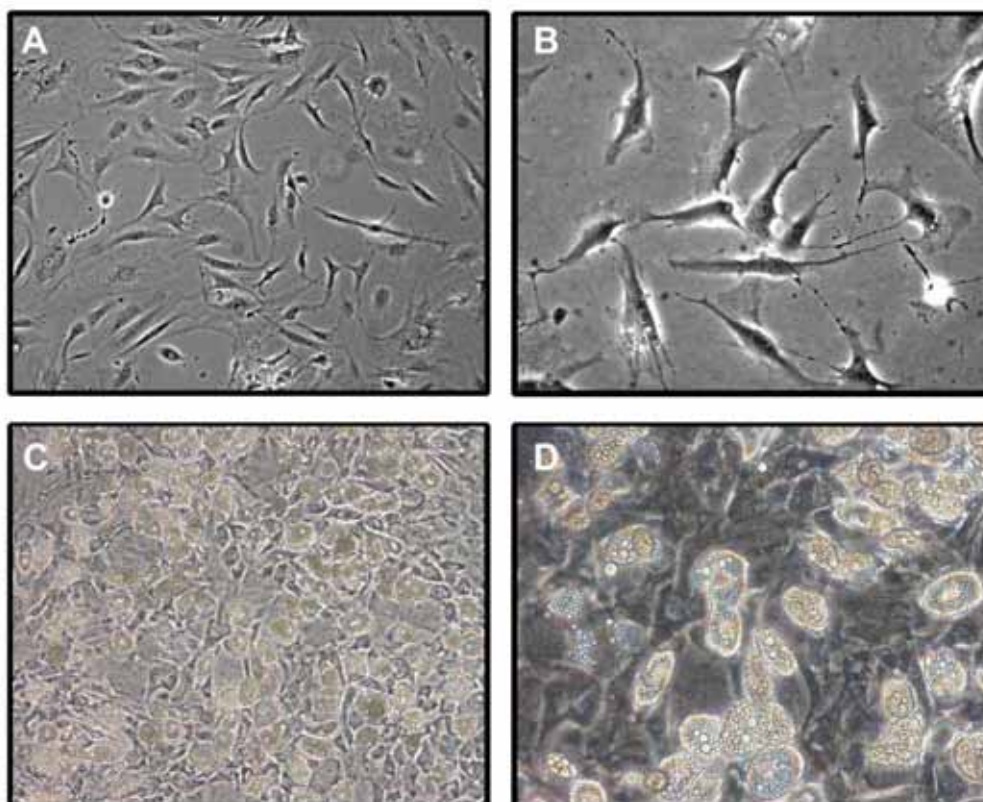
### 13.2. Estudis realitzats en cultiu primari de teixit adipós de rata.

Amb la finalitat de validar els resultats obtinguts en un model més fisiològic, s'obtingué un cultiu primari a partir de TAB del dipòsit subcutani de rata i s'analitzaren els nivells d'mRNA de l'AACS durant l'adipogènesi. La detecció de PPAR $\gamma$  s'emprà com a marcador de diferenciació adipocitària (Tontonoz *et al.*, 1994b). Així mateix, es comprovà la diferenciació del cultiu mitjançant tinció *Oil Red O*.





**FIGURA R-38A. Anàlisi de l'expressió del gen AACS durant l'adipogènesi en cultiu primari de rata.** Les cèl·lules estromals vasculars foren aïllades a partir del TAB del dipòsit subcutani de rata. Un cop el cultiu assolí la confluència, s'inicià la diferenciació del mateix (dia 0) així com es detalla en els materials i mètodes. Es recolliren les cèl·lules en el temps indicat (dia 0, dia 2, dia 4, dia 6 i dia 8) i els nivells d'mRNA de l'AACS i de PPAR $\gamma$  (10  $\mu$ g) s'analitzaren per *Northern blot*; s'emprà la sonda específica de  $\beta$ -actina com a control de càrrega.



**FIGURA R-38B. Diferenciació morfològica del cultiu primari de teixit adipós.** Es mostren fotografies a partir de microscopi de contrast de fase d'un cultiu primari a dia 0 de diferenciació (A; 10x augments i B; 20x augments) i a dia 13 de diferenciació (C; 10x augments i D; 20x augments) fixat i tenyit amb *Oil Red O*.

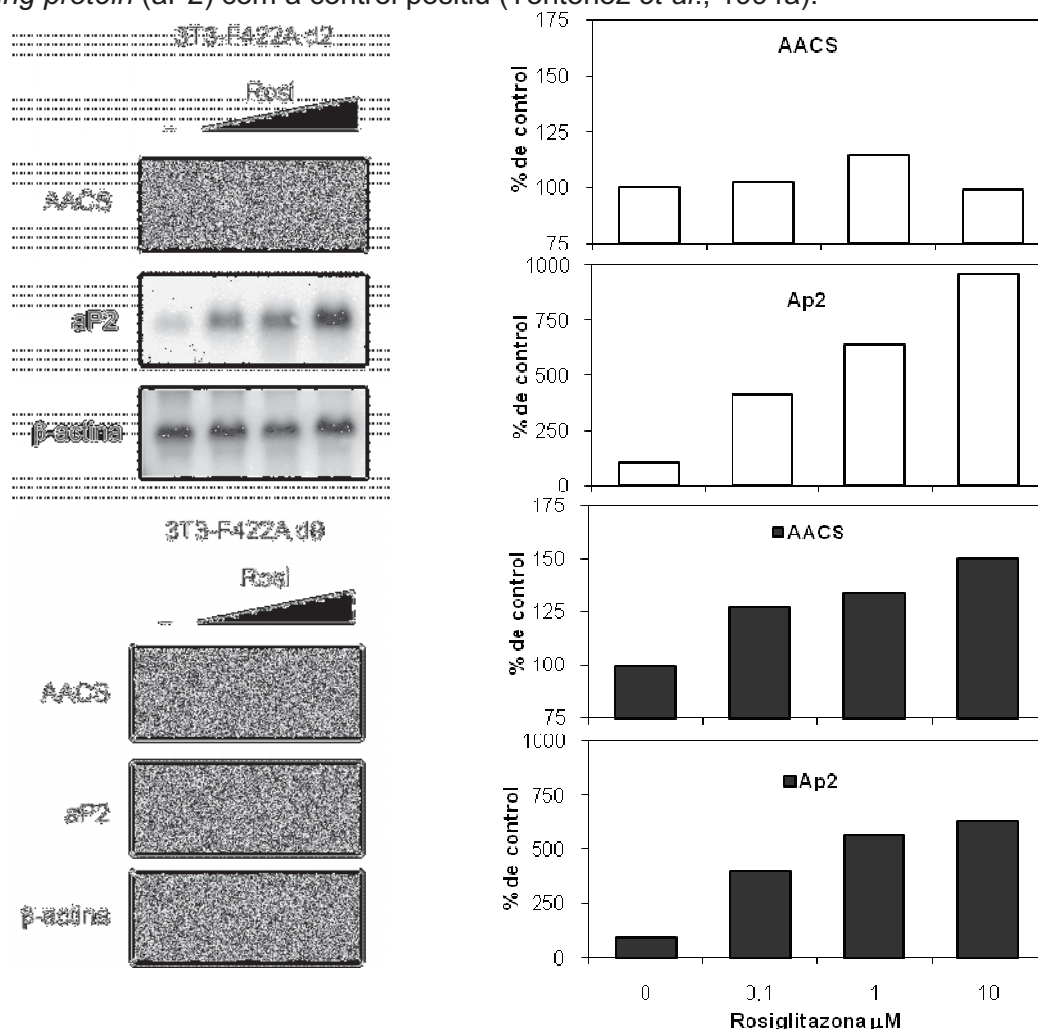
El gen AACS es regula durant la diferenciació adipocitària en cultiu primari de teixit adipós coincidint amb els resultats publicats per Yamasaki *et al.*, 2005. Així, els nivells d'mRNA de l'AACS es detectaren en l'estat de prediferenciació (dia 0), s'incrementaren durant la diferenciació primerenca (dies 2-4), arribant a un màxim d'expressió en el dia 4 i disminuïren progressivament en les fases de diferenciació tardana i terminal (figura R-38A). Els nivells d'mRNA de PPAR $\gamma$  s'incrementaren dels dies 2 al 6 i disminuïren en la fase de diferenciació terminal (figura 38A). A la figura R-38B s'observa una gran acumulació de gotícules lipídiques en l'adipòcit madur (i no en el preadipòcit) tenyides pel colorant.



## 14. L'AGONISTA DE PPAR $\gamma$ , ROSIGLITAZONA, INDUEIX L'EXPRESSIÓ DEL GEN AACS.

### 14.1. Estudis realitzats en la línia cel·lular 3T3-F422A.

PPAR $\gamma$  és el factor de transcripció clau implicat en l'adipogènesi (Tontonoz *et al.*, 1994b; Chawla *et al.*, 1994). Per provar la hipòtesi que el gen AACS era diana de PPAR $\gamma$  es tractaren preadipòcits (dia 2) i adipòcits (dia 9) de la línia cel·lular 3T3-F422A amb concentracions creixents de l'agonista de PPAR $\gamma$ , rosiglitazona, i s'analitzà l'expressió del gen AACS. S'emprà una sonda específica de *adipocyte fatty acid-binding protein* (aP2) com a control positiu (Tontonoz *et al.*, 1994a).

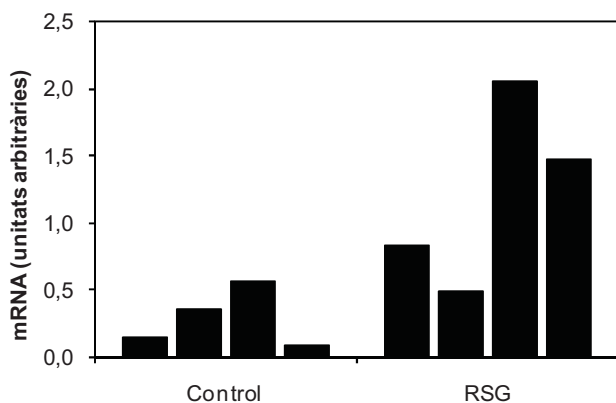


**FIGURA R-39. Tractament del cultiu 3T3F422A amb rosiglitazona.** Preadipòcits (A) i adipòcits (B) de la línia cel·lular 3T3F422A foren incubats durant 24 hores amb concentracions creixents de RSG (0; 0.1; 1 i 10  $\mu$ M) o vehicle (DMSO). Els nivells d'mRNA de l'AACS i d'aP2 (10  $\mu$ g) s'analitzaren per *Northern blot*, emprant la sonda específica de  $\beta$ -actina com a control de càrrega. Es mostra la representació de la quantificació obtinguda pel *software Image Quant TL* dels valors d'mRNA de l'AACS i d'aP2 en preadipòcits (A) (blanc) i en adipòcits (B) (negre) normalitzats i assignant el valor del 100% al control (no tractament).

A la figura R-39 s'observa una molt lleu inducció dels nivells d'mRNA del gen AACS pel tractament amb rosiglitazona, que es dona únicament en l'adipòcit (B). En canvi, la inducció de l'expressió d'aP2, gen ben caracteritzat com a diana de PPAR $\gamma$ , és un ordre de magnitud superior a la observada per l'AACS i es dona en els dos estats de diferenciació (preadipòcit i adipòcit).

#### 14.2. Estudis realitzats *in vivo*.

Amb l'objectiu de determinar si l'activació de PPAR $\gamma$  afecta l'expressió del gen AACS *in vivo*, es tractaren rates mascle amb rosiglitazona durant 7 dies (10 mg/Kg/d). L'expressió de l'AACS fou analitzada en termes d'mRNA en el dipòsit subcutani del TAB, mitjançant la tècnica d'RT-PCR en temps real.

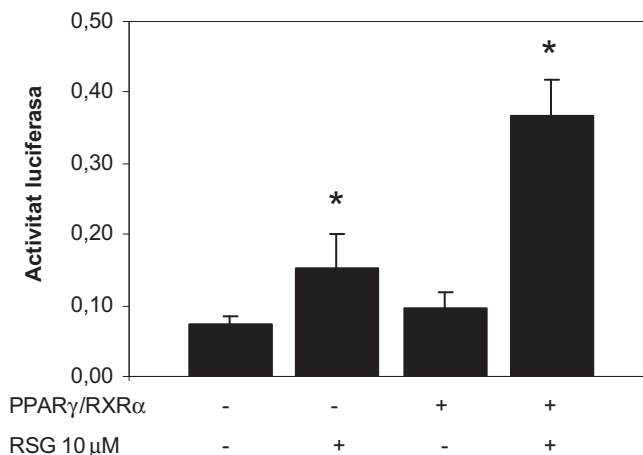


**FIGURA R-40. Efecte del tractament amb rosiglitazona sobre l'expressió de l'AACS en TAB de rata.** Rates mascle adultes ( $n = 4$  per grup) foren tractades diàriament durant 7 dies amb RSG a una dosi de 10 mg/Kg/d o vehicle. L'RNA total fou extret a partir del dipòsit subcutani, retrotranscrit a cDNA i analitzat per RT-PCR en temps real amb *Taqman*. Es mostra l'expressió del gen AACS per animals individuals normalitzada amb 36B4.

Com es mostra a la figura R-40 sobre la variabilitat individual, el tractament amb rosiglitazona incrementa els nivells d'mRNA de l'AACS en el teixit adipós de rata *in vivo*.

## 15. PPAR $\gamma$ PROMOU L'EXPRESSIÓ DEL GEN AACS A NIVELL TRANSCRIPCIONAL.

Per tal de determinar si el gen AACS és transcripcionalment activat per PPAR $\gamma$ , es transfectaren cèl·lules HIB-1B amb la construcció reportera p-1425 i els vectors d'expressió dels factors de transcripció PPAR $\gamma$  i RXR $\alpha$ . 24 hores després de la transfecció es tractaren les cèl·lules amb el lligant específic de PPAR $\gamma$  (RSG 10  $\mu$ M) o vehicle (DMSO) durant 24 hores més.



**FIGURA R-41. Resposta a PPAR $\gamma$  del promotor del gen AACS humà.** Transfecció transitòria en la línia cel·lular HIB-1B amb la construcció reportera p-1425 (-1425/+79) cotransfectada amb (+) o sense (-) els vectors d'expressió d'RXR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  així com s'indica en el gràfic. 24 hores després de la transfecció, es tractaren les cèl·lules amb rosiglitazona (RSG; 10  $\mu$ M) o vehicle (DMSO) durant 24 hores més. Es mostren els valors de luciferasa total normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments  $\pm$  desviació estàndard). \* $p < 0.005$  vs. control no tractat.

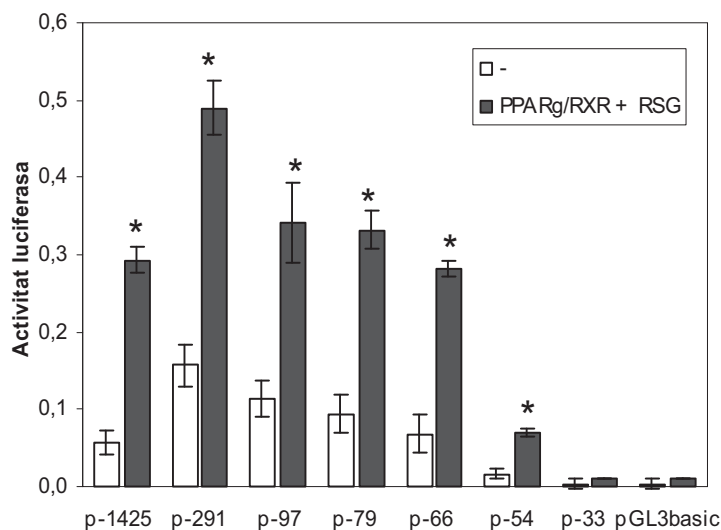
A la figura R-41 es mostra que la rosiglitazona actua sobre el gen de l'AACS mitjançant l'activació dependent de lligant l'heterodímer PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ . Així, el tractament amb rosiglitazona, en absència de PPAR $\gamma$ , promou l'activitat promotora del gen AACS, probablement degut als nivells endògens de PPAR $\gamma$  de les cèl·lules. Quan el cultiu cel·lular és cotransfectat amb l'heterodímer PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  en absència de lligant, no s'observa inducció de l'activitat luciferasa, mentre que en presència de rosiglitazona, l'activitat reportera del gen AACS s'incrementa 4 vegades.

## 16. LA REGIÓ RICA EN GC DEL PROMOTOR DEL GEN AACS ÉS RESPONSABLE DE L'ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL PRODUÏDA PER PPAR $\gamma$ .

Els PPAR són factors de transcripció dependents de lligant que heterodimeritzen amb RXR per tal d'unir-se als elements de resposta dels seus gens diana (PPRE). Els PPRE estan formats per dues repeticions directes del motiu hexanucleòtid AGGTCA espaiats per 1 nucleòtid, anomenats DR1 (Dreyer *et al.*, 1992; Kliewer *et al.*, 1992; Tugwood *et al.*, 1992).

S'analitzà la regió promotora de -1425 a +29 del gen AACS amb el *software* TFSearch i no es localitzà cap seqüència consens corresponent a un element de resposta a PPAR, suggerint l'existència d'un mecanisme independent de PPRE com a responsable de l'activació de l'expressió del gen AACS per PPAR $\gamma$ .

Amb l'objectiu d'identificar les seqüències reguladores importants per a la inducció del gen AACS per PPAR $\gamma$ , es realitzaren deleccions successives de la regió 5' de la construcció p-1425 i es dugueren a terme experiments de transfecció transitòria en la línia cel·lular HIB-1B, cotransfectant l'heterodímer PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  i tractant les cèl·lules amb 10  $\mu$ M de rosiglitazona.

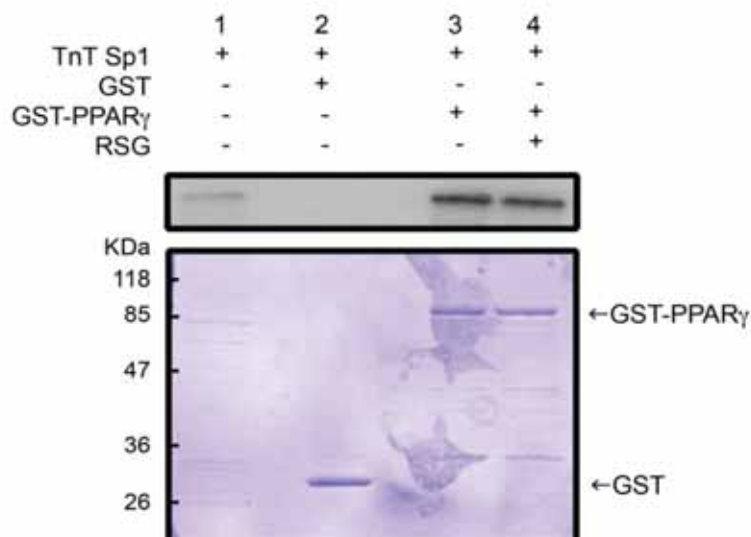


**FIGURA R-42. Localització de la resposta a PPAR $\gamma$  del promotor del gen AACS humà.** Transfecció transitòria en la línia cel·lular HIB-1B amb les construccions reporteres p-1425 (-1425/+79), p-291 (-291/+79), p-97 (-97/+79), p-79 (-79/+79), p-66 (-66/+79), p-54 (-54/+79), p-33 (-33/+79) i pGL3basic combinades amb o sense la transfecció dels vectors d'expressió d'RXR $\alpha$  i PPAR $\gamma$ . 24 hores després de la transfecció, es tractaren les cèl·lules amb rosiglitazona (RSG; 10  $\mu$ M) o vehicle (DMSO) durant 24 hores més. Es mostren els valors de luciferasa total normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments  $\pm$  desviació estàndard). \*p<0.001 vs. control (no tractament).

A la figura R-42 es mostra que la construcció reportera p-33, que no conté la seqüència rica en GC del promotor del gen AACS humà, és la única que no s'indueix per la transfecció amb PPAR $\gamma$ , suggerint que PPAR $\gamma$  promou l'activació del gen AACS a través de les caixes GC.

## 17. INTERACCIÓ DIRECTA PROTEÏNA-PROTEÏNA ENTRE PPAR $\gamma$ I Sp1.

Diferents articles han descrit una interacció directa entre PPAR $\gamma$  i Sp1 (Sugawara *et al.* 2001; 2002; Sassa *et al.*, 2004). Amb la finalitat de reproduir aquests treballs, es realitzaren experiments de GST pull-down amb la proteïna de fusió GST-PPAR $\gamma$  expressada i purificada a partir d'un cultiu d'*E.coli* BL21 i la proteïna Sp1 transcrita i traduïda *in vitro* (TnT).



**FIGURA R-43. Interacció proteïna-proteïna entre PPAR $\gamma$  i Sp1.** Assaig de GST *pull-down* emprant 10  $\mu$ g de proteïnes GST (carril 2) o GST-PPAR $\gamma$  (carrils 3 i 4) i TnT d'Sp1 marcat amb  $^{35}$ S. En el carril 4, la mostra fou incubada en presència de 10  $\mu$ M de rosiglitazona. El carril 1 representa el 10 % del volum del TnT d'Sp1 emprat en l'assaig. Després de 4 hores d'incubació a 4°C i la purificació amb sefarosa de les proteïnes unides, es va resoldre en un gel d' SDS-poliacrilamida al 10 %, que es tenyí amb colorant de *Coomassie* per comprovar la integritat de les proteïnes recombinants. Posteriorment es revelà el resultat per fluorografia.

Com s'observa a la figura R-43, quan s'incuba GST sola amb el TnT d'Sp1 marcat amb  $^{35}$ S, no s'observa interacció entre ambdues proteïnes (carril 2). En canvi, quan s'incuba la proteïna de fusió GST-PPAR $\gamma$  amb el TnT d'Sp1, s'observa una interacció directa proteïna-proteïna entre PPAR $\gamma$  i Sp1 (carril 3) i aquesta interacció no és mes intensa quan s'incuba PPAR $\gamma$  i Sp1 en presència de rosiglitazona (carril 4). Aquests resultats suggereixen que PPAR $\gamma$ , *in vitro*, interacciona físicament amb Sp1 de manera independent de lligant.

## 18. CARACTERITZACIÓ DELS LLOCS D'UNIÓ A PPAR $\gamma$ .

Com ja hem demostrat anteriorment (figura R-26 i R-27), Sp1 s'uneix a la regió rica en GC del promotor del gen AACS. En el present treball també ens hem plantejat si PPAR $\gamma$  era capaç d'interaccionar amb aquesta seqüència, modulant així l'expressió de l'AACS.

Per tal de determinar si PPAR $\gamma$  s'uneix a la regió rica en GC del promotor de l'AACS *in vitro*, es dugueren a terme experiments de *pull-down* amb oligos biotinitats, incubant aquests oligonucleòtids, corresponents a les seqüències Sp1-*wt* i Sp1-*mut*, amb extractes proteics de la línia cel·lular HIB-1B, transfectades transitòriament amb

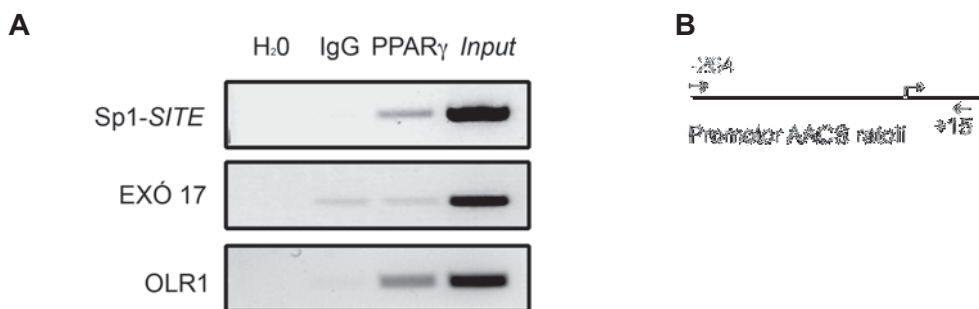
la construcció HA-PPAR $\gamma$ . A continuació, s'analitzà la presència de PPAR $\gamma$  en els complexos proteics atrapats amb estreptavidina-agarosa, mitjançant transferència *Western* emprant un anticòs específic contra l'etiqueta HA.



**FIGURA R-44. Reclutament de PPAR $\gamma$  a través de les caixes GC del promotor del gen AACS humà. A:** esquema dels oligonucleòtids emprats. Es detallen les seqüències de les caixes GC en negreta (Sp1-wt) i de les caixes GC mutades en negreta i subratllades (Sp1-mut) **B:** Assaig de *pull-down* amb oligos Sp1-Wt (WT) i Sp1-mut (Mut) biotinitats i extractes proteics de cèl·lules HIB-1B (200  $\mu$ g) transfectades amb la construcció PPAR $\gamma$ -HA (10  $\mu$ g). 24 hores després de la transfecció, es tractaren les cèl·lules amb 10  $\mu$ M de rosiglitazona durant 24 hores més. Els complexos atrapats amb estreptoavidina-agarosa foren sotmesos a SDS-PAGE i posterior *Western blot* en front a un anticòs contra HA (dilució 1:200).

A la figura R-44 es pot observar que PPAR $\gamma$  interacciona amb una sonda que conté la seqüència corresponent a les quatre caixes GC del promotor proximal del gen AACS humà i que dita interacció és pràcticament nul·la quan s'incuben els mateixos extractes proteics amb una sonda que conté les caixes GC mutades.

Per tal d'analitzar si la proteïna PPAR $\gamma$  interacciona *in vivo* amb el promotor del gen AACS, es dugueren a terme experiments d'immunoprecipitació de cromatina, *ChIPs*, amb un anticòs contra PPAR $\gamma$ . En aquest cas, s'emprà com a control negatiu una regió distal continguda a l'exó 17 del gen AACS i com a control positiu s'amplificà la regió promotora del gen OLR1, compresa entre els nucleòtids -382 a -192, on s'ha descrit l'existència d'un PPRE funcional (Chui *et al.*, 2005). Tal com es mostra a la figura R-45, PPAR $\gamma$  es troba associat al promotor proximal del gen AACS.

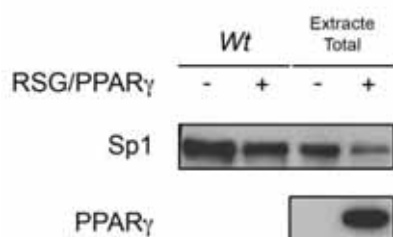


**FIGURA R-45. PPAR $\gamma$  interacciona amb el promotor proximal del gen AACS.** **A:** Cromatina aïllada de cèl·lules 3T3L1 a dia 6 de diferenciació fou immunoprecipitada amb un anticòs contra PPAR $\gamma$  o sèrum preimmune (IgG). El DNA immunoprecipitat s'analitzà per PCR amb oligonucleòtids específics dels gens AACS i OLR1 de ratolí. **B:** Regió del promotor amplificat i localització dels oligonucleòtids emprats.

En conjunt, aquests resultats suggereixen que PPAR $\gamma$ , a través de les seqüències riques en GC del promotor proximal i mitjançant la interacció amb Sp1, és capaç d'activar transcripcionalment el gen AACS.

## 19. LA UNIÓ D'Sp1 A LES CAIXES GC NO ÉS DEPENDENT DE ROSIGLITAZONA.

Per tal de provar si el tractament amb l'agonista específic de PPAR $\gamma$ , rosiglitazona, afecta a la unió de la proteïna Sp1 a les caixes GC del promotor proximal del gen AACS humà, es realitzaren experiments de *pull-down* amb oligos biotinitats, incubant els oligonucleòtids, corresponents a les seqüències Sp1-*wt* i Sp1-*mut*, amb extractes proteics de la línia cel·lular HIB-1B transfectades o no amb la construcció HA-PPAR $\gamma$  i amb absència o presència de tractament amb rosiglitazona. L'anàlisi d'Sp1 en els complexos proteics indica que la unió d'Sp1 a les caixes GC del promotor del gen AACS és independent de la presència de PPAR $\gamma$ , així com del tractament amb rosiglitazona (figura R-46).

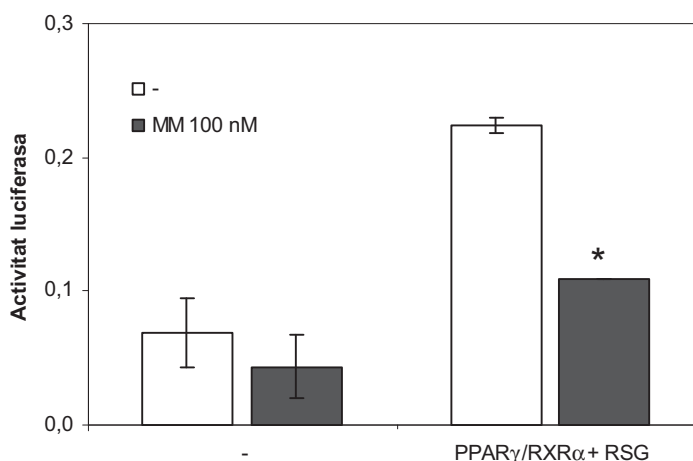


**FIGURA R-46. La unió d'Sp1 a les caixes GC és independent del tractament amb rosiglitazona.** Assaig de *pull-down* amb oligos Sp1-*Wt* (WT) biotinitats i extractes proteics de cèl·lules HIB-1B (200  $\mu$ g) transfectades o no amb la construcció PPAR $\gamma$ -HA (10  $\mu$ g) i tractades amb 10  $\mu$ M de rosiglitazona o vehicle durant 24 hores així com s'indica a la figura. Els complexos atrapats amb estreptoavidina-agarosa foren sotmesos a SDS-PAGE i posterior *Western blot* en front a un anticòs contra Sp1 (dilució 1:1000). En el panell inferior es mostra la comprovació de la transfecció amb la construcció PPAR $\gamma$ -HA mitjançant *Western blot* en front a HA (1:200).



## 20. EFECTE DE LA MITRAMICINA EN LA TRANSACTIVACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN AACS HUMÀ PER PPAR $\gamma$ .

Per provar que Sp1 estava implicat en la inducció del gen AACS per PPAR $\gamma$ , es realitzaren experiments de transfecció transitòria en la línia cel·lular HIB-1B, incubant les cèl·lules en presència de mitramicina i cotransfectant amb l'heterodímer PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ . No es va transfectar el vector d'expressió d'Sp1 ja que els nivells endògens de la proteïna en les cèl·lules HIB-1B són elevats (figura R-26 i R-46).



**FIGURA R-47. Sp1 està implicat en la inducció del gen AACS humà per PPAR $\gamma$ .** Transfecció transitòria en la línia cel·lular HIB-1B amb la construcció reportera -1425 (-1425/+79) cotransfectada amb o sense els vectors d'expressió d'RXR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  i amb tractament amb rosiglitazona (RSG; 10  $\mu$ M) o vehicle (DMSO) i/o mitramicina (MM; 100 nM) o vehicle (etanol). Es mostren els valors de luciferasa total normalitzats per *renilla* (mitjana de 3 experiments  $\pm$  desviació estàndard). \* $p < 0.001$  vs. absència de tractament amb mitramicina.

L'activitat basal del promotor del gen AACS disminueix pel tractament amb mitramicina ja que la unió d'Sp1 a la regió rica en GC del promotor proximal és essencial per al funcionament d'aquest promotor (figura R-28). Per altra banda, en la figura R-47 s'observa que el tractament amb mitramicina disminueix l'activació del promotor produïda per la cotransfecció amb l'heterodímer PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  i pel tractament amb rosiglitazona, indicant que el factor de transcripció Sp1 està implicat en la inducció del gen AACS per PPAR $\gamma$ .



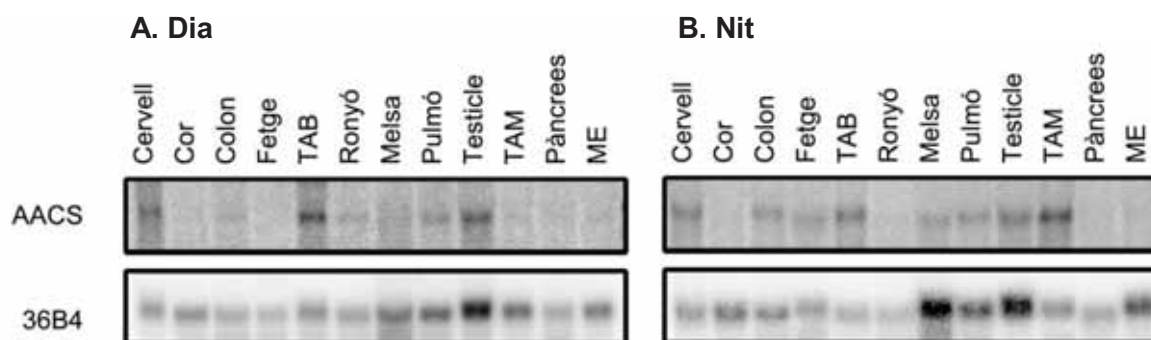
**RITME CIRCADIARI**



## 1. PATRÓ D'EXPRESSIONI DEL GEN AACS EN RATES.

En els teixits extrahepàtics de mamífers, l'acetoacetat és activat a acetoacetil-CoA per l'enzim succinil-CoA:3-oxoàcid CoA-transferasa (EC 2.8.3.5.; SCOT) i emprat com a font d'energia pel mitocondri (Tildon *et al.*, 1972b; Robinson *et al.*, 1980). Per altra banda, en el citosol dels teixits lipogènics, l'enzim AACS activa l'acetoacetat a acetoacetil-CoA, que és emprat per a la biosíntesi de colesterol i àcids grassos (Endemann *et al.*, 1982).

Per tal d'aprofundir en el paper fisiològic del gen AACS es realitzà un patró d'expressió per transferència *Northern* amb mostres d'RNA obtingudes a partir de rates mascles sacrificades en el temps circadiari 4 (CT 4) i CT 12 (on CT 0 és la fase lumínica subjectiva que s'inicia a les 8:00 h, i CT 12 és la nit subjectiva que s'inicia a les 20:00 h).



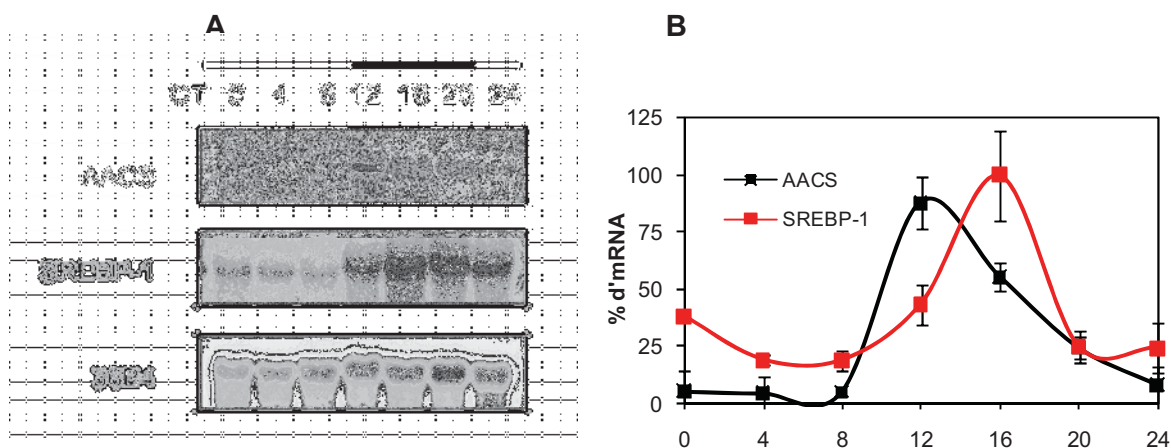
**FIGURA R-48. Patró d'expressió del gen AACS en rata.** S'analitzaren els nivells d'mRNA del gen AACS per transferència *Northern* en diferents teixits de rates mascles sacrificades a CT 4 (A) i a CT 12 (B). Es carregaren 20 µg d'RNA total. En ambdós casos s'emprà la sonda corresponent al cDNA de 36B4 com a control de càrrega.

Els nivells d'expressió del gen AACS són elevats en teixits lipogènics però l'expressió en teixit adipós marró (TAM) i fetge, únicament es detecta en les mostres obtingudes durant la fase fosca (CT 12) de manera que existeix un patró d'expressió diferencial que és depenent de l'hora del dia en què es sacrificaren les rates.

## 2. RITME CIRCADIARI.

El metabolisme intermediari està subjecte a variacions rítmiques, basades en l'adaptació evolutiva de l'organisme al seu ambient. L'oscil·lació gènica durant el ritme circadiari s'ha observat no sols en el nucli supraquiasmàtic (Weaver *et al.*, 1998) sinó també en diferents teixits perifèrics, on aproximadament el 5-10% del transcriptoma està subjecte a oscil·lació circadiària (Albrecht *et al.*, 2003).

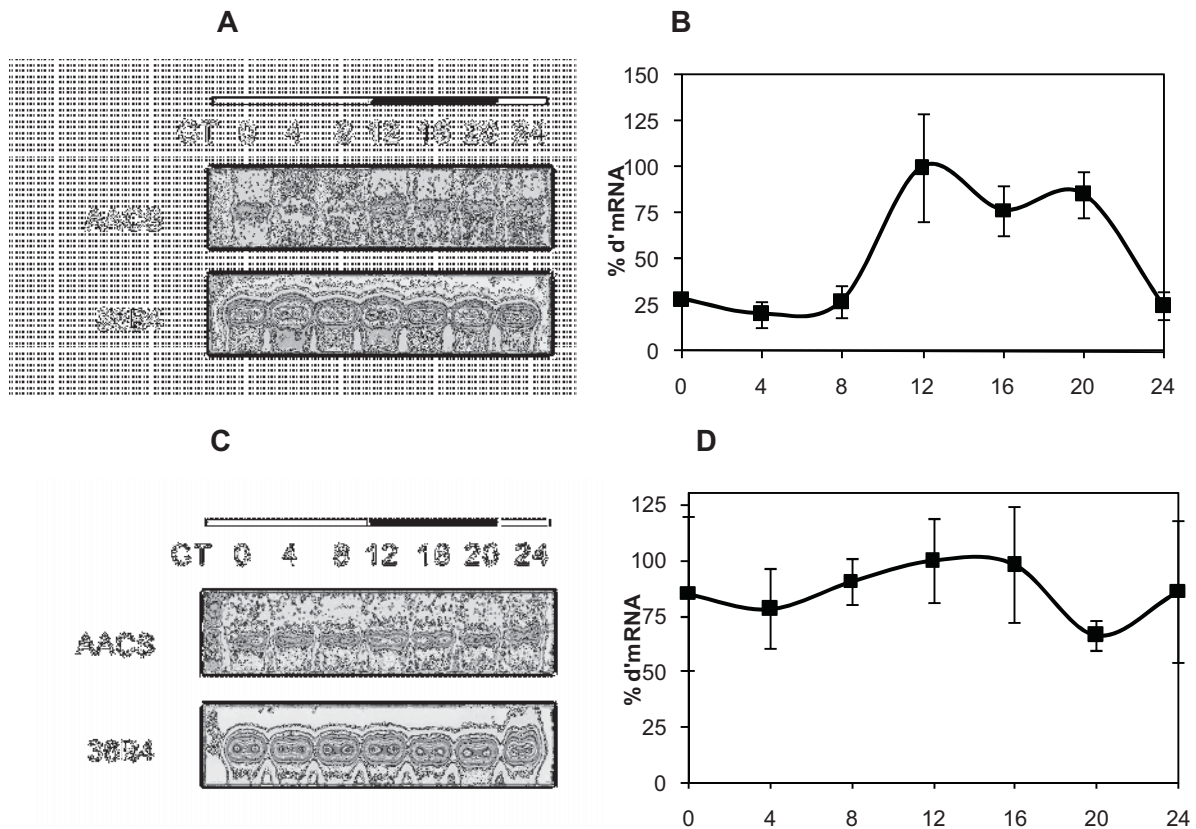
Per provar la hipòtesi que el gen AACS es regula durant el ritme circadiari en fetge, s'analitzà l'expressió del mateix en termes d'mRNA, en rates sacrificades cada 4 hores, durant un període de 24 hores, mantingudes en un cicle de llum/foscors de 12:12 i alimentades *ad libitum*. També s'analitzà l'expressió d'SREBP-1, ja que s'ha descrit que es regula durant el ritme circadiari en fetge, jugant així un paper central en el control de les variacions diürnes en el metabolisme dels seus gens diana (Brewer *et al.*, 2005).



**FIGURA R-49. Expressió rítmica del gen AACS i SREBP-1 en fetge.** (A) Northern blot representatiu del gen AACS i SREBP-1. Es van extreure mostres de fetge cada 4 hores en rates mascles ( $n = 3$ ) mantingudes en un cicle llum/foscors 12:12 i alimentades *ad libitum*. Es carregaren 20  $\mu\text{g}$  d'RNA total. L'RNA de 36B4 s'inclou com a control de càrrega. (B) Quantificació de l'mRNA dels gens AACS (negre) i SREBP-1 (vermell) durant el ritme circadiari per densitometria emprant el programa informàtic *Image Quant TL*. El valor d'expressió màxim es representa com al 100%. Les corbes representen el % d'mRNA normalitzat respecte als temps circadianis (on CT 0 és la fase lumínica subjectiva que s'inicia a les 8:00 h, i CT 12 és la nit subjectiva que s'inicia a les 20:00 h)

Els nivells d'mRNA del gen AACS en fetge són indetectables durant la fase lumínica, s'incrementen ràpidament en l'inici de la fase fosca i disminueixen gradualment fins a assolir el nadir en CT 24. Així mateix, els nivells d'SREBP-1 mostren una expressió diària rítmica amb un pic d'expressió en la primera etapa del període de foscors, coincidint amb la major activitat dels rosegadors (figura R-49).

Altres teixits on l'AACS s'expressa abundantment són el teixit adipós blanc (TAB) i el cervell (Ito *et al.*, 1986) de manera que també s'analitzà l'expressió del gen AACS, en termes d'mRNA, durant el ritme circadiari en aquests teixits.



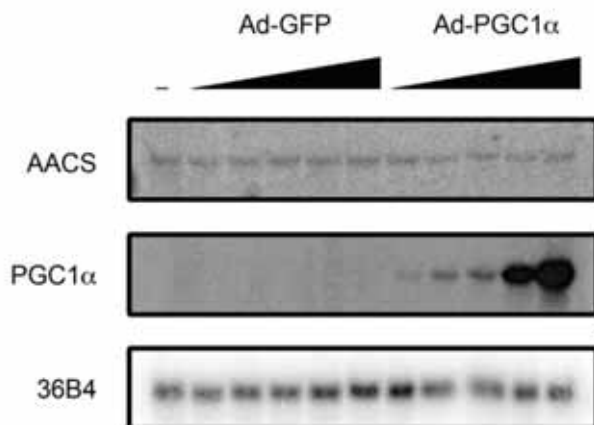
**FIGURA R-50. Anàlisi de l'expressió del gen AACS en TAB i cervell durant el ritme circadiari.** *Northern blot* representatiu del gen AACS en TAB (dipòsit subcutani) (A) i en cervell (C). Es van extreure mostres cada 4 hores en rates mascles (n= 3) mantingudes en un cicle llum/fosc 12:12 i alimentades *ad libitum*. Es carregaren 10 µg i 20 µg d'RNA total en TAB i en cervell, respectivament. L'RNA de 36B4 s'inclou com a control de càrrega. B: L'RNA total extret a partir del dipòsit subcutani de TAB fou retrotranscrit a cDNA i analitzat per RT-PCR a temps real amb sonda *Taqman* específica per al gen AACS. D: Quantificació de l'mRNA del gen AACS durant el ritme circadiari en cervell per densitometria de *Northern blot* emprant el programa informàtic *Image Quant TL*. El valor d'expressió màxim es representa com al 100%. Les corbes representen el % d'mRNA normalitzat amb 36B4 respecte als temps circadianis (on CT 0 és la fase lumínica subjectiva que s'inicia a les 8:00 h, i CT 12 és la nit subjectiva que s'inicia a les 20:00 h).

A la figura R-50 s'observa com l'expressió del gen AACS en teixit adipós blanc (TAB) està sota control del ritme circadiari amb un patró semblant a l'observat en el fetge, encara que de menor intensitat rítmica. En canvi, en el cervell no s'observa ciclació, indicant que l'efecte del ritme circadiari sobre el gen AACS és teixit específic.

### 3. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DEL GEN AACS PER PGC1 $\alpha$ .

PGC-1 $\alpha$  és un coactivador transcripcional que regula el metabolisme energètic adaptatiu en diferents teixits (Leone *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005). S'ha descrit que l'expressió dels gens BMAL i CLOCK es veu induïda en hepatòcits que sobreexpressen el factor PGC-1 $\alpha$  mitjançant adenovirus recombinants (Liu *et al.*, 2007). A més, dels 335 gens descrits que cicleu en fetge (Panda *et al.*, 2002), 47 s'indueixen més d'1.8 vegades per la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  en el mateix sistema cel·lular, amb la màxima expressió de la majoria d'aquests gens durant l'inici de la fase fosca.

Com que el gen AACS es regula durant el ritme circadiari, mostrant un pic d'expressió a l'inici de la fase fosca, coincidint amb el patró de ritmicitat descrit per PGC-1 $\alpha$  (Liu *et al.*, 2007), es va voler comprovar si l'expressió del gen AACS estava sota control d'aquest cofactor. Així, s'analitzaren els nivells d'mRNA de l'AACS, mitjançant la tècnica de *Northern blot*, en hepatòcits de rata infectats amb MOI creixents de l'adenovirus de GFP (Ad-GFP) i de PGC-1 $\alpha$  (Ad-PGC1 $\alpha$ ).



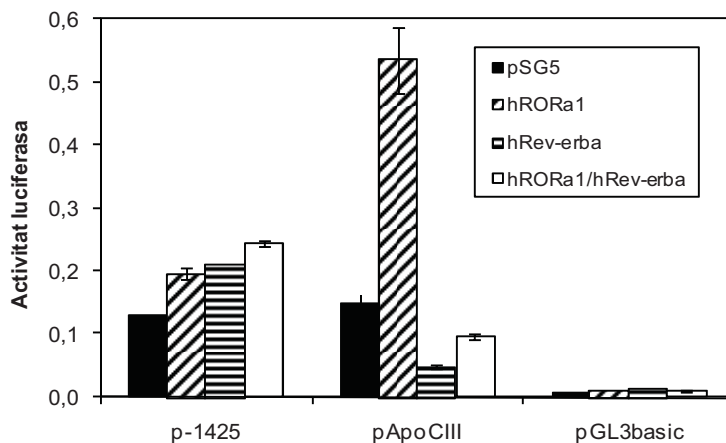
**FIGURA R-51. Efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  sobre l'expressió del gen AACS.** Hepatòcits aïllats a partir de fetge de rata foren infectats amb quantitats creixents dels adenovirus de GFP (Ad-GFP) i PGC-1 $\alpha$  (Ad-PGC1 $\alpha$ ) (0.2; 0.5; 1; 2; 5 MOI) i s'incubaren durant 48 hores. 20  $\mu$ g d'RNA foren sotmesos a *Northern blot* emprant una sonda específica del gen AACS i de PGC1 $\alpha$ . S'emprà la sonda 36B4 com a control de càrrega.

PGC-1 $\alpha$  no promou l'expressió del gen AACS a cap de les MOI testades (figura R-51) de manera que no es pot atribuir la variació de l'expressió del gen AACS durant el dia a aquest coactivador, malgrat que ambdós posseeixin el mateix patró d'expressió rítmica.

#### 4. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DEL GEN AACS PELS RECEPTORS NUCLEARS ROR $\alpha$ I Rev-erb $\alpha$ .

Els receptors nuclears orfes Rev-erb $\alpha$  i ROR $\alpha$  estan implicats en el control del funcionament del rellotge circadiari (Ueda *et al.*, 2002; Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Yin *et al.* 2006). Ambdós receptors reconeixen elements de resposta semblants encara que tenen activitats transcripcionals oposades (Giguère *et al.*, 1999) de manera que mitjançant la unió als dos ROREs presents en el promotor del gen BMAL, Rev-erb $\alpha$  inhibeix la transcripció del mateix mentre que ROR $\alpha$ , l'activa.

Mitjançant el *software* TFSearch (versió 1.3) es localitzà un putatiu RORE en el promotor del gen AACS humà en les posicions -757/-744 respecte a l'inici de transcripció. Per tal d'atribuir l'expressió rítmica del gen AACS en fetge a la sobreexpressió de ROR $\alpha$ /Rev-erb- $\alpha$ , es realitzaren assajos de gen reporter en la línia cel·lular HepG2, cotransfectant la construcció reportera p-1425 (-1425/+79) i els vectors d'expressió dels factors ROR $\alpha$  i Rerv-erb $\alpha$ . S'emprà el promotor del gen apoCIII com a control positiu (Coste *et al.*, 2002).



**FIGURA R-52. ROR $\alpha$  i Rev-erb $\alpha$  no regulen l'activitat promotora del gen AACS humà.** Transfecció transitòria de la línia cel·lular HepG2 amb les construccions reporteres p-1425 (-1425/+79), pApoCIII (-1408/+24) i pGL3basic cotransfectades amb els receptors nuclears ROR $\alpha$  i Rev-erb $\alpha$ . Es mostren els valors de luciferasa normalitzats per *renilla*.

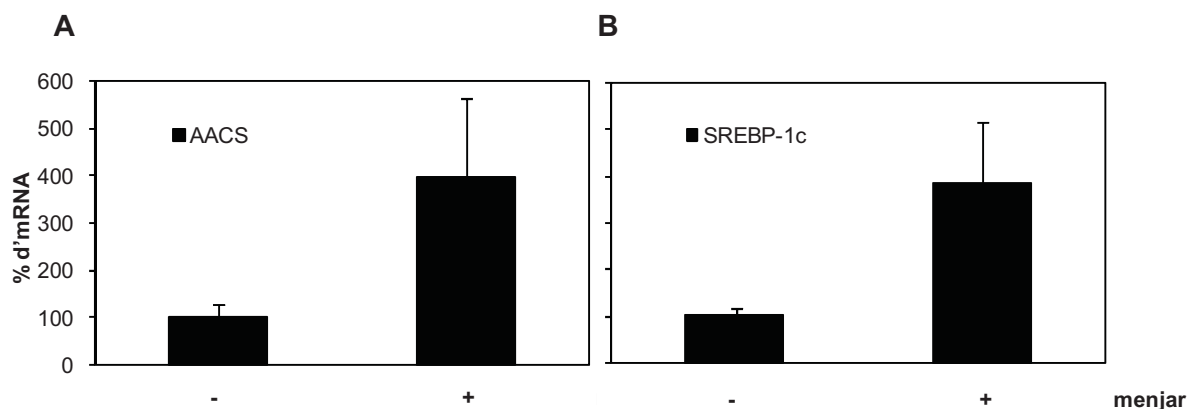
Com es mostra a la figura R-52 la regió promotora del gen AACS humà estudiada (-1425/+79 respecte a l'inici de transcripció), no és regulada pels receptors nuclears orfes ROR $\alpha$  ni Rev-erb $\alpha$ , suggerint que el putatiu RORE predit *in silico* no és funcional.

En canvi, el promotor del gen ApoCIII, emprat com a control positiu, s'indueix quan es cotransfecta amb el vector d'expressió de ROR $\alpha$  i es reprimeix per la cotransfecció amb Rev-erb $\alpha$ .

## 5. RESTRICCIÓ TEMPORAL DEL MENJAR I RITME CIRCADIARI.

Una de les funcions principals dels oscil·ladors circadianis en les cèl·lules hepàtiques és l'anticipació i adaptació a les condicions fisiològiques necessàries per al processament del menjar (Damiola *et al.*, 2000). Els rosegadors són animals nocturns, que consumeixen més d'un 80% del menjar durant la fase fosca, si estan mantinguts sota un cicle de llum:fosc 12:12 i si el menjar és ofert *ad libitum*. Així, els fetges de ratolins alimentats exclusivament durant la nit o *ad libitum* mostren el mateix patró d'expressió gènica.

Amb la finalitat d'elucidar si el zenit observat per l'expressió del gen AACS i la inducció d'SREBP-1 en l'inici de la fase fosca era atribuïble a la dieta, es van dividir les rates en dos grups experimentals: un grup d'animals disposava de menjar i l'altre no en tenia durant la transició entre la fase lumínica i la fase fosca (materials i mètodes secció 17.2). Tots els animals foren sacrificats en CT 13.



**FIGURA R-53. La restricció temporal del menjar altera el patró d'expressió rítmic dels gens AACS i SREBP-1c en el fetge.** Rates mascles (n =3 per grup) foren dejunades durant la fase lumínica i a CT 11.5 es mantingueren dejunades o es realimentaren durant 1h 30 min. A CT 13 es sacrificaren els animals i l'RNA total extret a partir del fetge fou retrotranscrit a cDNA i analitzat per *real-time* RT-PCR amb sonda *Taqman* específica per al gen AACS (A) i SREBP-1c (B). En el gràfic s'assigna el valor del 100% a l'mRNA normalitzat amb 36B4 del grup de rates que no disposen de menjar i la resta de valors es representen relatius a aquest. Es mostren els valors de dos experiments independents.

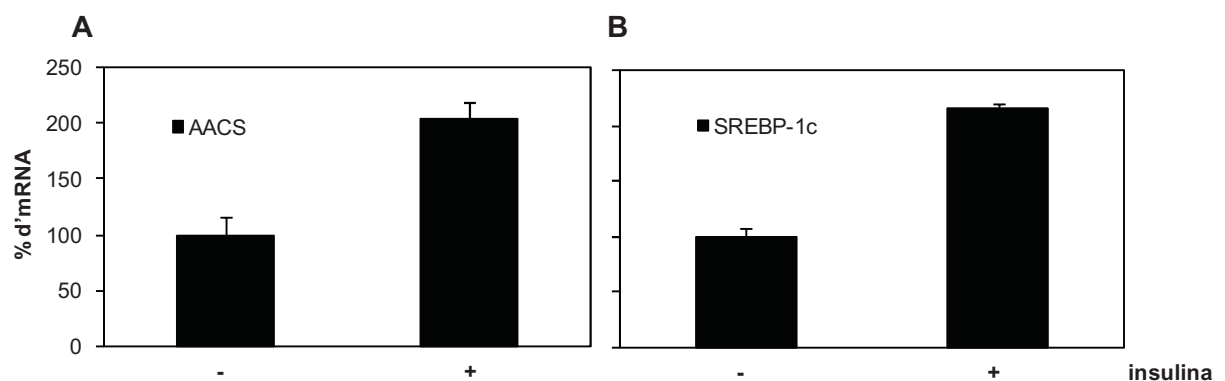


Com ja s'ha descrit anteriorment (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001), el menjar constitueix un *Zeitgeber* dominant per a la ritmicitat gènica en fetge. Així, a la figura R-53 es mostra que l'increment de l'expressió dels gens AACS i SREBP-1c en l'inici de la fase fosca sols es dóna en aquelles rates que han disposat de menjar durant la transició entra la fase lumínica i fase fosca.

## 6. INSULINA I RITME CIRCADIARI.

La ritmicitat en el fetge podria respondre a diferents senyals que estan directament associats amb el menjar com ara el gust, la distensió de l'estómac, l'increment de metabòlits o els canvis en els nivells d'hormones com ara la insulina (Kuriyama *et al.*, 2004) o la corticosterona (Le Minh *et al.*, 2001).

Per provar la hipòtesi que la manca d'inducció a l'inici de la fase fosca dels gens AACS i SREBP-1c per no disponibilitat de menjar durant la transició llum-fosc, es podia compensar amb l'administració d'insulina, es van dividir les rates en dos grups experimentals: en el CT 11.5 a un grup s'injectà 2 mU/Kg d'insulina i a l'altre, el volum equivalent de sèrum fisiològic. Els animals foren sacrificats a CT 13 (materials i mètodes secció 17.3).

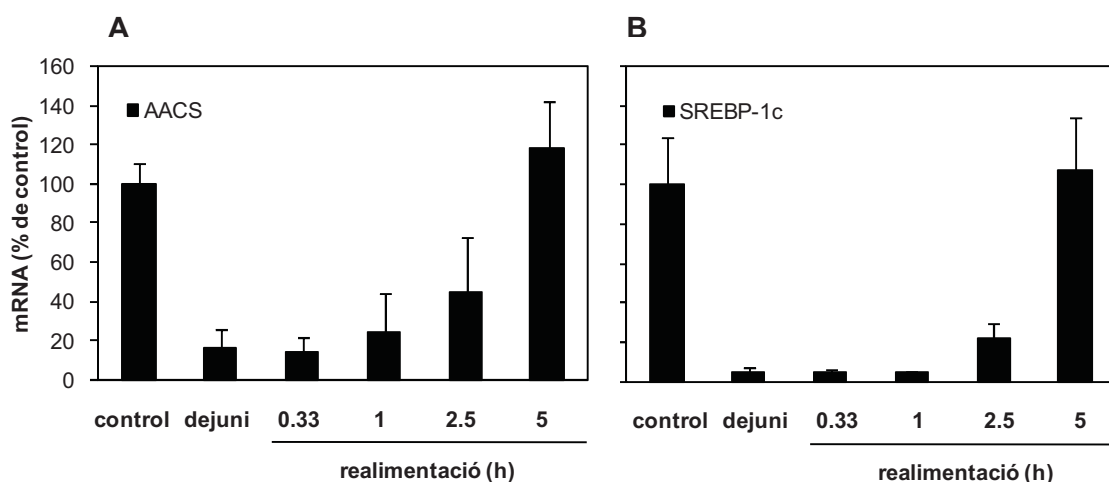


**FIGURA R-54. L'administració d'insulina recupera part de la inducció dels gens AACS i SREBP-1c durant l'inici de la fase fosca en rates que no disposen de menjar durant la transició llum-fosc.** Rates mascles ( $n = 3$  per grup) foren dejunades durant la fase lumínica i a CT 11.5 s'injectaren 2 mU/kg d'insulina (ins) o bé l'equivalent en sèrum fisiològic (SF). Es sacrificaren els animals a CT 13 i l'RNA total extret a partir del fetge fou retrotranscrit a cDNA i analitzat per *real-time* RT-PCR amb sonda *Taqman* específica per al gen AACS (A) i SREBP-1c (B). En el gràfic s'assigna el valor del 100% a l'mRNA normalitzat amb 36B4 del grup de rates tractades amb sèrum fisiològic i la resta de valors es representen relatius a aquest.

A la figura R-54 es mostra com l'administració d'insulina just abans de l'inici de la fase fosca (CT 11.5) pot recuperar part de l'expressió dels gens AACS i SREBP-1c en fetge de rates que no disposen de menjar durant la transició llum-fosc.

## 7. EXPERIMENTS DE REALIMENTACIÓ DURANT LA FASE LUMÍNICA.

Amb l'objectiu d'estudiar l'efecte del dejuni i la realimentació sobre l'expressió dels gens AACS i SREBP-1c durant la fase lumínica, quan l'expressió d'ambdós gens és mínima (figura R-49), es van dividir rates en sis grups experimentals (n=3). El primer grup d'animals fou alimentat *ad libitum* i sacrificat a CT 1. En aquest mateix instant, la resta de grups d'animals foren dejunats durant un període de 24 hores (de CT1 a CT1 del dia següent) i un grup fou sacrificat (dejuni). La resta d'animals foren realimentats amb una dieta estàndard i sacrificats a diferents temps durant la fase lumínica (CT 1.33; CT 2; CT 3.5 i CT 6, després de 20 minuts, 1 hora, 2.5 hores i 5 hores de realimentació, respectivament) (materials i mètodes secció 17.4). S'analitzaren els nivells d'mRNA de l'AACS i d'SREBP-1c en fetge mitjançant la tècnica de la RT-PCR en temps real.

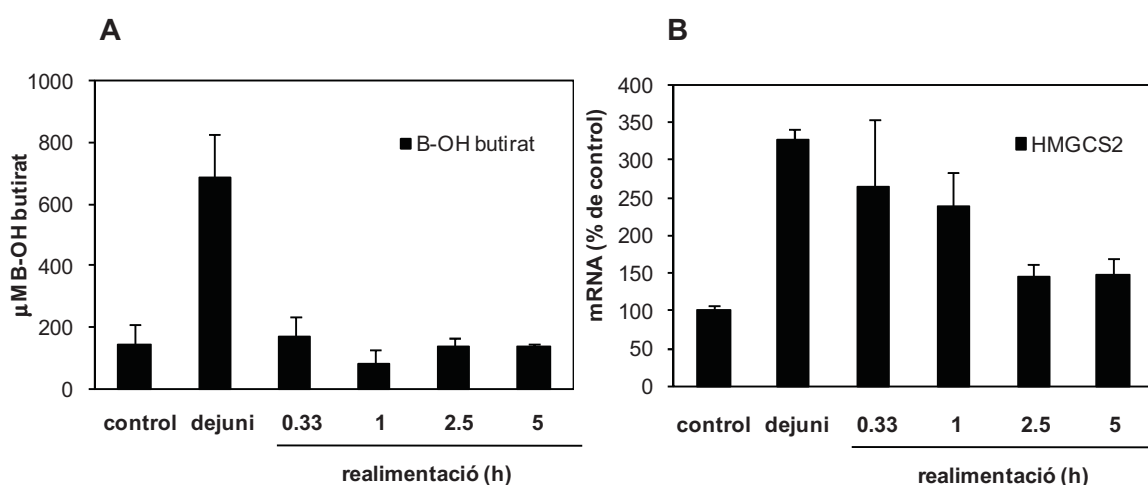


**FIGURA R-55. Patró d'expressió dels gens AACS i SREBP-1c durant el dejuni i realimentació.** Rates mascles (n =3 per grup) foren alimentades *ad libitum* (control), dejunades durant 24 hores (dejuni) i realimentades, després d'un dejuni de 24 hores durant 0.33, 1, 2.5 i 5 hores. L'RNA total extret a partir del fetge fou retrotranscrit a cDNA i analitzat per RT-PCR en temps real amb sonda *Taqman* específica per al gen AACS (A) i SREBP-1c (B). En el gràfic s'assigna el valor del 100% a l'mRNA normalitzat amb 36B4 del grup de rates control (no dejunades) i la resta de valors es representen relatius a aquest.

Els nivells d'mRNA de l'AACS i d'SREBP-1c disminueixen durant el dejuni i s'incrementen de manera gradual amb la realimentació. No obstant això, és únicament després de 5 hores de realimentació que s'assoleixen els valors del control (figura R-55). En canvi, quan es realimenten els animals just abans de l'inici de la fase fosca (CT 11.5; figura R-53), quan el "comportament del menjar" s'inicia, la inducció (de 4 vegades) dels gens AACS i SREBP-1c es dona en tan sols 1 hora i 30 minuts.

Aquests resultats podrien estar indicant que, malgrat el menjar constitueix un *Zeitgeber* dominant per a la ritmicitat gènica en fetge, existeix un mecanisme de regulació depenent del rellotge molecular (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001). Una segona opció per explicar els resultats obtinguts podria ser que els animals no haguessin menjat, ja que com tots els rosegadors, les rates s'alimenten durant la nit.

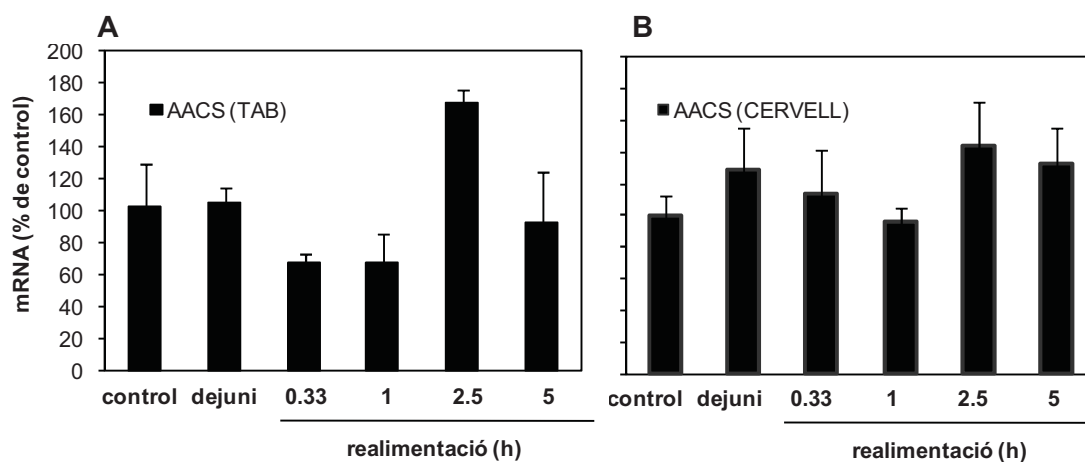
Per descartar la possibilitat de que les rates no haguessin ingerit menjar durant el període de realimentació s'analitzaren els nivells de cossos cetònics en plasma, reflex de l'estat d'alimentació dels animals, i l'expressió del gen HMGCS2, que constitueix el major punt de control de la cetogènesi.



**FIGURA R-56. Mesura de cossos cetònics i anàlisi de l'expressió del gen HMGCS2 durant el dejuni i realimentació.** Mesura de cossos cetònics totals en sèrum (A) i quantificació de l'mRNA (20 µg) en fetge del gen HMGCS2 relatiu a 36B4 per densitometria de Northern blot emprant el programa informàtic Image Quant TL (B), de rates alimentades *ad libitum* (control), dejunades durant 24 hores (dejuni) i realimentades, després d'un dejuni de 24 hores, durant 0.33, 1, 2.5 i 5 hores.

Com s'observa a la figura R-56, després de 24 hores de dejuni els cossos cetònics s'incrementen dràsticament i retornen al valor del control en sols 20 minuts de realimentació, indicant que després d'un període de dejuni prolongat (24 hores), les rates mengen encara que sigui durant l'inici de la fase lumínica. Els nivells d'mRNA del gen HMGCS2 s'incrementen pel dejuni i disminueixen d'una manera més gradual que els nivells de cossos cetònics, suggerint l'existència d'un mecanisme post-traduccional adjacent de regulació de l'activitat d'aquest enzim.

A continuació s'analitzà l'expressió del gen AACS en termes d'mRNA durant el dejuni i realimentació en el teixit adipós blanc (TAB) i en cervell.



**FIGURA R-57. Anàlisi de l'expressió del gen AACS en teixits extrahepàtics durant la realimentació diürna.** Rates mascles ( $n = 3$  per grup) foren alimentades *ad libitum* (control), dejunades durant 24 hores (dejuni) i realimentades, després d'un dejuni de 24 hores durant 0.33, 1, 2.5 i 5 hores, respectivament. **(A)** L'RNA total extret a partir del TAB fou retrotranscrit a cDNA i analitzat per RT-PCR en temps real amb sonda *Taqman* específica per al gen AACS **(B)** Quantificació de l'mRNA (10  $\mu$ g) en cervell del gen AACS relatiu a 36B4 per densitometria de *Northern blot* emprant el programa informàtic *Image Quant TL*. En el gràfic s'assigna el valor del 100% a l'mRNA normalitzat amb 36B4 del grup de rates control (no dejunades) i la resta de valors es representen relatius a aquest.

A la figura R-57 no s'observen canvis a nivell d'mRNA de l'AACS en teixit adipós blanc (TAB) ni en cervell pel dejuni i realimentació diürna, suggerint que la regulació transcripcional del gen AACS durant aquesta situació fisiològica és teixit específica.

**DISCUSSIÓ**



## 1. DETERMINACIÓ DELS PARÀMETRES CINÈTICS DE LA PROTEÏNA AACS HUMANA.

Com no existien dades que demostrassin l'activitat enzimàtica de la seqüència predita del cDNA del gen AACS humà (Ohgami *et al.*, 2003), en el present treball hem demostrat que aquesta seqüència publicada en el *GenBank* (NM 023928) codifica per una proteïna funcional. Per això, s'ha clonat aquest cDNA en el vector pGEX4T3 i s'ha expressat i purificat a partir d'un cultiu d'*E. coli* BL21, obtenint-se una proteïna de fusió amb la glutatió-S-transferasa (figura R-1A). Un cop comprovada la identitat de la proteïna per transferència *Western* amb anticossos específics contra l'AACS (figura R-1B), s'ha assajat i determinat les característiques cinètiques de la proteïna GST-AACS, mitjançant la mesura espectrofotomètrica de l'acetoacetil-CoA produït, essent les constants de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de 37.6  $\mu\text{M}$ , 155.24  $\mu\text{M}$  i 2.3  $\mu\text{M}$  per l'acetoacetat, l'ATP i el CoA, respectivament (figures R-2, R-3 i R-4).

En iniciar aquest treball, existien publicades les constants cinètiques de la proteïna AACS purificada a partir del bacteri *Zoogloea ramigera* I-16-M (Fukui *et al.*, 1982) i a partir de rata (Ito *et al.*, 1984). En el cas del bacteri, s'han obtingut unes  $K_m$  de 76  $\mu\text{M}$ , 33  $\mu\text{M}$  i 91  $\mu\text{M}$  per l'acetoacetat, l'ATP i el CoA, respectivament, mentre que en rata, les  $K_m$  són de 8  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  per l'acetoacetat, l'ATP i el CoA, respectivament.

Malgrat la gran similitud (89.3 %) de les seqüències aminoacídiques entre l'AACS humana i la de rata, les  $K_m$  obtingudes són molt diferents (37.6  $\mu\text{M}$  *versus* 8  $\mu\text{M}$ ). Aquestes diferències podrien reflectir: a) Diferències en el mètode d'assaig emprat, ja que en la determinació de les constants cinètiques de rata s'assajà a pH 6.5-7.4 mentre que en el present treball, l'assaig s'ha dut a terme a pH 8.4. De fet, la mesura de la constant d'afinitat de l'AACS per l'acetoacetat a partir d'extractes citosòlics de fetge de rata a pH 8.1 és de 54  $\mu\text{M}$  (Bergstrom *et al.*, 1982), valor més semblant a l'obtingut per nosaltres en la determinació de la  $K_m$  de l'enzim AACS humà. b) Alteració dels paràmetres cinètics de l'AACS degut a l'assaig d'una proteïna recombinant amb la glutatió-S-transferasa. c) Diferències intrínseques entre la proteïna AACS humana i la de rata.

L'enzim AACS humà és inhibït a 15  $\mu\text{M}$  de CoA (figura R-4) mentre que l'enzim de rata mostra inhibició pel CoA a concentracions superiors a 50  $\mu\text{M}$  (Ito *et al.*, 1984; Bergstrom *et al.*, 1985). Aquest mecanisme de regulació de l'activitat enzimàtica de l'AACS és intrínsec de mamífers ja que l'enzim purificat a partir de *Z. ramigera* no pateix inhibició per substrat (Fukui *et al.*, 1982).

Els estudis cinètics de l'acetoacetyl-CoA sintetasa també s'han dut a terme en extractes citosòlics de rata, donant lloc a valors d'activitat enzimàtica molt dispars, dependent del tipus d'assaig i de les condicions fisiològiques en les que es trobava l'animal. No obstant això, en diferents teixits perifèrics on coexisteixen ambdós enzims responsables de la utilització de cossos cetònics (SCOT i AACS), s'ha vist que l'activitat enzimàtica de l'SCOT és, generalment, més de 10 ordres de magnitud superior a l'activitat AACS, suggerint que en termes quantitius, l'AACS no és important per a la utilització de cossos cetònics, coincidint amb el paper principal d'aquests com a substrats energètics. Ara bé, quan la taxa de cetogènesi és baixa o intermèdia, l'activitat AACS podria ser d'importància qualitativa en el fraccionament de cossos cetònics entre el citosol i el mitocondri, ja que l'afinitat per l'acetoacetat de l'enzim AACS és molt superior a la de l'enzim SCOT de rata ( $K_m$  0.7 mM) (Robinson *et al.*, 1980), i l'increment en l'activitat enzimàtica de l'AACS promou la incorporació directa de l'acetoacetat a la biosíntesi lipídica.

Cal destacar que degut a la gran capacitat cetogènica del fetge, la funció dels cossos cetònics com a substrats energètics en teixits perifèrics no queda compromesa per l'activitat AACS. S'ha descrit que l'activitat de l'AACS (0.048 unitats/ g/ de fetge a 30°C) (Ito *et al.*, 1984) és una dècima part del valor de cetogènesi màxima (48  $\mu\text{mol/h/}$  per g de teixit a 25°C) obtingut en fetges perfundits amb àcids grassos (Soling *et al.*, 1966; Williamson *et al.*, 1968) i una cinquantena part de l'activitat de l'HMG-CoA sintetasa mitocondrial de fetge (2.2 unitats/ g de fetge a 25°C) (Williamson *et al.*, 1968), fet que fa pensar que aquest òrgan té prou capacitat per a proporcionar cossos cetònics tant per a la producció d'energia com per a la lipogènesi (hepàtica i extrahepàtica).



## 2. UTILITZACIÓ DE COSSOS CETÒNICS PER A LA COLESTEROGÈNESI.

Un cop comprovat que la seqüència publicada del cDNA del gen AACS humà codificava per una proteïna funcional, s'ha analitzat l'efecte de la sobreexpressió d'aquesta proteïna en la biosíntesi lipídica, concretament en la colesterogènesi, mitjançant la generació d'un sistema induïble *BD<sup>TM</sup> Tet-On Gene Expression system* en cèl·lules HeLa.

Sorprenentment, l'addició de doxiciclina en el medi de cultiu promou la lipogènesi tant en la línia cel·lular HeLa Tet-On® com en línia cel·lular HeLaAACS (figura R-7). Aquest efecte en la inducció de la biosíntesi lipídica, independent de la sobreexpressió de la proteïna AACS, ha dificultat la interpretació de les dades, de manera que tots els experiments s'han dut a terme comparant la línia cel·lular HeLaAACS amb la HeLa Tet-On®, ambdues tractades amb doxiciclina. No obstant això, el sistema Tet-On ha sigut amplament emprat per a l'estudi de gens relacionats amb el metabolisme lipídic, com per exemple per a l'estudi de apolipoproteïna A-IV (Lu *et al.*, 2005) o SREBP-1c (Wang *et al.*, 2003), sense que s'hagi descrit cap anomalia pel tractament amb l'antibiòtic.

El [<sup>14</sup>C]acetat, per acció de l'acetil-CoA sintetasa (ACS), és transformat a acetil-CoA, que pot incorporar-se a la biosíntesi d'àcids grassos o bé, per acció de la tiolasa citosòlica, ser transformat a acetoacetil-CoA, intermediari directe de la via del mevalonat. En tots els experiments assajats, el senyal radioactiu, reflex de la síntesi *de novo* de colesterol a partir de [<sup>14</sup>C]acetat, és menys intens en les cèl·lules HeLaAACS que en les cèl·lules HeLa Tet-On® (figures R-7, R-8 i R-9), suggerint que la sobreexpressió de la proteïna AACS promou l'activació de l'acetoacetat endogen a acetoacetil-CoA, que competeix amb l'acetil-CoA radioactiu per a la síntesi de colesterol, diluint el senyal radioactiu. Quan s'incuben les cèl·lules en presència d'acetoacetat, aquesta dilució del senyal radioactiu és depenent de la seva concentració (figura R-8). Aquest efecte s'observa en ambdues línies cel·lulars, degut probablement als nivells d'expressió d'mRNA endògens de l'AACS detectats en les cèl·lules HeLa Tet-On® (figura R-6), encara que és superior en les cèl·lules HeLaAACS, on s'observa fins a un 50% de reducció de colesterol radioactiu pel tractament amb 1 mM d'acetoacetat.

La capacitat del  $\beta$ -hidroxibutirat per contribuir a la síntesi lipídica ha sigut descrita per diferents autors (Yeh *et al.*, 1977; Robinson *et al.*, 1978; Endemann *et al.*, 1982; Williamson *et al.*, 1985). No obstant això, l'addició d'aquest compost en el medi de cultiu no afecta la incorporació de [ $^{14}\text{C}$ ]acetat a lípids ni en les cèl·lules HeLa Tet-On® ni en les cèl·lules HeLaAACS (figura R-9), reflex d'alguna anomalia de la línia cel·lular en el transport del  $\beta$ -hidroxibutirat cap a l'interior de la cèl·lula o cap a l'interior del mitocondri, on per acció de l'enzim  $\beta$ -hidroxibutirat deshidrogenasa, el  $\beta$ -hidroxibutirat ha de ser convertit a acetoacetat abans de ser emprat per a la biosíntesi lipídica. Aquestes dades també podrien ser reflex d'alguna deficiència en l'activitat  $\beta$ -hidroxibutirat deshidrogenasa de la línia cel·lular HeLa.

Aquest bloc confirma que l'acetoacetyl-CoA, fruit de la reacció catalitzada per l'enzim AACS, està actuant com un transportador d'unitats acetil des del mitocondri cap al citoplasma, de manera anàloga i alternativa a la via de l'ATP citrat liasa (Watson *et al.*, 1970). La contribució d'ambdós enzims a la biosíntesi lipídica ha sigut estudiada mitjançant l'ús d'inhibidors específics, com ara l'hidroxicitrat, de l'enzim ATP citrat liasa (Endemann *et al.*, 1981).

### 3. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE L'AACS I L'HMGCS1.

Diferents estudis mostren que en fetge i cervell de rata l'acetoacetyl-CoA, fruit de la reacció catalitzada per l'AACS, és incorporat de manera preferencial cap a la síntesi de colesterol (Webber *et al.*, 1979; Endemann *et al.*, 1982; Geelen *et al.*, 1983). Això implica que l'esquelet de quatre carbonis de l'acetoacetat o bé la seva forma activa, l'acetoacetyl-CoA, no s'equilibra completament amb el *pool* de dos carbonis representat per l'acetat i l'acetyl-CoA. Una de les hipòtesis que explicarien aquest fet és la possible existència d'interaccions (*channeling*) entre els primers enzims de la via de la colesterogènesi, és a dir, entre l'AACS i l'HMGCS1 (Miziorko *et al.* 1990).

Amb l'objectiu d'estudiar si l'AACS i l'HMGCS1 estan interaccionant directament *in vitro*, s'ha clonat el cDNA que codifica per a la proteïna HMGCS1 de hámster en el vector pGEX4T3 i s'ha expressat i purificat aquesta proteïna en cèl·lules *E. coli* BL21 (figura R-10). Els experiments de GST *pull-down* amb la proteïna de fusió GST-HMGCS1 i la proteïna AACS humana transcrita i traduïda *in vitro* mostren que, sota les nostres condicions experimentals, ambdues proteïnes no es troben interaccionant de manera directa (figura R-11).

Per descartar que la interacció fos indirecta, a través de la formació d'un complex multiproteic, s'han dut a terme experiments de coimmunoprecipitació de les proteïnes AACCS i HMGCS1 humanes en la línia cel·lular HeLa, tractada amb agents hipocolesterogènics per tal d'incrementar el flux de biosíntesi de colesterol, obtenint-se resultats negatius (figura R-12).

En conjunt, aquests experiments indiquen que els enzims AACCS i HMGCS1 no interaccionen ni directa ni indirectament. L'ús preferencial de l'acetoacetil-CoA per a la colesterogènesi podria ser un reflex de: a) Regulació sincronitzada d'ambdós enzims, juntament amb l'HMG-CoA reductasa, per moduladors de la síntesi de colesterol (Bergstrom *et al.*, 1984). De fet, l'acetoacetil-CoA tiolasa, enzim responsable d'establir l'equilibri entre l'acetoacetil-CoA i el *pool* d'acetil-CoA, no es regula sempre de manera sincronitzada amb els enzims colesterogènics (Balasubramaniam *et al.*, 1977; Bergstrom *et al.*, 1984). b) Característiques cinètiques dels enzims implicats en la utilització de l'acetoacetil-CoA en el citosol. Així, malgrat que el valor de la  $V_{max}$  de la reacció catalitzada per la tiolasa és molt superior al valor de la reacció catalitzada per l'HMGCS1, el valor de la  $K_m$  de la tiolasa per l'acetoacetil-CoA és molt superior al de l'HMGCS1 (50  $\mu$ M *versus* 2  $\mu$ M) (Middleton *et al.*, 1973b; Clinkenbeard *et al.*, 1975a/b) i és dos ordres de magnitud superior a la seva concentració en el citosol (0.26 nmol/g d'hepatòcits per pes; Menahan *et al.*, 1981), fet que determina que el flux de l'acetoacetil-CoA per a la biosíntesi d'àcids grassos, que implica la reacció catalitzada per la tiolasa, estigui molt limitat per la disponibilitat de substrat.

#### 4. L'ACETILACIÓ REVERSIBLE DE LISINES.

En aquest treball hem identificat a la proteïna AACCS humana com a una nova diana d'acetilació (figura R-13 i R14). La lisina compresa en el motiu PX4GK, localitzat en el centre actiu de la família de proteïnes acil:CoA ligasa, *formador* d'AMP, ha sigut identificada com a un putatiu substrat d'aquesta modificació posttraduccional (Starai *et al.*, 2002). Sorprenentment, la Lys633 localitzada en el motiu PX4GK de la proteïna AACCS humana, conservat al llarg de l'evolució (figura R-16), no constitueix un lloc d'acetilació, ja que la seva substitució per un residu d'Arg (construcció KR) no provoca canvis en l'estat d'acetilació de la proteïna (figura R-17).

L'anàlisi de la seqüència aminoacídica de la proteïna AACS humana revela la presència d'altres residus de lisina com a putatius llocs d'acetilació, entre ells la Lys634 que també es troba conservada entre les diferents espècies (figura R-16). La substitució de la Lys634 per Arg (construcció KKRR) provoca una disminució de l'estat d'acetilació de la proteïna (figura R-18) però no l'aboleix totalment, suggerint que en l'enzim AACS humà existeixen múltiples residus de lisina susceptibles de ser acetilats. De fet, la deleció de l'extrem COOH-terminal de la proteïna AACS humana (dels aminoàcids 633 a 672) provoca una disminució encara superior a l'acetilació detectada en el constructe KKRR (figura R-19), indicant que aquesta regió és determinant per a l'estat d'acetilació d'aquesta proteïna, encara que no es pot descartar la possibilitat d'altres residus de lisina acetilables en l'extrem NH<sub>2</sub>-terminal.

La localització específica dels residus de lisina acetilables de la proteïna AACS humana, incompleta fins al moment, és de gran interès per a l'estudi de l'impacte d'aquesta modificació en la funció de l'enzim, ja que l'acetilació de lisines no sols neutralitza la càrrega positiva sinó que també incrementa la hidrofobicitat i mida de la cadena lateral de l'aminoàcid, produint canvis conformacionals que donen lloc a canvis en la funció biològica que varien d'una proteïna a una altra (Glozak *et al.*, 2005).

En general els diferents processos d'acetilació es poden classificar en tres grups:

- a) L'acetilació té lloc en un o pocs residus de lisina i funciona com un simple canvi *on/off* de la funció de la proteïna. En són exemples l'acetil-CoA sintetasa (Starai *et al.*, 2002) i l'òxid nítric sintasa (Mattagajasingh *et al.*, 2007) llur acetilació inactiva l'enzim.
- b) L'acetilació té lloc en agrupacions de residus de lisina que formen paquets carregats, essent el número de residus acetilats (i no pas l'acetilació d'una lisina individual) important per a la funció biològica. En aquest cas, l'acetilació múltiple provoca un efecte de tipus calibrador o sensor. Per exemple, la cortactina és acetilada en 10 residus de lisina localitzats en el seu domini repetitiu, essent l'acetilació d'almenys una lisina de cadascuna d'aquestes repeticions suficient per a la unió de l'F-actina (Zhang *et al.*, 2007).
- c) L'acetilació interacciona amb altres modificacions posttraduccionals llur efecte és exercit de manera específica de residu, establint un codi d'informació molecular en la seqüència aminoacídica (revisat per Yang, 2005). Concretament, l'estabilització i activació de la proteïna p53 té lloc com a conseqüència de múltiples modificacions posttraduccionals (Appella *et al.*, 2000).

## 5. CARACTERITZACIÓ DEL PROMOTOR DEL GEN AACS HUMÀ.

En aquest treball s'ha clonat el promotor del gen AACS humà en el vector reporter pGL3basic (de -1425 a +79 respecte a l'inici de transcripció) amb la finalitat de caracteritzar els elements necessaris per a que es produeixi l'activitat basal i estudiar la seva regulació transcripcional per factors de transcripció implicats en l'homeòstasi lipídica:

- LXR; que regula l'homeòstasi del colesterol i estimula la síntesi d'àcids grassos (Tontonoz *et al.*, 2003; Zelcer *et al.*, 2006).
- SREBPs; implicats en l'homeòstasi del colesterol i la lipogènesi (Brown *et al.*, 1997; 1999).
- PPAR $\gamma$ ; que regula una xarxa de gens que promouen la síntesi lipídica i el seu emmagatzament en adipòcits (Tontonoz *et al.*, 1994b; Chawla *et al.*, 1994).

L'anàlisi de la seqüència gènica clonada revela que el promotor del gen AACS humà manca de caixa TATA i del motiu DPE, i conté un putatiu *Inr* consens de mamífers. A més, els primers 200 pb del promotor proximal són rics en seqüències GC, coincidint amb els consens d'unió per a proteïnes Sp1. En les regions més distals d'aquest promotor s'hi localitza un DR4, dos putatius SREs, un putatiu RORE i una *E box* (figura R-20), que es comentaran al llarg de la discussió.

Després de comprovar que el promotor clonat (construcció p-1425) té activitat reportera, s'ha deletat l'extrem 5' del mateix amb l'objectiu d'estudiar les regions importants per a la regulació transcripcional. En la construcció p-1034 (-1034/+79) s'observa una disminució de l'activitat basal respecte a p-1425, que es recupera en la construcció p-809 (-809/+79) (figura R-21). És en la regió promotora compresa entre -1425 a -1034 on es localitzen un DR4 i dos putatius SREs, que malgrat no són funcionals per a LXR $\alpha$  ni SREBP (figures R-35 i R-30), podrien ser importants per a la unió d'alguna proteïna activadora no identificada capaç de contrarestar la pèrdua d'activitat basal produïda per la unió d'algun inhibidor en la regió compresa entre -1034 a -809.

Per altra banda, s'ha identificat l'extrem 5' de l'mRNA del gen AACS mitjançant *BLAST* de la seqüència promotora estudiada amb les diferents ESTs disponibles a la base de dades del *GenBank* (figura R-22), localitzant l'inici de transcripció en el nucleòtid A, comprès dins de la seqüència (YYA<sub>+1</sub>NWYY) consens per a *Inr* (Lo *et al.*, 1996). L'element iniciador o *Inr* s'ha descrit com a un element del promotor mínim funcionalment similar a la caixa TATA, que solapat directament sobre l'inici de transcripció, dirigeix l'inici de la síntesi d'RNA cap a un nucleòtid en concret (normalment l'adenosina del consens YYA<sub>+1</sub>NWYY) (revisat per Smale *et al.*, 2003). No obstant això, l'existència d'altres alineaments majoritaris en posicions +3 i +8 (figura R-22) no descartaria la possibilitat d'inicis de transcripció alternatius en el gen AACS humà així com recentment, mitjançant RACE 5', s'han descrit en el gen AACS de ratolí (Hasegawa *et al.*, 2008). Precisament, una de les característiques que s'atribueixen als promotors que manquen de caixa TATA, de motiu DPE i que contenen regions riques en seqüències GC, és el fet de tenir múltiples inicis de transcripció (Juven-Gershon *et al.*, 2008).

L'*Inr* localitzat en les posicions -2/+5 del promotor del gen AACS humà és funcional, així com mostren els experiments de transfecció transitòria amb la construcció p-97(M-*Inr*) on la mutació d'aquest motiu suposa una pèrdua de l'activitat reportera respecte a p-97 (figura R-24). Diferents estudis han confirmat que el factor TFIID específicament interacciona amb l'*Inr* i que aquesta interacció és necessària per al reclutament de la resta de components de la maquinària basal (Smale *et al.*, 2003). No obstant això, l'activitat basal de la construcció p-97(M-*Inr*) és superior a la de la construcció p-33, fent que no es pugui descartar la possibilitat de que les caixes GC, amb cooperació amb altres seqüències, puguin jugar un paper en la unió i estabilització de diferents components de la maquinària basal, com ara TFIID, sobre el promotor proximal del gen AACS. Aquest és el cas del promotor d'AdML on, després de la mutació de l'*Inr*, no es perd la totalitat de l'activitat transcripcional, ja que es donen interaccions corrent avall que compensen la pèrdua d'interacció entre TFIID i l'*Inr* (Emami *et al.*, 1997).

Encara que s'hagin descrit diferents factors de transcripció que interaccionen amb les caixes GC, en el present treball ens hem centrat en la interacció de la proteïna Sp1 amb les caixes GC del promotor del gen AACS, demostrat aquesta interacció *in vitro*, mitjançant *pull-down* amb oligos biotinilats (figura R-26) i *in vivo*, per la tècnica d'immunoprecipitació de cromatina (*ChIP*) (figura R-27).

Els experiments de transfecció transitòria amb construccions del gen reporter *luc* sota el control de diferents versions del promotor de l'AACS humà, en les que s'han deletat les caixes GC de manera consecutiva, revelen la importància de les caixes GC i, per tant, d'Sp1 en la mediació de l'activitat basal d'aquest promotor (figura R-25). Així, l'activitat luciferasa és màxima en la construcció p-291 (-291/+79) amb 5 caixes GC i disminueix progressivament a mesura que disminueix el número de caixes GC presents en el promotor. Els experiments de transfecció transitòria realitzats en presència de mitramicina (figura R-28) constitueixen una evidència més de la importància del factor de transcripció Sp1 en l'activitat basal del gen AACS humà. En els promotors sense caixa TATA, rics en seqüències GC, s'ha postulat que Sp1 un cop unit a les caixes GC recluta TFIID, provocant l'estabilització de TBP en la regió -30 i afavorint l'acoblament del complex de preiniciació sobre el promotor (Pugh *et al.*, 1991; Hoey *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 1995).

S'ha descrit que la caixa TATA i l'*Inr* poden actuar sinèrgicament quan ambdós elements es localitzen a 25-30 pb un de l'altre (O'Shea-Greenfield *et al.*, 1992; Emami *et al.*, 1997). No obstant això, la introducció d'una caixa TATA en la posició -30 del constructe p-33 (p(TATA)) no suposa un increment significatiu de l'activitat luciferasa (figura R-24), suggerint, un altra cop, la dependència de la presència de les caixes GC en el promotor del gen AACS humà per a que es doni l'activitat basal. De fet, altres estudis on es combina el clonatge de la caixa TATA i/o l'*Inr* amb o sense 6 llocs d'unió per al factor Sp1 d'SV40 mostren que la taxa de transcripció és molt feble en els constructes que contenen la caixa TATA o l'*Inr*, que s'incrementa per la combinació d'ambdós motius, però que únicament s'obtenen elevats nivells de transcripció quan, corrent amunt de la caixa TATA, de l'*Inr* o d'ambdós, s'insereixen els llocs d'unió per a la proteïna Sp1 (Smale *et al.*, 1990).

## **6. ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS PER LXR.**

L'anàlisi de la seqüència del gen AACS humà, mitjançant el programa informàtic *TFSEarch*, revela la presència d'un DR-4 (putatiu LXRE) en les posicions de -1342 a -1327 respecte a l'*Inr*. Aquest DR-4 es troba comprès dins d'una de les dues seqüències *Alu* o altament repetitives del promotor del gen AACS predites pel programa informàtic *BLAST* de l'NCBI (figura R-20). Les seqüències repetitives contenen elements de resposta a hormones (HREs) amb elevada freqüència,



específicament DR-4, DR-2 i variants d'IR-3/IR-17, suggerint que aquestes seqüències podrien constituir elements regulatoris importants (Norris *et al.*, 1995; Vansant *et al.*, 1995; Babich *et al.*, 1999; Laperriere *et al.*, 2007). Concretament, en el promotor del gen LXR $\alpha$  humà es localitzen tres LXREs, dos dels quals es localitzen dins d'una seqüència *Alu* (Li *et al.*, 2002).

Els experiments de transfecció transitòria mostren que el gen AACS humà és regulat transcripcionalment per l'heterodímer LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  (figura R-29), essent la inducció de l'activitat reportera depenent tant de la cotransfecció amb ambdós receptors nuclears com de l'addició dels seus lligants. Sorprenentment, els assajos de gen-reporter, on s'han transfectat diferents versions amb l'extrem 5' deletat del promotor del gen AACS humà juntament amb l'heterodímer LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ , suggereixen que el putatiu LXRE localitzat en el promotor estudiat no és funcional i que la resposta del gen AACS a LXR $\alpha$  mapeja a les caixes GC del promotor proximal (figura R-30). La seqüència de l'XRE descrit pel gen de l'ApoD humà és idèntica a la seqüència del motiu DR-4 localitzada en el promotor del gen AACS humà. A més, els assajos de retardació en gel confirmen la capacitat de l'heterodímer LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  per a unir-se a aquest element i experiments de transfecció transitòria, transfectant el gen reporter *luc* sota el control de tres còpies en tàndem d'aquest motiu LXRE, mostren que aquest reporter és activat per la transfecció amb LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  de manera dependent de lligant (Hummasti *et al.*, 2004).

Com calia, en cèl·lules HepG2 tractades amb un agonista específic d'LXR no es promou l'increment dels nivells d'mRNA del gen AACS (figura R-31), ja que els nivells d'LXR endògens d'aquesta línia cel·lular no són suficients per a que tingui lloc l'activació del reporter del promotor de l'AACS en presència de T0901317 (figura R-29). Seria interessant estudiar si la sobreexpressió d'LXR $\alpha$  en aquesta línia cel·lular, mitjançant adenovirus recombinants o bé per la creació d'una línia estable del receptor nuclear, provoca algun efecte en l'expressió del gen AACS. El tractament d'un cultiu primari d'hepatòcits de rata, que constitueix un model més fisiològic que la línia cel·lular HepG2, amb T0901317 tampoc promou l'expressió del gen AACS (figura R-32). No obstant això, s'han de prendre en consideració les diferències interespecífiques en la regulació transcripcional d'un determinat gen, ja que el gen LXR $\alpha$  humà és activat per LXR mentre que els seus homòlegs en rata o ratolí no estan sotmesos a regulació per aquest receptor nuclear (Laffitte *et al.*, 2001a; Li *et al.*, 2002).



I al contrari, l'LXRE del promotor de CYP7a1 de ratolí no es troba conservat en humans (Chiang *et al.*, 2001).

En conjunt aquest bloc suggereix que el gen AACS no és diana d'LXR $\alpha$  i que en experiments de transfecció transitòria on hem forçat el sistema, LXR podria estar activant l'expressió d'algun gen que controla la transcripció de l'AACS a través de les caixes GC del seu promotor. El putatiu LXRE, capaç d'unir l'heterodímer LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  *in vitro* (Hummasi *et al.*, 2004), en el context del promotor del gen AACS no és funcional. Li i col·laboradors (2002) classifiquen aquests LXREs com a elements de tipus II que, al contrari dels LXREs de tipus I, són selectius per a LXR $\alpha$ , unint-lo molt feblement, i no són responsables de mitjançar l'autoregulació transcripcional del promotor d'LXR $\alpha$  humà..

## 7. ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACS PER SREBP.

L'expressió del gen AACS està sotmesa a regulació pels nivells d'esterols intracel·lulars de manera paral·lela a l'expressió de l'HMG-CoA reductasa (figura R-33). Els SREBPs es sintetitzen en forma de precursors ancorats a la membrana del reticle endoplasmàtic i en condicions de depleció de colesterol cel·lular, aquest precursor pateix dues proteòlisis consecutives i es genera un fragment NH<sub>2</sub>-terminal soluble que es transloca al nucli, on activa la transcripció dels seus gens diana (Wang *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1995). Així, a l'incubar cèl·lules Cos7 en sèrum deficient en lipoproteïnes (LDS) es promou la forma nuclear i, per tant, activa dels SREBPs, condicions en les que es produeix un increment dels nivells d'mRNA de l'AACS. Aquest experiments corroboren observacions anteriors on es descriu que l'activitat enzimàtica i els nivells de proteïna de l'AACS s'indueixen pel tractament de rates amb agents hipocolesterogènics (Bergstrom *et al.*, 1984; Iwahori *et al.*, 2000). A més, com per a la majoria de gens sensibles al colesterol (Kawabe *et al.*, 1995), els nivells d'mRNA de l'AACS es veuen disminuïts pel tractament amb 25-hidroxicolesterol.

Per tal d'elucidar el mecanisme mitjançant el qual el cultiu en medi lliure d'esterols promou l'expressió de l'AACS, s'han incubat les cèl·lules en presència d'actinomicina D o cicloheximida (figura R-34), inhibidors de l'RNA polimerasa II i de la síntesi proteica, respectivament. El tractament de les cèl·lules control (FBS) amb actinomicina D provoca una disminució significant de l'expressió de l'AACS, suggerint

que aquest gen s'està transcrivint activament en les cèl·lules. Sorprenentment, quan s'incuba el cultiu en sèrum fetal boví (FBS) en presència de cicloheximida, es produeix la inducció de l'expressió del gen AACS de manera superior a la inducció que promou el tractament amb sèrum deficient en lipoproteïnes (LDS). Aquest efecte de l'antibiòtic ha sigut descrit anteriorment pel gen de l'HMG-CoA reductasa (Choi *et al.*, 1993) i podria ser reflex de que el colesterol present en el sèrum entrés dins la cèl·lula i promogué l'expressió d'alguna proteïna inhibidora de l'AACS i que aquesta inhibició es bloquegés per l'addició de cicloheximida al medi de cultiu. Per altra banda, la inducció de l'AACS per la depleció d'esterols és abolida quan s'incuben les cèl·lules en presència d'actinomicina D i cicloheximida, indicant que aquesta inducció ve donada per un mecanisme transcripcional i que requereix de nova síntesi proteica.

Malgrat que les tres isoformes d'SREBPs (-1a, -1c i -2) s'expressen de manera diferencial en els teixits i activen grups de gens implicat en processos metabòlics diferents (Shimomura *et al.*, 1997), els experiments de transcriptoma publicats per Horton i col·laboradors (2003), mostren que en fetge de ratolins transgènics la sobreexpressió d'nSREBP1a o nSREBP-2 provoca un increment dels nivells d'mRNA de l'AACS de 5.6 i 6.1 vegades, respectivament, mentre que la deficiència de la proteïna SCAP, reflex de la deficiència de la forma madura dels SREBPs endògens, provoca una disminució dels nivells d'mRNA de l'AACS del 60%. És per aquest motiu que s'han dut a terme experiments de transfecció transitòria mitjançant la cotransfecció de la construcció p-1425 amb les tres isoformes d'SREBPs (figura R-35), a partir dels quals es dedueix que els putatius SREs localitzats en el promotor del gen AACS humà (posicions -1341/-1331 i -1207/-1197 respecte a l'*Inr*) no són funcionals. A més, la incubació de les cèl·lules transfectades amb el constructe p-1425 en un medi supressor (FBS + 25-hidroxicolesterol) o inductor (LPS + pravastatina) del processament dels SREBPs endògens, no té cap efecte sobre l'activitat transcripcional, indicant que en aquesta regió promotora no existeixen seqüències responsables de la regulació del gen AACS humà per esterols (figura R-36).

## 8. ESTUDI DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN AACCS EN EL TEIXIT ADIPÓS.

El patró d'expressió del gen AACCS en diferents teixits de rata mascle mostra que els seus nivells d'mRNA són significativament superiors en TAB (figura R-48) comparat amb altres teixits examinats, suggerint que l'AACCS juga un paper important en el teixit adipós *in vivo*.

El gen AACCS es regula durant la diferenciació adipocitària en la línia cel·lular 3T3L1 i en cultiu primari de TAB (figura 37 i 38) coincidint amb el descrit anteriorment (Yamasaki *et al.*, 2005; Hasegawa *et al.*, 2008). L'adipogènesi implica la regulació temporal de l'expressió d'un determinat conjunt de gens. En ambdós models estudiats, 3T3L1 i cultiu primari, els nivells d'mRNA de l'AACCS es detecten en l'estat de fibroblast (dia 0) i s'incrementen gradualment durant la diferenciació primerenca, fins assolir el màxim d'expressió en els dies 4/6 després de la inducció de la diferenciació, suggerint que la regulació de l'expressió d'aquest gen està sota el control d'algun factor de transcripció adipogènic.

El receptor nuclear PPAR $\gamma$  és el factor de transcripció clau en la diferenciació adipocitària, ja que la seva expressió és necessària i suficient per a la inducció d'aquest procés (Tontonoz *et al.*, 1994b; Rosen *et al.*, 2006). De fet, fins al moment no s'ha descobert cap altre factor de transcripció que promogui l'adipogènesi en absència de PPAR $\gamma$  (Tontonoz *et al.*, 1994b). No obstant això, encara no es coneixen tots els factors de la senyalització corrent avall d'aquest receptor nuclear que contribueixen a la formació de l'adipòcit. En el present treball s'ha identificat el gen AACCS com a un nou gen diana de PPAR $\gamma$ .

El tractament de cèl·lules 3T3-F422A amb l'agonista sintètic de PPAR $\gamma$ , rosiglitazona, promou l'expressió del gen AACCS, encara que només ho fa feblement en l'estat d'adipòcit (dia 9 de diferenciació) (figura R-39) així com anteriorment ha sigut descrit pel gen Rev-erb $\alpha$  (Fontaine *et al.*, 2003). Aquest fet no és atribuïble a la manca d'expressió de PPAR $\gamma$  en la cèl·lula preadipocitària, ja que el tractament amb rosiglitazona promou l'expressió del gen  $\alpha$ P2 tant en l'estat fibroblàstic com en l'estat d'adipòcit. No obstant això, tampoc reflexa una manca de regulació de l'expressió de l'AACCS pel receptor nuclear; més bé, podria suggerir que PPAR $\gamma$  regula l'expressió del

gen AACS d'una manera no canònica i que per a que es dugui a terme aquesta inducció es necessita d'altres factors i/o coreguladors no presents en l'estat de preadipòcit.

*In vivo*, el tractament de rates amb rosiglitazona promou l'expressió de l'AACS en TAB (figura R-40), on resultats de Yamasaki i col·laboradors (2007) mostren que l'alimentació de rates amb una dieta rica en greix també promou l'expressió d'aquest gen. És important destacar que únicament s'incrementen els nivells d'mRNA de l'AACS en rates llur obesitat ha sigut induïda per la dieta i no en rates genèticament obeses (Zucker *fatty*), ja que aquest model de regulació és paral·lel al descrit per a PPAR $\gamma$  (Vidal-Puig *et al.*, 1996), suggerint un cop més que l'expressió del gen AACS està sota el control de PPAR $\gamma$ .

En aquest treball s'han utilitzat cèl·lules HIB-1B, per a dur a terme els experiments de transfecció transitòria així com els assajos de *pull-down* amb oligos biotinitats degut a la dificultat de la línia cel·lular 3T3L1 per a ser transfectada. L'anàlisi de la regió promotora del gen AACS de -1425 a +79 no revela la presència de cap motiu PPRE. No obstant això, el gen AACS és transcripcionalment activat per PPAR $\gamma$ , (figura R-41), suggerint la implicació d'un altre factor de transcripció que mitjanci aquesta activació. Aquest candidat podria ser Sp1, com es dedueix a partir d'experiments de transfecció transitòria de constructes amb deleccions consecutives de l'extrem 5' del promotor de l'AACS humà, on l'eliminació de les caixes GC aboleix la resposta a PPAR $\gamma$  (figura R-42). Una altra evidència que implica al factor de transcripció Sp1 són els experiments de transfecció transitòria en presència de mitramicina, on es produeix una disminució de l'activació per PPAR $\gamma$  a l'incubar en presència d'aquest antibiòtic (figura R-47).

En aquest estudi s'han identificat 5 caixes GC, ubicades en les posicions de -291 a -54 del promotor del gen AACS humà, que estan implicades en l'activitat basal del promotor (figura R-25) i en l'activació per PPAR $\gamma$  (figura R-42). La importància relativa de cadascuna d'aquestes caixes GC en l'activació per PPAR $\gamma$  s'hauria de determinar mitjançant experiments de mutagènesi dirigida de cada motiu en concret, encara que podria ser que cadascun d'aquests llocs d'unió actués de manera cooperativa en l'activació del receptor nuclear, així com s'ha descrit pel gen HSL (Deng *et al.*, 2006).

Diferents treballs descriuen la capacitat dels factors de transcripció de la família Sp per interaccionar amb els receptors nuclears i regular així l'expressió gènica (revisat per Safe *et al.*, 2004). Concretament, PPAR $\gamma$  i Sp1 interaccionen físicament de manera directa (figura R-43), fet que pot suposar l'activació de determinats gens, com ara p21 i HSL (Hong *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2005), o la inhibició d'altres, com per exemple la follistalina, el receptor de l'angiotensina II i el receptor de tromboxà (Sugawara *et al.*, 2001; 2002; Necela *et al.*, 2008). El context gènic del promotor deu ser un factor determinant a l'hora de decidir quins receptors nuclears es recluten a través d'Sp1 i si aquest reclutament suposa el reclutament de proteïnes coactivadores o corepressores de la transcripció.

Els experiments de *pull-down* amb oligos biotinitats, corresponents als quatre motius d'unió a Sp1 de l'extrem 3' del promotor del gen AACS humà, mostren que PPAR $\gamma$  interacciona *in vitro* amb aquesta seqüència, essent dita interacció pràcticament nul·la quan s'incuba amb una sonda que conté les caixes GC mutades (figura R-44). Com cal esperar, la interacció que s'observa és indirecta, ja que la seqüència corresponent al motiu PPRE és totalment diferent a la de la caixa GC i assajos de retardació en gel amb sondes corresponents a les caixes GC indiquen que PPAR $\gamma$  és incapaç d'interaccionar amb aquesta seqüència ni com a monòmer/homodímer ni com a heterodímer amb RXR $\alpha$  (Sugawara *et al.*, 2001; 2002; Deng *et al.*, 2005), mentre que Sp1 s'acomplexa amb el DNA, coincidint amb els nostres resultats (figura R-26), suggerint que la unió de PPAR $\gamma$  a la regió rica en GC del promotor proximal de l'AACS és mitjançada per la proteïna Sp1. A més, els experiments de coimmunoprecipitació de cromatina mostren que, *in vivo*, tant PPAR $\gamma$  com Sp1 es troben associats al promotor proximal del gen AACS de ratolí de manera específica (figura R-45 i R-27), ja que aquesta associació no es detecta en la regió distal continguda a l'exó 17.

El mecanisme mitjançant el qual PPAR $\gamma$  regula l'expressió gènica a través de la proteïna Sp1 no està elucidat i existeixen diverses possibilitats descrites en la bibliografia: a) La unió d'Sp1 a les caixes GC és alterada per l'activació de PPAR $\gamma$ , que impedeix la seva unió (Sugawara *et al.*, 2001; 2002) o bé la promou (Deng *et al.*, 2005), inhibint o activant l'expressió gènica, respectivament. b) Sassa i col·laboradors (2004) descriuen un efecte dual de PPAR $\gamma$  de manera que els seus lligants suprimeixen la unió al DNA de les proteïnes Sp1 i Sp3 mentre que el receptor nuclear

no activat, en absència de lligant, promou la unió d'Sp1 a les caixes GC. c) L'activació de PPAR $\gamma$  no provoca canvis en la capacitat d'unió d'Sp1 al DNA però disminueix els nivells de O-glicosilació de la proteïna, disminuint així l'activitat transcripcional d'Sp1 i reprimint l'expressió gènica (Chung *et al.*, 2006).

Sota les nostres condicions experimentals, el tractament amb rosiglitazona: a) No promou la interacció entre PPAR $\gamma$  i Sp1 (figura R-43). b) No afecta a la unió d'Sp1 al DNA, com es dedueix a partir dels experiments de *pull-down* amb oligos biotinitats (figura R-46). c) No afecta a la unió d'Sp1 ni de PPAR $\gamma$  al promotor proximal del gen AACS, com es dedueix a partir dels experiments de *ChIP* de cèl·lules 3T3L1 diferenciades (resultats no mostrats). Aquests resultats podrien suggerir que Sp1 està unit a les caixes GC del promotor proximal del gen AACS, reclutant a PPAR $\gamma$ , i que en absència de lligant o en presència del mateix, promou el reclutament de proteïnes repressores (NCoR o SMRT) o activadores (HDAC o p300) de la transcripció, respectivament.

Yamasaki i col·laboradors (2005) suggereixen que l'expressió del gen AACS en el teixit adipós està relacionada amb la proporció d'unitats acetil-CoA per a la biosíntesi d'àcids grassos durant la diferenciació adipocitària tardana, quan es produeix la iniciació del dipòsit de gotícules lipídiques. Aquest fet ve suportat per: a) La baixa expressió de l'HMG-CoA reductasa, enzim limitant de la colesterogènesi, en el teixit adipós. b) El patró d'expressió dels gens AACS i ACC-1, que són semblants durant la diferenciació adipocitària. c) El pic d'expressió de l'AACS que té lloc durant els dies 4/6 de diferenciació, quan s'observa una acumulació de gotícules lipídiques.

Alternativament, s'ha relacionat a Sur-5, l'homòleg en *C.elegans* del gen AACS, amb la via de senyalització per Ras (Gu *et al.*, 1998). Diferents estudis mostren un paper antagònic de Ras en la diferenciació adipocitària (Houseknecht *et al.*, 1996; Font de Mora *et al.*, 1997). Específicament, Ras promou l'activació de MAPK que debilita el procés d'adipogènesi en cèl·lules 3T3L1 (Font de Mora *et al.*, 1997) i la sobreexpressió de Ha-Ras en teixit adipós provoca una disminució de la massa de greix en ratolí (Houseknecht *et al.*, 1996).

Així, futurs estudis amb un RNA antisentit específic de l'AACS que mostrin la contribució d'aquest gen al procés de la diferenciació adipocitària, serien de gran interès.

## 9. RITME CIRCADIARI.

S'ha analitzat l'expressió del gen AACS en diferents teixits de rates mascle i així com ha sigut descrit per diferents autors, l'AACS s'expressa principalment en els teixits lipogènics (Buckley *et al.*, 1973; Yeh *et al.*, 1977; Ohgami *et al.*, 2002; Yamasaki *et al.*, 2005) (figura R-48). Sorprenentment, els nivells d'mRNA de l'AACS en fetge presenten un patró d'expressió diferencial depenent de si els animals han sigut sacrificats durant la fase lumínica o la fase fosca, suggerint que la seva expressió està sotmesa a regulació circadiària.

L'anàlisi en fetge dels nivells d'mRNA de l'AACS al llarg del dia mostra un patró d'expressió rítmic, paral·lel al descrit per a l'activitat enzimàtica (Bergstrom *et al.*, 1982). El gen AACS no s'expressa en aquest teixit durant la fase lumínica i es produeix el zenit d'expressió a l'inici de la fase fosca, (figura R-49), coincidint amb el període de màxima activitat dels rosegadors. En el TAB l'expressió del gen AACS està sotmesa a control pel ritme circadiari amb un patró semblant a l'observat pel fetge, encara que de menor intensitat rítmica (figura R-50 A i B). En canvi, en el cervell no s'observa ciclació en l'expressió del gen AACS (figura 50 C i D), indicant que l'efecte del ritme circadiari és teixit específic. Aquesta especificitat tissular de la regulació circadiària ja ha sigut descrita anteriorment i es podria explicar com a una regulació, per part dels oscil·ladors perifèrics, de la transcripció d'un conjunt de gens rellevants per a la funció d'un òrgan (Panda *et al.* 2002). De fet, la majoria dels gens regulats circadiàriament participen en les principals funcions de l'òrgan i molts d'ells catalitzen les reaccions limitants de les respectives vies, resultant en una coordinació temporal del comportament i de la fisiologia que permet l'adaptació òptima de l'organisme al seu ambient (Panda *et al.* 2002).

En el fetge, el factor de transcripció SREBP-1 regula una gran quantitat de gens implicats en la lipogènesi i en l'homeòstasi del colesterol (Pai *et al.*, 1998; Magaña *et al.*, 2000; Amemiya-Kudo *et al.*, 2002; Horton *et al.*, 2002a/b). En aquest òrgan tant la taxa de transcripció com la d'activació d'SREBP-1 es modula durant el ritme circadiari, jugant un paper central en el control de les variacions diürnes en el metabolisme dels seus gens diana (Brewer *et al.*, 2005). L'anàlisi de l'expressió temporal d'SREBP-1 en fetge revela l'existència d'un patró rítmic, amb un increment dels nivells d'mRNA a l'inici de la fase fosca i el zenit d'expressió en el CT 16 (figura R-49). SREBP-1 podria



ser un candidat responsable de l'oscil·lació rítmica de l'expressió del gen AACS ja que:

- Es produeix un increment en l'expressió d'SREBP-1 en el CT12, que podria ser suficient per a l'activació de la transcripció de l'AACS en el mateix temps circadiari, ja que els nivells d'mRNA d'SREBP-1 en fetge són un ordre de magnitud superiors als de l'AACS (resultats no mostrats).
- El zenit de la corba d'activació proteolítica d'SREBP-1 es produeix just a l'inici de la fase fosca (Brewer *et al.*, 2005), coincidint amb la màxima expressió de l'AACS.
- L'especificitat de teixit en l'expressió circadiària de l'AACS podria explicar-se per l'oscil·lació de proteïnes reguladores que s'expressen de manera abundant en el teixit adipós i en el fetge, com ara SREBP-1c.

En el present treball també s'ha estudiat la possibilitat de que altres factors de transcripció, com PGC1 $\alpha$  i els receptors nuclears orfes Rev-erb $\alpha$  i ROR $\alpha$ , directament implicats en el control del rellotge circadiari (Ueda *et al.*, 2002; Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Yin *et al.* 2006; Liu *et al.*, 2007), regulessin l'oscil·lació temporal de l'expressió del gen AACS. Els nostres experiments mostren que el putatiu RORE localitzat en el promotor de l'AACS humà (posicions -757/-744 respecte a l'inici de transcripció) no és funcional (figura R-52) i que la sobreexpressió del coactivador transcripcional PGC-1 $\alpha$  no provoca canvis en l'expressió del gen AACS (figura R-51).

Sols un petit grup de gens són diana directa dels factors de transcripció del rellotge molecular (Panda *et al.*, 2002). No obstant això, no es pot descartar que el gen AACS es moduli directament per l'heterodímer BMAL/CLOCK ja que en el seu promotor (posicions -293/-288) es localitza un motiu E box de consens perfecte (figura R-20). Així, futurs experiments que provin la funcionalitat d'aquest motiu i estableixin el mecanisme molecular, mitjançant el qual es regula l'expressió del gen AACS durant el ritme circadiari, serien de gran interès.

Una de les funcions principals dels oscil·ladors circadianis en les cèl·lules hepàtiques és l'anticipació i adaptació a les condicions fisiològiques necessàries per al processament del menjar, essent aquest el *Zeitgeber* dominant per a la ritmicitat gènica en fetge (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001). D'acord amb aquest fet, quan les rates no disposen de menjar durant la transició llum-foscor, no es dona l'increment dels trànscrips de l'AACS i d'SREBP-1c a l'inici de la fase fosca (figura R-53 A i B). A més, part de la inducció de l'expressió d'ambdós gens a l'inici de la fase fosca és atribuïble a la insulina, ja que la seva administració en absència de menjar i abans de la transició llum-foscor, promou l'expressió de l'AACS i d'SREBP1c (figura R-54 A i B). SREBP-1c podria ser responsable de mitjançar la regulació de l'expressió de



l'AACS en fetge en aquestes situacions fisiològiques ja que el patró d'expressió d'ambdós gens és paral·lel i en aquest òrgan SREBP-1c és el principal factor de transcripció que mitjança l'homeòstasi de la insulina i del menjar (Horton *et al.*, 1998a; Shimomura *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 2000; Stoeckman *et al.*, 2002). Encara que la construcció reportera p-1425 (-1425/+79) no es regula per la cotransfecció amb SREBP-1c (figura R-35) no es pot descartar l'existència de seqüències reguladores corrent amunt o avall de la regió promotora clonada.

Quan es realimenten els animals just abans de l'inici de la fase fosca, moment en que s'inicia "el comportament del menjar" (CT 11.5; figura R-53) la inducció (de 4 vegades) dels gens AACS i SREBP-1c es dona en tan sols 1 hora i 30 minuts, mentre que en la realimentació diürna s'assoleixen els valors del control, quan l'expressió d'ambdós gens és baixa (CT 0; figura R-49), després de 5 hores de realimentació (figura R-55 A i B). Aquest efecte diferencial en l'expressió dels gens AACS i SREBP-1c dependent de la fase del dia (inici de fase lumínica o final de la mateixa) en què els animals han disposat de menjar suggereix l'existència d'un mecanisme de regulació dependent de rellotge molecular ja que, com es dedueix a partir de la mesura dels nivells de cossos cetònics en plasma, durant la realimentació diürna els animals han ingerit menjar (figura R-56A). La disminució dels cossos cetònics circulants en tan sols 20 minuts de realimentació: a) No es pot atribuir a l'increment de l'expressió del gen AACS en fetge, ja que els seus nivells d'mRNA en aquest grup experimental romanen semblants als del grup dejunat (figura R-55A). b) Suggereixen l'existència d'un mecanisme de regulació posttraduccional de l'activitat enzimàtica de l'HMGCS2, com ara l'estat de succinilació (Lowe *et al.*, 1985), perquè es produeix la disminució gradual dels seus nivells d'mRNA (figura R-56B). c) Suggereixen la inducció ràpida d'altres proteïnes consumidores de cossos cetònics en els teixits perifèrics. d) No descarten l'existència d'altres proteïnes implicades en la síntesi de cossos cetònics llur expressió disminueix ràpidament en el fetge.

Finalment, sota les nostres condicions experimentals, no s'observen canvis a nivell de l'mRNA de l'AACS durant el dejuni i realimentació diürna ni en TAB ni en cervell (figura R-57 A i B), indicant que la regulació transcripcional del gen AACS durant aquesta situació fisiològica és teixit específica.



**CONCLUSIONS**



- El cDNA descrit per al gen AACS humà codifica per a una proteïna funcional amb activitat AACS, essent les Km de l'enzim recombinant 37.63, 2.3 i 155.24  $\mu$ M per a l'acetoacetat, el CoA i l'ATP, respectivament.
- La sobreexpressió de l'acetoacetyl-CoA en el sistema induïble *BD<sup>TM</sup> Tet-On Gene Expression system* promou la biosíntesi de colesterol. No obstant això, aquest fet no és atribuïble a la interacció funcional entre les proteïnes AACS i HMGCS1.
- L'acetoacetyl-CoA sintetasa s'acetila en múltiples lisines *in vivo*.
- El promotor del gen AACS humà manca de caixa TATA i presenta un *Inr* i 5 caixes GC, que uneixen el factor de transcripció Sp1, importants per a l'activitat basal del gen.
- El gen AACS no és diana d'LXR. Encara que la seva expressió es modula per la disponibilitat d'esterols a través d'un mecanisme directe, els dos putatius SREs de la regió promotora clonada no són funcionals.
- L'expressió del gen AACS s'indueix durant la diferenciació adipocitària, essent responsable d'aquesta inducció, al menys en part, el receptor nuclear PPAR $\gamma$ , que activa transcripcionalment aquest gen a través de les caixes GC del promotor proximal de l'AACS i mitjançant la interacció amb Sp1.
- En rates, el gen AACS s'expressa principalment en teixits lipogènics. L'expressió en TAB i fetge ve determinada pel ritme circadiari. .
- L'expressió del gen AACS es regula en experiments de dejuni i realimentació així com per l'administració d'insulina. Aquesta regulació és paral·lela a la observada per a SREBP-1c.



## **BIBLIOGRAFIA**





- Abbot E.L., McCormack J.G., Reynet C., Hassall D.G., Buchan K.W., Yeaman S.J. (2005) **Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells.** *FEBS J.* 272(12):3004-14.
- Adams M., Reginato M.J., Shao D., Lazar M.A., Chatterjee V.K. (1997) **Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site.** *J Biol Chem.* 272(8):5128-32.
- Akamine R., Yamamoto T., Watanabe M., Yamazaki N., Kataoka M., Ishikawa M., Ooie T., Baba Y., Shinohara Y. (2007) **Usefulness of the 5' region of cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species.** *J. Biochem. Biophys. Methods* 70:481-86.
- Akashi M., Takumi T. (2005) **The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1.** *Nat Struct Mol Biol.* 12(5):441-8.
- Akhtar R.A., Reddy A.B., Maywood E.S., Clayton J.D., King V.M., Smith A.G., Gant T.W., Hastings M.H., Kyriacou C.P. (2002) **Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus.** *Curr Biol.* 12(7):540-50.
- Akiyama T.E., Sakai S., Lambert G., Nicol C.J., Matsusue K., Pimprale S., Lee Y.H., Ricote M., Glass C.K., Brewer H.B. Jr., Gonzalez F.J. (2002) **Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux.** *Mol Cell Biol.* 22(8):2607-19.
- Alberti S., Steffensen K.R., Gustafsson J.A. (2000) **Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRBeta.** *Gene.* 243(1-2):93-103.
- Albrecht U., Eichele G. (2003) **The mammalian circadian clock.** *Curr Opin Genet Dev* 13:271-277.
- Alland L., Muhle R., Hou H. Jr, Potes J., Chin L., Schreiber-Agus N., DePinho R.A. (1997) **Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression.** *Nature.* 387(6628):49-55.
- Altiok S., Xu M., Spiegelman B.M. (1997) **PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A.** *Genes Dev.* 11(15):1987-98.
- Amemiya-Kudo M., Shimano H., Hasty A.H., Yahagi N., Yoshikawa T., Matsuzaka T., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Sato R., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N. (2002) **Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes.** *J Lipid Res.* 43(8):1220-35.
- Amemiya-Kudo M, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N, Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N. (2000). **Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene.** *J Biol Chem* 275(40):31078-85.
- Amri E.Z., Bonino F., Ailhaud G., Abumrad N.A., Grimaldi P.A. (1995) **Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors.** *J Biol Chem.* 270(5):2367-71.

- Apfel R., Benbrook D., Lernhardt E., Ortiz M.A., Salbert G., Pfahl M. (1994) **A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily.** *Mol Cell Biol.* 14(10):7025-35.
- Appella E., Anderson C.W. (2000) **Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code.** *Pathol Biol (Paris).* 48(3):227-45.
- Aranda A., Pascual A. (2001) **Nuclear hormone receptors and gene expression.** *Physiol Rev.* 81(3):1269-304.
- Arkan M.C., Hevener A.L., Greten F.R., Maeda S., Li Z.W., Long J.M., Wynshaw-Boris A., Poli G., Olefsky J., Karin M. (2005) **IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance.** *Nat Med.* 11(2):191-8.
- Asher G., Gatfield D., Stratmann M., Reinke H., Dibner C., Kreppel F., Mostoslavsky R., Alt F.W., Schibler U. (2008) **SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation.** *Cell.* 134(2):317-28.
- Aso T, Conaway JW, Conaway RC. (1994) **Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters.** *J Biol Chem.* 269(42):26575-83.
- Athanikar JN, Sanchez HB, Osborne TF. (1997) **Promoter selective transcriptional synergy mediated by sterol regulatory element binding protein and Sp1: a critical role for the Btd domain of Sp1.** *Mol Cell Biol.* 17(9):5193-200.
- Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L., Vallier P., Frering V., Riou J.P., Staels B., Auwerx J., Laville M., Vidal H. (1997) **Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients.** *Diabetes.* 46(8):1319-27.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1987). **Current Protocols in Molecular Biology**, Green Publishing Associates/Wiley-Interscience, New York.
- Azzout-Marniche D., Bécard D., Guichard C., Foretz M., Ferré P., Foufelle F. (2000) **Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes.** *Biochem J.* 350 Pt 2:389-93.
- Babbitt P.C., Kenyon G.L., Martin B.M., Charest H., Slyvestre M., Scholten J.D., Chang K.H., Liang P.H., Dunaway-Mariano D. (1992) **Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases.** *Biochemistry.* 31(24):5594-604.
- Babich V., Aksenov N., Alexeenko V., Oei S.L., Buchlow G., Tomilin N. (1999) **Association of some potential hormone response elements in human genes with the Alu family repeats.** *Gene.* 239(2):341-9.
- Balasubramaniam S., Goldstein J.L., Brown M.S. (1977) **Regulation of cholesterol synthesis in rat adrenal gland through coordinate control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and reductase activities.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(4):1421-5.
- Barak Y., Liao D., He W., Ong E.S., Nelson M.C., Olefsky J.M., Boland R., Evans R.M. (2002) **Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(1):303-8.
- Barak Y., Nelson M.C., Ong E.S., Jones Y.Z., Ruiz-Lozano P., Chien K.R., Koder A., Evans R.M. (1999) **PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development.** *Mol Cell.* 4(4):585-95.

- Barbera M.J., Schluter A., Pedraza N., Iglesias R., Villarroya F., Giralt M. (2001) **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell.** *J Biol Chem.* 276(2):1486-93.
- Barger P.M., Browning A.C., Garner A.N., Kelly D.P. (2001) **p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response.** *J Biol Chem.* 276(48):44495-501.
- Barish G.D., Narkar V.A., Evans R.M. (2006) **PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome.** *J Clin Invest.* 116(3):590-7.
- Barrero M.J., Camarero N., Marrero P.F., Haro D. (2003) **Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element.** *Biochem J.* 369(Pt 3):721-9.
- 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(6764):880-3.
- Bastie C., Holst D., Gaillard D., Jehl-Pietri C., Grimaldi P.A. (1999) **Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts.** *J Biol Chem.* 274(31):21920-5.
- Batzer, M.A. and Deiningner, P.L. (2002) **Alu repeats and human genomic diversity.** *Nature Rev. Genet.* 3, 370–379.
- Beaven S.W., Tontonoz P. (2006) **Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia.** *Annu Rev Med.* 57:313-29.
- Bécard D., Hainault I., Azzout-Marniche D., Bertry-Coussot L., Ferré P., Foufelle F. (2001) **Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice.** *Diabetes.* 50(11):2425-30.
- Bennett M.K., Osborne T.F. (2000) **Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(12):6340-4.
- Berg A.H., Combs T.P., Scherer P.E. (2002) **ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism.** *Trends Endocrinol Metab.* 13(2):84-9.
- Berge K.E., von Bergmann K., Lutjohann D., Guerra R., Grundy S.M., Hobbs H.H., Cohen J.C. (2002) **Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8.** *J Lipid Res.* 43(3):486-94.
- Berger J., Wagner J.A. (2002) **Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptors.** *Diabetes Technol Ther.* 4(2):163-74.
- Berger J., Patel H.V., Woods J., Hayes N.S., Parent S.A., Clemas J., Leibowitz M.D., Elbrecht A., Rachubinski R.A., Capone J.P., Moller D.E. (2000) **A PPARgamma mutant serves as a dominant negative inhibitor of PPAR signaling and is localized in the nucleus.** *Mol Cell Endocrinol.* 162(1-2):57-67.
- Bergstrom J.D., Edmond J. (1985) **A radiochemical assay for acetoacetyl-CoA synthetase.** *Anal Biochem.* 149(2):358-64.

- Bergstrom J.D., Wong G.A., Edwards P.A., Edmond J. (1984) **The regulation of acetoacetyl-CoA synthetase activity by modulators of cholesterol synthesis in vivo and the utilization of acetoacetate for cholesterologenesis.** *J Biol Chem.* 259(23):14548-53.
- Bergstrom J.D., Robbins K.A., Edmond J. (1982) **Acetoacetyl-coenzyme A synthetase activity in rat liver cytosol: a regulated enzyme in lipogenesis.** *Biochem Biophys Res Commun.* 106(3):856-62.
- Billon N., Carlisi D., Datto M.B., van Grunsven L.A., Watt A., Wang X.F., Rudkin B.B. (1999) **Cooperation of Sp1 and p300 in the induction of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 during NGF-mediated neuronal differentiation.** *Oncogene.* 18(18):2872-82.
- Berson D.M., Dunn F.A., Takao M. (2002) **Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock.** *Science.* 295 (5557):1070-3.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979) **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23.
- Björntorp P., Karlsson M., Pertoft H., Pettersson P., Sjöström L., Smith U.(1978) **Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes.** *J Lipid Res.* 19(3):316-24.
- Black A.R., Azizkhan-Clifford J. (1999) **Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control.** *Gene.* 237(2):281-302.
- Blake M.C., Jambou R.C., Swick A.G., Kahn J.W., Azizkhan J.C. (1990) **Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter.** *Mol Cell Biol.* 10(12):6632-41.
- Blander G., Guarente L. (2004) **The Sir2 family of protein deacetylases.** *Annu Rev Biochem.* 73:417-35.
- Blin N., Stafford D.W. (1976) **A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes.** *Nucleic Acids Res.* 3(9):2303-8.
- Bloch K., Vance D. (1977) **Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids.** *Annu Rev Biochem.* 46:263-98.
- Borst P., Elferink R.O. (2002) **Mammalian ABC transporters in health and disease.** *Annu Rev Biochem.* 71:537-92.
- Bouwman P., Philipsen S. (2002) **Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors.** *Mol Cell Endocrinol.* 195(1-2):27-38.
- Bradford M.M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Braissant O., Wahli W. (1998) **Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development.** *Endocrinology.* 139(6):2748-54.
- Braissant O., Foufelle F., Scotto C., Dauça M., Wahli W. (1996) **Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat.** *Endocrinology.* 137(1):354-66.
- Branchini B.R., Murtiashaw M.H., Magyar R.A., Anderson S.M. (2000) **The role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase.** *Biochemistry.* 39(18):5433-40.

- Brandt J.M., Djouadi F., Kelly D.P. (1998) **Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha.** *J Biol Chem.* 273(37):23786-92.
- Brandeis M., Frank D., Keshet I., Siegfried Z., Mendelsohn M., Nemes A., Temper V., Razin A., Cedar H. (1994) **Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation.** *Nature.* 371(6496):435-8.
- Brewer M., Lange D., Baler R., Anzulovich A. (2005) **SREBP-1 as a transcriptional interator of circadian and nutritional cues in the liver.** *J Biol Rhythms* 20(3) 195-205.
- Brosius, J. (1999) **RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements.** *Gene* 238, 115–134.
- Brown A.J., Sun L., Feramisco J.D., Brown M.S., Goldstein J.L. (2002) **Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism.** *Mol Cell.* 10(2):237-45.
- Brown M.S., Goldstein J.L. (1999) **A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(20):11041-8.
- Brown M.S., Goldstein J.L. (1997) **The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor.** *Cell.* 89(3):331-40.
- Brown S.A., Zimbrunn G., Fleury-Olela F., Preitner N., Schibler U. (2002) **Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks.** *Curr Biol.* 12(18):1574-83.
- Buckley B.M., Williamson D.H. (1975) **Acetoacetyl-CoA synthetase; a lipogenic enzyme in rat tissues.** *FEBS Lett.* 60(1):7-10.
- Buckley B.M., Williamson D.H. (1973) **Acetoacetate and brain lipogenesis: developmental pattern of acetoacetyl-coenzyme A synthetase in the soluble fraction of rat brain.** *Biochem J.* 132(3):653-6.
- Bunger M.K., Wilsbacher L.D., Moran S.M., Clendenin C., Radcliffe L.A., Hogenesch J.B., Simon M.C., Takahashi J.S., Bradfield C.A. (2000) **Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals.** *Cell.* 2000 Dec 22;103(7):1009-17.
- Burke T.W., Kadonaga J.T. (1997) **The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*.** *Genes Dev.* 11:3020-3031
- Burke T.W. and Kadonaga J.T. (1996). ***Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters.** *Genes & Dev.* 10: 711-724.
- Burley S.K., Roeder R.G. (1996) **Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID).** *Annu Rev Biochem.* 65:769-99.
- Cabrero A., Llaverías G., Roglans N., Alegret M., Sánchez R., Adzet T., Laguna J.C., Vázquez M. (1999) **Uncoupling protein-3 mRNA levels are increased in white adipose tissue and skeletal muscle of bezafibrate-treated rats.** *Biochem Biophys Res Commun.* 260(2):547-56.
- Cai G.Q., Driscoll B.T., Charles T.C. (2000) **Requirement for the enzymes acetoacetyl coenzyme A synthetase and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) synthase for growth of *Sinorhizobium meliloti* on PHB cycle intermediates.** *J Bacteriol.* 182(8):2113-8.



- Cao G., Liang Y., Broderick C.L., Oldham B.A., Beyer T.P., Schmidt R.J., Zhang Y., Stayrook K.R., Suen C., Otto K.A., Miller A.R., Dai J., Foxworthy P., Gao H., Ryan T.P., Jiang X.C., Burris T.P., Eacho P.I., Etgen G.J. (2003) **Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis.** *J Biol Chem.* 278(2):1131-6.
- Cao G., Beyer T.P., Yang X.P., Schmidt R.J., Zhang Y., Bensch W.R., Kauffman R.F., Gao H., Ryan T.P., Liang Y., Eacho P.I., Jiang X.C. (2002) **Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo.** *J Biol Chem.* 277(42):39561-5.
- Cao Z., Umek R.M., McKnight S.L. (1991) **Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells.** *Genes Dev.* 5(9):1538-52.
- Cardone L., Hirayama J., Giordano F., Tamaru T., Palvimo J.J., Sassone-Corsi P. (2005) **Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1.** *Science.* 309(5739):1390-4.
- Caron C., Col E., Khochbin S. (2003) **The viral control of cellular acetylation signaling.** *Bioessays.* 25(1):58-65.
- Carrozza M.J., Utley R.T., Workman J.L., Côté J. (2003) **The diverse functions of histone acetyltransferase complexes.** *Trends Genet.* 19(6):321-9.
- Cha J.Y., Repa J.J. (2007) **The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR.** *J Biol Chem.* 282(1):743-51.
- Chakravarti D., LaMorte V.J., Nelson M.C., Nakajima T., Schulman I.G., Juguilon H., Montminy M., Evans R.M. (1996) **Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling.** *Nature.* 383(6595):99-103.
- Chakravarty K., Leahy P., Becard D., Hakimi P., Foretz M., Ferre P., Foufelle F., Hanson R.W. (2001) **Sterol regulatory element-binding protein-1c mimics the negative effect of insulin on phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription.** *J Biol Chem.* 276(37):34816-23.
- Chalkley G.E., Verrijzer C.P. (1999) **DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250–TAF(II)150 complex recognizes the initiator.** *EMBO J.* 18, 4835–4845.
- Chang C., Sternberg P.W. (1999) **C. elegans vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signaling.** *Cancer Metastasis Rev.* 18(2):203-13.
- Chawla A., Lee C.H., Barak Y., He W., Rosenfeld J., Liao D., Han J., Kang H., Evans R.M. (2003) **PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(3):1268-73.
- Chawla A., Boisvert W.A., Lee C.H., Laffitte B.A., Barak Y., Joseph S.B., Liao D., Nagy L., Edwards P.A., Curtiss L.K., Evans R.M., Tontonoz P. (2001a) **A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.** *Mol Cell.* 7(1):161-71.
- Chawla A., Repa J.J., Evans R.M., Mangelsdorf D.J. (2001b) **Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files.** *Science.* 294:1866-1870.
- Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. (1994) **Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation.** *Endocrinology* 135(2):798-800.
- Chen G., Liang G., Ou J., Goldstein J.L., Brown M.S. (2004) **Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (31): 11245–50.

- Chen J.D., Evans R.M. (1995) **A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.** *Nature*. 377:454-457.
- Chen M., Bradley M.N., Beaven S.W., Tontonoz P. (2006) **Phosphorylation of the liver X receptors.** *FEBS Lett*. 580(20):4835-41.
- Chen M., Beaven S., Tontonoz P. (2005) **Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha.** *J Lipid Res*. 46(12):2570-9.
- Chen P.L., Riley D.J., Chen Y., Lee W.H. (1996) **Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs.** *Genes Dev*. 10(21):2794-804.
- Cheng L., Ding G., Qin Q., Huang Y., Lewis W., He N., Evans R.M., Schneider M.D., Brako F.A., Xiao Y., Chen Y.E., Yang Q. (2004) **Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy.** *Nat Med*. 10(11):1245-50.
- Chiang C.M., Roeder R.G. (1995) **Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators.** *Science*. 267(5197):531-6.
- Chiang J.Y., Kimmel R., Stroup D. (2001) **Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha).** *Gene*. 262(1-2):257-65.
- Chin D.J., Gil G., Russell D.W., Liscum L., Luskey K.L., Basu S.K., Okayama H., Berg P., Goldstein J.L., Brown M.S. (1984) **Nucleotide sequence of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of endoplasmic reticulum.** *Nature* 308(5960):613-7.
- Christy R.J., Yang V.W., Ntambi J.M., Geiman D.E., Landschulz W.H., Friedman A.D., Nakabeppu Y., Kelly T.J., Lane M.D. (1989) **Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes.** *Genes Dev*. 3(9):1323-35.
- Choi J.W., Lundquist E.N., Peffley D.M. (1993) **Inhibition of protein synthesis in baby-hamster kidney cells blocks oxysterol-mediated suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA at a post-transcriptional level.** *Biochem J*. 296: 859-66.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 162(1):156-9.
- Chu B.Y., Tran K., Ku T.K., Crowe D.L. (2005) **Regulation of ERK1 gene expression by coactivator proteins.** *Biochem J*. 392(Pt 3):589-99.
- Chu S., Ferro T.J. (2005) **Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation.** *Gene* 348 pp. 1-11.
- Chui P.C., Guan H.P., Lehrke M., Lazar M.A. (2005) **PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1.** *J Clin Invest*. 115(8):2244-56.
- Chung S.S., Choi H.H., Cho Y.M., Lee H.K., Park K.S. (2006) **Sp1 mediates repression of the resistin gene by PPARgamma agonists in 3T3-L1 adipocytes.** *Biochem Biophys Res Commun*. 348(1):253-8.
- Clarke S.L., Robinson C.E., Gimble J.M. (1997) **CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter.** *Biochem Biophys Res Commun*. 240(1):99-103.

- Clinkenbeard K.D., Sugiyama T., Lane M.D. (1975a) **Cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase from chicken liver.** *Methods Enzymol.* 35:167-73.
- Clinkenbeard K.D., Sugiyama T., Lane M.D. (1975b) **Cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase from chicken liver.** *Methods Enzymol.* 35:160-7.
- Clinkenbeard K.D., Sugiyama T., Moss J., Reed W.D., Lane M.D. (1973) **Molecular and catalytic properties of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase from avian liver.** *J Biol Chem.* 248(7):2275-84.
- Cohen H.Y., Miller C., Bitterman K.J., Wall N.R., Hekking B., Kessler B., Howitz K.T., Gorospe M., de Cabo R., Sinclair D.A. (2004) **Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase.** *Science.* 305(5682):390-2.
- Collins J.L., Fivush A.M., Watson M.A., Galardi C.M., Lewis M.C., Moore L.B., Parks D.J., Wilson J.G., Tippin T.K., Binz J.G., Plunket K.D., Morgan D.G., Beaudet E.J., Whitney K.D., Kliever S.A., Willson T.M. (2002) **Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines.** *J Med Chem.* 45(10):1963-6.
- Conti E., Stachelhaus T., Marahiel M.A., Brick P. (1997) **Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S.** *EMBO J.* 16(14):4174-83.
- Conti E., Franks N.P., Brick P. (1996) **Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes.** *Structure.* 4(3):287-98.
- Corkey B.E., Deeney J.T., Yaney G.C., Tornheim K., Prentki M. (2000) **The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction.** *J Nutr.* 130:299S-304S.
- Coste H., Rodríguez J.C. (2002) **Orphan nuclear hormone receptor Rev-erbalpha regulates the human apolipoprotein CIII promoter.** *J Biol Chem.* 277(30):27120-9.
- Costet P., Luo Y., Wang N., Tall A.R. (2000) **Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor.** *J Biol Chem.* 275(36):28240-5.
- Courey A.J., Holtzman D.A., Jackson S.P., Tjian R. (1989) **Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1.** *Cell.* 59(5):827-36.
- Courey A.J., Tjian R. (1988) **Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif.** *Cell.* 55(5):887-98.
- Curtiss L.K., Boisvert W.A. (2000) **Apolipoprotein E and atherosclerosis.** *Curr Opin Lipidol.* 11(3):243-51.
- Czeisler C.A., Allan J.S., Strogatz S.H., Ronda J.M., Sánchez R., Ríos C.D., Freitag W.O., Richardson G.S., Kronauer R.E. (1986) **Bright light resets the human circadian pacemaker independent of the timing of the sleep-wake cycle.** *Science* 233,667-671.
- Dalen K.T., Ulven S.M., Bamberg K., Gustafsson J.A., Nebb H.I. (2003) **Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha.** *J Biol Chem.* 278(48):48283-91.
- Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F., Schibler U. (2000) **Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus.** *Genes Dev.* 14(23):2950-61.
- Dang D.T., Pevsner J., Yang V.W. (2000). **The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors.** *Int J Biochem Cell Biol* 32: 1103-1121.



- Darlington G.J., Ross S.E., MacDougald O.A. (1998) **The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation.** *J Biol Chem.* 273(46):30057-60
- Debevec D., Christian M., Morganstein D., Seth A., Herzog B., Parker M., White R. (2007) **Receptor interacting protein 140 regulates expression of uncoupling protein 1 in adipocytes through specific peroxisome proliferator activated receptor isoforms and estrogen-related receptor alpha.** *Mol Endocrinol.* 21(7):1581-92.
- Delaunay F., Laudet V. (2002) **Circadian clock and microarrays: mammalian genome gets rhythm.** *Trends Genet* 18:595-597.
- Denechaud P.D., Bossard P., Lobaccaro J.M., Millatt L., Staels B., Girard J., Postic C. (2008) **ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver.** *J Clin Invest.* 118(3):956-64.
- Deng T., Shan S., Li P.P., Shen Z.F., Lu X.P., Cheng J., Ning Z.Q.. (2005) **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma transcriptionally up-regulates hormone-sensitive lipase via the involvement of specificity protein-1.** *Endocrinology.* 147(2):875-84.
- Desvergne B., Michalik L., Wahli W. (2004) **Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road.** *Mol Endocrinol.* 18(6):1321-32.
- Desvergne B., Wahli W. (1999) **Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.** *Endocr Rev.* 20(5):649-88.
- DiRenzo J., Söderstrom M., Kurokawa R., Ogliastro M.H., Ricote M., Ingrey S., Hörlein A., Rosenfeld M.G., Glass C.K. (1997) **Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors.** *Mol Cell Biol.* 17(4):2166-76.
- Djian P., Roncari D.A., Hollenberg C.H. (1985) **Adipocyte precursor clones vary in capacity for differentiation.** *Metabolism.* 34(9):880-3.
- Djouadi F., Weinheimer C.J., Saffitz J.E., Pitchford C., Bastin J., Gonzalez F.J., Kelly D.P. (1998) **A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice.** *J Clin Invest.* 102(6):1083-91
- Dodd A.N., Salathia N., Hall A., Kévei E., Tóth R., Nagy F., Hibberd J.M., Millar A.J., Webb A.A. (2005) **Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage.** *Science* 309(5734):630-3.
- Doetzlhofer A., Rotheneder H, Lagger G, Koranda M, Kurtev V, Brosch G, Wintersberger E, Seiser C. (1999) **Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1.** *Mol Cell Biol.* 19(8):5504-11.
- Dooley K.A., Millinder S., Osborne T.F. (1998) **Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y.** *J Biol Chem.* 273(3):1349-56.
- Dowell P., Ishmael J.E., Avram D., Peterson V.J., Nevriy D.J., Leid M. (1999) **Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein.** *J Biol Chem.* 274(22):15901-7.
- Dreyer C., Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., Wahli W. (1992) **Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors.** *Cell* 68:879–887.

- Dumas B., Harding H.P., Choi H.S., Lehmann K.A., Chung M., Lazar M.A., Moore D.D. (1994) **A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb.** *Mol Endocrinol.* 8(8):996-1005.
- Duncan E.A., Davé U.P., Sakai J., Goldstein J.L., Brown M.S. (1998) **Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning.** *J Biol Chem.* 273(28):17801-9.
- Duncan E.A., Brown M.S., Goldstein J.L., Sakai J. (1997) **Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2.** *J Biol Chem.* 272(19):12778-85.
- Dunlap J.C. (1999) **Molecular bases for circadian clocks.** *Cell.* 96(2):271-90.
- Dynan W.S., Tjian R. (1983) **The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter.** *Cell.* 35:79-87.
- Eberlé D., Hegarty B., Bossard P., Ferré P., Foufelle F. (2004) **SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis.** *Biochimie.* 86(11):839-48.
- Edmond J. (1974) **Ketone bodies as precursors of sterols and fatty acids in the developing rat.** *J Biol Chem.* 249(1):72-80.
- Edwards P.A., Popják G., Fogelman A.M., Edmond J. (1977) **Control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by endogenously synthesized sterols in vitro and in vivo.** *J Biol Chem.* 252(3):1057-63.
- Edwards P.A., Muroya H., Gould R.G. (1972) **In vivo demonstration of the circadian rhythm of cholesterol biosynthesis in the liver and intestine of the rat.** *J Lipid Res.* 13(3):396-401.
- El-Jack A.K., Hamm J.K., Pilch P.F., Farmer S.R. (1999) **Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ .** *J Biol Chem.* 274(12):7946-51.
- Emami K.H., Jain A., Smale S.T. (1997) **Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization.** *Genes Dev.* 11(22):3007-19.
- Emili A., Greenblatt J., Ingles C.J. (1994) **Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein.** *Mol Cell Biol.* 14(3):1582-93.
- Endemann G., Goetz P.G., Edmond J., Brunengraber H. (1982). **Lipogenesis from ketone bodies in the isolated perfused rat liver. Evidence for the cytosolic activation of acetoacetate.** *J Biol Chem* 257(7):3434-40.
- Engelking L.J., Kuriyama H., Hammer R.E., Horton J.D., Brown M.S., Goldstein J.L., Liang G. (2004) **Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis.** *J Clin Invest.* 113(8):1168-75
- Escher P., Wahli W. (2000) **Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions.** *Mutat Res.* 448(2):121-38.
- Espenshade P.J., Cheng D., Goldstein J.L., Brown M.S. (1999) **Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins.** *J Biol Chem.* 274(32):22795-804.
- Fahien L.A., MacDonald M.J. (2002) **The succinate mechanism of insulin release.** *Diabetes.* 51(9):2669-76.
- Fahrenkrug J. (2006) **PACAP: A multifaceted neuropeptide.** *Chronobiol. Int.* 23 , pp. 53-62.

- Fajas L., Schoonjans K., Gelman L., Kim J.B., Najib J., Martin G., Fruchart J.C., Briggs M., Spiegelman B.M., Auwerx J. (1999) **Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism.** *Mol Cell Biol.* 19(8):5495-503.
- Fajas L., Fruchart J.C., Auwerx J. (1998) **PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter.** *FEBS Lett.* 438(1-2):55-60.
- Fajas L., Auboeuf D., Raspé E., Schoonjans K., Lefebvre A.M., Saladin R., Najib J., Laville M., Fruchart J.C., Deeb S., Vidal-Puig A., Flier J., Briggs M.R., Staels B., Vidal H., Auwerx J. (1997) **The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene.** *J Biol Chem.* 272(30):18779-89.
- Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) **A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.** *Anal Biochem.* 132(1):6-13.
- Ferré P. (2004) **The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity.** *Diabetes.* 53 Suppl 1:S43-50.
- Fisher C.L., Pei G.K. (1997) **Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method.** *Biotechniques* 23(4):570-1, 574.
- Focan C. (1995) **Circadian rhythms and cancer chemotherapy.** *Pharmacol Ther.* 67(1):1-52.
- Folch J., Ascoli I., Lees M., Meath J.A., Le Baron F.N. (1969). **Preparation of lipids extracts: Extraction with chloroform-methanol.** *Methods in Enzymology, Lipids.* Vol XIV:246.
- Font de Mora J., Porras A., Ahn N., Santos E. (1997) **Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation.** *Mol Cell Biol.* 17(10):6068-75.
- Fontaine C., Dubois G., Duguay Y., Helledie T., Vu-Dac N., Gervois P., Soncin F., Mandrup S., Fruchart J.C., Fruchart-Najib J., Staels B. (2003) **The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation.** *J Biol Chem.* 278(39):37672-80.
- Foretz M., Guichard C., Ferré P., Foufelle F. (1999a) **Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22):12737-42.
- Foretz M., Pacot C., Dugail I., Lemarchand P., Guichard C., Le Lièvre X., Berthelie-Lubrano C., Spiegelman B., Kim J.B., Ferré P., Foufelle F. (1999b) **ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose.** *Mol Cell Biol.* 19(5):3760-8.
- Forman B.M., Chen J., Evans R.M. (1997) **Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(9):4312-7.
- Forman B.M., Tontonoz P., Chen J., Brun R.P., Spiegelman B.M., Evans R.M. (1995) **15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma.** *Cell.* 83(5):803-12.
- Forman B.M., Chen J., Blumberg B., Kliewer S.A., Henshaw R., Ong E.S., Evans R.M. (1994) **Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors.** *Mol Endocrinol.* 8(9):1253-61.
- Freed L.E., Endemann G., Tomera J.F., Gavino V.C., Brunengraber H. (1988) **Lipogenesis from ketone bodies in perfused livers from streptozocin-induced diabetic rats.** *Diabetes.* 37(1):50-5.

- Freytag S.O., Paielli D.L., Gilbert J.D. (1994) **Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells.** *Genes Dev.* 8(14):1654-63.
- Fu X., Menke J.G., Chen Y., Zhou G., MacNaul K.L., Wright S.D., Sparrow C.P., Lund E.G. (2001) **27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells.** *J Biol Chem.* 276(42):38378-87.
- Fu Y., Liao H.W., Do M.T., Yau K.W. (2005) **Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates.** *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, pp. 415-422
- Fukui T, Ito M, Tomita K. (1982) **Purification and characterization of acetoacetyl-CoA synthetase from *Zoogloea ramigera* I-16-M.** *Eur J Biochem.* 127(2):423-8.
- Geelen M.J., Lopes-Cardozo M., Edmond J. (1983) **Acetoacetate: a major substrate for the synthesis of cholesterol and fatty acids by isolated rat hepatocytes.** *FEBS Lett.* 163(2):269-73.
- Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D., King D.P., Takahashi J.S., Weitz C.J. (1998) **Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism.** *Science.* 280(5369):1564-9.
- Gelman L., Michalik L., Desvergne B., Wahli W. (2005) **Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors.** *Curr Opin Cell Biol.* 17(2):216-22.
- Giguère V. (1999) **Orphan nuclear receptors: from gene to function.** *Endocr Rev.* 20(5):689-725.
- Gil G., Goldstein J.L., Slaughter C.A., Brown M.S. (1986) **Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster. I. Isolation and sequencing of a full-length cDNA.** *J Biol Chem* 261(8):3710-6.
- Gill G., Pascal E., Tseng Z.H., Tjian R. (1994) **A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(1):192-6.
- Girnun G.D., Smith W.M., Drori S., Sarraf P., Mueller E., Eng C., Nambiar P., Rosenberg D.W., Bronson R.T., Edelmann W., Kucherlapati R., Gonzalez F.J., Spiegelman B.M. (2002) **APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(21):13771-6.
- Glass C.K., Ogawa S. (2006) **Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity.** *Nat Rev Immunol.* 6(1):44-55.
- Glass C.K., Witztum J.L. (2001) **Atherosclerosis. the road ahead.** *Cell.* 104(4):503-16.
- Glozak M.A., Sengupta N., Zhang X., Seto E. (2005) **Acetylation and deacetylation of non-histone proteins.** *Gene.* 363:15-23.
- Glass C.K., Rosenfeld M.G. (2000). **The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.** *Genes Dev.* 14:121-141.
- Glass C.K., Rose D.W., Rosenfeld M.G. (1997) **Nuclear receptor coactivators.** *Curr Opin Cell Biol.* 9(2):222-32.
- Goldberg, M.L. 1979. **"Sequence analysis of *Drosophila* histone genes."** Ph.D. thesis, Stanford University, Stanford, CA.
- Goldstein J.L., DeBose-Boyd R.A., Brown M.S. (2006) **Protein sensors for membrane sterols.** *Cell.* 124(1):35-46.

- Goldstein J.L., Brown M.S. (1990) **Regulation of the mevalonate pathway.** *Nature* 343(6257):425-30.
- Gong Y., Lee J.N., Lee P.C., Goldstein J.L., Brown M.S., Ye J. (2006) **Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake.** *Cell Metab.* 3(1):15-24.
- Gooley J.J., Lu J., Chou T.C., Scammell T.E., Saper C.B. (2001) **Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract.** *Nat Neurosci.* 4(12):1165.
- Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W., Bujard H. (1995) **Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.** *Science.* 268(5218):1766-9.
- Green H., Kehinde O. (1975) **An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion.** *Cell* 5(1):19-27.
- Green H., Meuth M. (1974) **An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture.** *Cell* 3: 127-133.
- Green S., Issemann I., Sheer E. (1988) **A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering.** *Nucleic Acids Res.* 16(1):369.
- Gregoire F.M., Smas C.M., Sul H.S. (1998) **Understanding adipocyte differentiation.** *Physiol Rev.* 78(3):783-809.
- Grimaldi P.A. (2003) **Roles of PPARdelta in the control of muscle development and metabolism.** *Biochem Soc Trans.* 31(Pt 6):1130-2.
- Grimaldi P.A. (2001) **Fatty acid regulation of gene expression.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 4(5):433-7.
- Grunstein M. (1997) **Histone acetylation in chromatin structure and transcription.** *Nature,* 389:, 349–352.
- Gu T., Orita S., Han M. (1998) **Caenorhabditis elegans SUR-5, a novel but conserved protein, negatively regulates LET-60 Ras activity during vulval induction.** *Mol Cell Biol.* 18(8):4556-64.
- Gulick T., Cresci S., Caira T., Moore D.D., Kelly D.P. (1994) **The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(23):11012-6.
- Hahn S. (2004) **Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery.** *Nat Struct Mol Biol.* (5):394-403.
- Hahn S., Buratowski S., Sharp P.A., Guarente L. (1989) **Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(15):5718-22.
- Hallows W.C., Lee S., Denu J.M. (2006) **Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(27):10230-5.
- Han S., Roman J. (2007) **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics?** *Anticancer Drugs.* 18(3):237-44.
- Hannibal J., Hindersson P., Knudsen S.M., Georg B., Fahrenkrug J. (2002) **The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract.** *J Neurosci.* 22(1):RC191.



- Hannibal J., Møller M., Ottersen O.P., Fahrenkrug J. (2000) **PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract.** *J. Comp. Neurol.* 418 , pp. 147-155.
- Hansen J.B., Zhang H., Rasmussen T.H., Petersen R.K., Flindt E.N., Kristiansen K. (2001) **Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta )-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling.** *J Biol Chem.* 276(5):3175-82.
- Harmer S.L., Panda S., Kay S.A. (2001) **Molecular bases of circadian rhythms.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:215-53.
- Harrison S.M., Houzelstein D., Dunwoodie S.L., Beddington R.S. (2000) **Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury.** *Dev Biol.* 227(2):358-72.
- Hartman H., Hu X., Tyler k.X., Dalal C.K., Lazar M. (2002) **Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin.** *J Biol Chem* 277:19754-19761.
- Hasegawa S., Yamasaki M., Inage T., Takahashi N., Fukui T. (2008) **Transcriptional regulation of ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, by C/EBPalpha during adipocyte differentiation.** *Biochim Biophys Acta.* 1779(6-7):414-9.
- Hastings M.H., Herzog E.D. (2004) **Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei.** *J Biol Rhythms.* 19(5):400-13.
- Hastings M.H., Reddy A.B., Maywood E.S. (2003) **A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease.** *Nature Reviews. Neuroscience* 4: 649-661.
- Hasty A.H., Shimano H., Yahagi N., Ameyida-Kudo M., Perrey S., Yoshikawa T., Osuga J., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Shionoiri F., Ohashi K., Harada K., Gotoda T., Nagai R., Ishibashi S., Yamada N. (2000). **Sterol regulatory element binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level.** *J Biol Chem* 275:31069-31077.
- Hattar S., Liao H.W., Takao M., Berson D.M., Yau K.W. (2002) **Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity.** *Science.* 295(5557):1065-70.
- He T.C., Chan T.A., Vogelstein B., Kinzler K.W. (1999) **PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** *Cell.* 99(3):335-45.
- He W., Barak Y., Hevener A., Olson P., Liao D., Le J., Nelson M., Ong E., Olefsky J.M., Evans R.M. (2003) **Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(26):15712-7.
- Hegarty B.D., Bobard A., Hainault I., Ferré P., Bossard P., Foufelle F. (2005) **Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(3):791-6.
- Heinzel T., Lavinsky R.M., Mullen T.M., Söderstrom M., Laherty C.D., Torchia J., Yang W.M., Brard G., Ngo S.D., Davie J.R., Seto E., Eisenman R.N., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (1997) **A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression.** *Nature.* 387(6628):43-8.
- Hermanson O., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (2002) **Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification.** *Trends Endocrinol Metab.* 13(2):55-60.
- Hirano Y., Murata S., Tanaka K., Shimizu M., Sato R. (2003) **Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway.** *J Biol Chem.* 278(19):16809-19.

Hirano Y., Yoshida M., Shimizu M., Sato R. (2001) **Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway.** *J Biol Chem.* 276(39):36431-7.

Hevener A.L., Olefsky J.M., Reichart D., Nguyen M.T., Bandyopadhyay G., Leung H.Y., Watt M.J., Benner C., Febbraio M.A., Nguyen A.K., Folian B., Subramaniam S., Gonzalez F.J., Glass C.K., Ricote M. (2007) **Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones.** *J Clin Invest.* 117(6):1658-69.

Hevener A.L., He W., Barak Y., Le J., Bandyopadhyay G., Olson P., Wilkes J., Evans R.M., Olefsky J. (2003) **Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance.** *Nat Med.* 9(12):1491-7.

Higgins C., Chatterjee S., Cherington V. (1996) **The block of adipocyte differentiation by a C-terminally truncated, but not by full-length, simian virus 40 large tumor antigen is dependent on an intact retinoblastoma susceptibility protein family binding domain.** *J Virol.* 70(2):745-52.

Hillen W., Berens C. (1994) **Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance.** *Annu Rev Microbiol.* 48:345-69.

Hirota T., Okano T., Kokame K., Shirotani-Ikejima H., Miyata T., Fukada Y. (2002) **Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts.** *J Biol Chem.* 277(46):44244-51.

Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. (1989) **Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.** *Gene* 77(1):51-9.

Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, Tjian R. (1993) **Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators.** *Cell.* 72(2):247-60.

Hogenesch J.B., Gu Y.Z., Jain S., Bradfield C.A. (1998) **The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(10):5474-9.

Holst D., Luquet S., Nogueira V., Kristiansen K., Leverve X., Grimaldi P.A. (2003) **Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle.** *Biochim Biophys Acta.* 1633(1):43-50.

Hondares E, Mora O, Yubero P, Rodriguez de la Concepción M, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. (2006) **Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation.** *Endocrinology.* 147(6):2829-38.

Hong J., Samudio I., Liu S., Abdelrahim M., Safe S. (2004) **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent activation of p21 in Panc-28 pancreatic cancer cells involves Sp1 and Sp4 proteins.** *Endocrinology.* 145(12):5774-85.

Horie S., Ishii H., Matsumoto F., Kusano M., Kizaki K., Matsuda J., Kazama M. (2001) **Acceleration of thrombomodulin gene transcription by retinoic acid: retinoic acid receptors and Sp1 regulate the promoter activity through interactions with two different sequences in the 5'-flanking region of human gene.** *J Biol Chem.* 276(4):2440-50.

Hörlein A.J., Näär A.M., Heinzl T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Söderström M., Glass C.K., et al. (1995) **Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.** *Nature.* 377:397-404.

- Horowitz J.F., Leone T.C., Feng W., Kelly D.P., Klein S. (2000) **Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279(2):E348-55.
- Horswill A.R., Escalante-Semerena J.C. (2002) **Characterization of the propionyl-CoA synthetase (PrpE) enzyme of Salmonella enterica: residue Lys592 is required for propionyl-AMP synthesis.** *Biochemistry.* 41(7):2379-87.
- Horton J.D., Shah N.A., Warrington J.A., Anderson N.N., Park S.W., Brown M.S., Goldstein J.L. (2003) **Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(21):12027-32.
- Horton J.D. (2002a) **Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis.** *Biochem Soc Trans.* 30:1091-5.
- Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002b) **SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver.** *J Clin Invest.* 109(9):1125-31.
- Horton J.D., Bashmakov Y., Shimomura I., Shimano H. (1998a) **Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(11):5987-92.
- Horton J.D., Shimomura I., Brown M.S., Hammer R.E., Goldstein J.L., Shimano H. (1998b) **Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2.** *J Clin Invest.* 101(11):2331-9.
- Houseknecht K.L., Zhu A.X., Gnudi L., Hamann A., Zierath J.R., Tozzo E., Flier J.S., Kahn B.B. (1996) **Overexpression of Ha-ras selectively in adipose tissue of transgenic mice. Evidence for enhanced sensitivity to insulin.** *J Biol Chem.* 271(19):11347-55.
- Hsu M.H., Palmer C.N., Song W., Griffin K.J., Johnson E.F. (1998) **A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding.** *J Biol Chem.* 273(43):27988-97.
- Hu E., Kim J.B., Sarraf P., Spiegelman B.M. (1996) **Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma.** *Science.* 274(5295):2100-3.
- Hu E., Liang P., Spiegelman B.M. (1996) **AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.** *J Biol Chem.* 271(18):10697-703.
- Hua X., Sakai J., Ho Y.K., Goldstein J.L., Brown M.S. (1995) **Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection.** *J Biol Chem.* 270(49):29422-7.
- Hua X., Yokoyama C., Wu J., Briggs M.R., Brown M.S., Goldstein J.L., Wang X. (1993) **SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(24):11603-7.
- Huang W., Zhao S., Ammanamanchi S., Brattain M., Venkatasubbarao K., Freeman J.W. (2005) **Trichostatin A induces transforming growth factor beta type II receptor promoter activity and acetylation of Sp1 by recruitment of PCAF/p300 to a Sp1.NF-Y complex.** *J Biol Chem.* 280(11):10047-54.
- Hummasti S., Laffitte B.A., Watson M.A., Galardi C., Chao L.C., Ramamurthy L., Moore J.T., Tontonoz P. (2004) **Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target.** *J Lipid Res.* 45(4):616-25.



- Hung J.J., Wang Y.T., Chang W.C. (2006) **Sp1 deacetylation induced by phorbol ester recruits p300 to activate 12(S)-lipoxygenase gene transcription.** *Mol Cell Biol.* 26(5):1770-85.
- Huth W., Jonas R., Wunderlich I., Seubert W. (1975) **On the mechanism of ketogenesis and its control. Purification, kinetic mechanism and regulation of different forms of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolases from ox liver.** *Eur J Biochem.* 59(2):475-89.
- Ijpenberg A., Jeannin E., Wahli W., Desvergne B. (1997) **Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element.** *J Biol Chem.* 272(32):20108-17.
- Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., Guarente L. (2000) **Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase.** *Nature.* 403(6771):795-800.
- Imai T., Takakuwa R., Marchand S., Dentz E., Bornert J.M., Messaddeq N., Wendling O., Mark M., Desvergne B., Wahli W., Chambon P., Metzger D. (2004) **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(13):4543-7.
- Inagaki Y., Nemoto T., Nakao A., Dijke Pt., Kobayashi K., Takehara K., Greenwel P. (2001) **Interaction between GC box binding factors and Smad proteins modulates cell lineage-specific alpha 2(I) collagen gene transcription.** *J Biol Chem.* 276(19):16573-9.
- Ishikawa K., Shimazu T. (1976) **Daily rhythms of glycogen synthetase and phosphorylase activities in rat liver: influence of food and light.** *Life Sci.* 19(12):1873-8.
- Ito M., Fukui T., Saito T., Tomita K. (1987) **Inhibition of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver by fatty acyl-CoAs.** *Biochim Biophys Acta.* 922(3):287-93.
- Ito M., Fukui T., Saito T., Tomita K. (1986). **Acetoacetyl-CoA synthetase specific activity and concentration in rat tissues.** *Biochim Biophys Acta.* 876(2):280-7.
- Ito M., Fukui T., Kamokari M., Saito T., Tomita K. (1984) **Purification and characterization of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver.** *Biochim Biophys Acta.* 794(2):183-93.
- Iwahori A., Takahashi N., Nakamoto M., Iwama M., Fukui T. (2000) **cDNA-derived amino acid sequence of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver.** *FEBS Lett.* 466 pp. 239-243.
- Jackson S.M., Ericsson J., Osborne T.F., Edwards P.A. (1995) **NF-Y has a novel role in sterol-dependent transcription of two cholesterologenic genes.** *J Biol Chem.* 270(37):21445-8.
- Jackson S.P., MacDonald J.J., Lees-Miller S., Tjian R. (1990) **GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase.** *Cell.* 63(1):155-65.
- Jackson S.P., Tjian R. (1988) **O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation.** *Cell.* 55(1):125-33.
- Janowski B.A.. (2002) **The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20):12675-80.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., Mangelsdorf, D.J. (1996) **An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha.** *Nature.* 383:728-731.

- Javahery R., Khachi A., Lo K., Zenzie-Gregory B., Smale S.T. (1994) **DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells.** *Mol. Cell. Biol.* 14:116-127.
- Jin X., Shearman L.P., Weaver D.R., Zylka M.J., de Vries G.J., Reppert S.M. (1999) **A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock.** *Cell.* 96(1):57-68.
- Joseph S.B., Laffitte B.A., Patel P.H., Watson M.A., Matsukuma K.E., Walczak R., Collins J.L., Osborne T.F., Tontonoz P. (2002) **Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors.** *J Biol Chem.* 277(13):11019-25.
- Juge-Aubry C.E., Hammar E., Siegrist-Kaiser C., Pernin A., Takeshita A., Chin W.W., Burger A.G., Meier C.A. (1999) **Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent transactivating domain.** *J Biol Chem.* 274(15):10505-10.
- Juge-Aubry C., Pernin A., Favez T., Burger A.G., Wahli W., Meier C.A., Desvergne B. (1997) **DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region.** *J Biol Chem.* 272(40):25252-9.
- Juven-Gershon T., Hsu J.Y., Theisen J.W., Kadonaga J.T. (2008) **The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription.** *Curr Opin Cell Biol.* 20(3):253-9.
- Kageyama R., Merlino G., Pastan I. (1989) **Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoters without a TATA box.** *J Biol Chem.* 264:11508-15514.
- Kaelin W.G. Jr. (1999) **Functions of the retinoblastoma protein.** *Bioessays.* 21(11):950-8.
- Kageyama R., Pastan I. (1989) **Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription.** *Cell* 59:815-825.
- Kardassis D., Falvey E., Tsantili P., Hadzopoulou-Cladaras M., Zannis V. (2002) **Direct physical interactions between HNF-4 and Sp1 mediate synergistic transactivation of the apolipoprotein CIII promoter.** *Biochemistry.* 41(4):1217-28.
- Karlseder J., Rotheneder H., Wintersberger E. (1996) **Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F.** *Mol Cell Biol.* 16(4):1659-67.
- Kastner P., Mark M., Leid M., Gansmuller A., Chin W., Grondona J.M., Décimo D., Krezel W., Dierich A., Chambon P. (1996) **Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice.** *Genes Dev.* 10(1):80-92.
- Kawabe Y., Shimokawa T., Matsumoto A., Honda M., Wada Y., Yazaki Y., Endo A., Itakura H., Kodama T. (1995) **The molecular mechanism of the induction of the low density lipoprotein receptor by chenodeoxycholic acid in cultured human cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 208(1):405-11.
- Keller H., Dreyer C., Medin J., Mahfoudi A., Ozato K., Wahli W. (1993) **Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(6):2160-4.
- Kelly L.J., Vicario P.P., Thompson G.M., Candelore M.R., Doebber T.W., Ventre J., Wu M.S., Meurer R., Forrest M.J., Conner M.W., Cascieri M.A., Moller D.E. (1998) **Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression.** *Endocrinology.* 139(12):4920-7.

- Kennedy M.A., Venkateswaran A., Tarr P.T., Xenarios I., Kudoh J., Shimizu N., Edwards P.A. (2001) **Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein.** *J Biol Chem.* 276(42):39438-47.
- Kersten S. (2002) **Peroxisome proliferator activated receptors and obesity.** *Eur J Pharmacol.* 440(2-3):223-34.
- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. (1999) **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting.** *J Clin Invest.* 103(11):1489-98.
- Kim C.H., Heath C., Bertruch A., Hansen U. (1987). **Specific stimulation of simian virus 40 late transcription in vitro by a cellular factor binding the simian virus 40 21 base pair repeat promoter element.** *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6025-6029.
- Kim J.B., Sarraf P., Wright M., Yao K.M., Mueller E., Solanes G., Lowell B.B., Spiegelman B.M. (1998) **Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1.** *J Clin Invest.* 101(1):1-9.
- Kim J.B., Spiegelman B.M. (1996) **ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism.** *Genes Dev.* 10(9):1096-107.
- Kim J.B., Spotts G.D., Halvorsen Y.D., Shih H.M., Ellenberger T., Towle H.C., Spiegelman B.M. (1995) **Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain.** *Mol Cell Biol.* 15(5):2582-8.
- Kim K., Thu N., Saville B., Safe S. (2003) **Domains of estrogen receptor alpha (ERalpha) required for ERalpha/Sp1-mediated activation of GC-rich promoters by estrogens and antiestrogens in breast cancer cells.** *Mol Endocrinol.* 17(5):804-17.
- Kim S.C., Sprung R., Chen Y., Xu Y., Ball H., Pei J., Cheng T., Kho Y., Xiao H., Xiao L., Grishin N.V., White M., Yang X.J., Zhao Y. (2006) **Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey.** *Mol Cell.* 23(4):607-18.
- King D.P., Zhao Y., Sangoram A.M., Wilsbacher L.D., Tanaka M., Antoch M.P., Steeves T.D., Vitaterna M.H., Kornhauser J.M., Lowrey P.L., Turek F.W., Takahashi J.S. (1997) **Positional cloning of the mouse circadian clock gene.** *Cell.* 89(4):641-53.
- Kingsley C., Winoto A. (1992) **Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression.** *Mol Cell Biol.* 12(10):4251-61.
- Kishida K., Shimomura I., Nishizawa H., Maeda N., Kuriyama H., Kondo H., Matsuda M., Nagaretani H., Ouchi N., Hotta K., Kihara S., Kadowaki T., Funahashi T., Matsuzawa Y. (2001) **Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *J Biol Chem.* 276(51):48572-9.
- Kliwer S.A., Sundseth S.S., Jones S.A., Brown P.J., Wisely G.B., Koble C.S., Devchand P., Wahli W., Willson T.M., Lenhard J.M., Lehmann J.M. (1997) **Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(9):4318-23.
- Kliwer S.A., Lenhard J.M., Willson T.M., Patel I., Morris D.C., Lehmann J.M. (1995) **A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation.** *Cell.* 83(5):813-9.
- Kliwer S.A., Forman B.M., Blumberg B., Ong E.S., Borgmeyer U., Mangelsdorf D.J., Umesono K., Evans R.M. (1994) **Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(15):7355-9.

Kliwer S.A., Umesono K., Noonan D.J., Heyman R.A., Evans R.M. (1992) **Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors.** *Nature* 358:771–774.

Kohsaka A., Laposky A.D., Ramsey K.M., Estrada C., Joshu C., Kobayashi Y., Turek F.W., Bass J. (2007) **High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice.** *Cell Metab.* 6(5):414-21.

Kotzka J., Lehr S., Roth G., Avci H., Knebel B., Muller-Wieland D. (2004) **Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo.** *J Biol Chem.* 279(21):22404-11.

Kouzarides T. (2000) **Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?** *EMBO J.* 19(6):1176-9.

Krey G., Braissant O., L'Horsset F., Kalkhoven E., Perroud M., Parker M.G., Wahli W. (1997) **Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay.** *Mol Endocrinol.* 11(6):779-91.

Krey G., Mahfoudi A., Wahli W. (1995) **Functional interactions of peroxisome proliferator-activated receptor, retinoid-X receptor, and Sp1 in the transcriptional regulation of the acyl-coenzyme-A oxidase promoter.** *Mol Endocrinol.* 9(2):219-31.

Krezel W., Dupé V., Mark M., Dierich A., Kastner P., Chambon P. (1996) **RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta +/-RXR gamma +/- mutant mice are viable.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(17):9010-4.

Krogsdam A.M., Nielsen C.A., Neve S., Holst D., Helledie T., Thomsen B., Bendixen C., Mandrup S., Kristiansen K. (2002) **Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation.** *Biochem J.* 363(Pt 1):157-65.

Kubota N., Terauchi Y., Miki H., Tamemoto H., Yamauchi T., Komeda K., Satoh S., Nakano R., Ishii C., Sugiyama T., Eto K., Tsubamoto Y., Okuno A., Murakami K., Sekihara H., Hasegawa G., Naito M., Toyoshima Y., Tanaka S., Shiota K., Kitamura T., Fujita T., Ezaki O., Aizawa S., Kadowaki T., *et al.* (1999) **PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance.** *Mol Cell.* 4(4):597-609.

Kume K., Zylka M.J., Sriram S., Shearman L.P., Weaver D.R., Jin X., Maywood E.S., Hastings M.H., Reppert S.M. (1999) **mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop.** *Cell.* 98(2):193-205.

Kuriyama K, Sasahara K, Kudo T, Shibata S. (2004) **Daily injection of insulin attenuated impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse.** *FEBS Lett.* 572(1-3):206-10.

Kutach A.K., Kadonaga J.T. (2000) **The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters.** *Mol Cell Biol.* 20(13):4754-64.

Laffitte B.A., Chao L.C., Li J., Walczak R., Hummasti S., Joseph S.B., Castrillo A., Wilpitz D.C., Mangelsdorf D.J., Collins J.L., Saez E., Tontonoz P. (2003a) **Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(9):5419-24.

Laffitte B.A., Joseph S.B., Chen M., Castrillo A., Repa J., Wilpitz D., Mangelsdorf D., Tontonoz P. (2003b) **The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions.** *Mol Cell Biol.* 23(6):2182-91.

- Laffitte B.A., Joseph S.B., Walczak R., Pei L., Wilpitz D.C., Collins J.L., Tontonoz P. (2001a) **Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter.** *Mol Cell Biol.* 21(22):7558-68.
- Laffitte B.A., Repa J.J., Joseph S.B., Wilpitz D.C., Kast H.R., Mangelsdorf D.J., Tontonoz P. (2001b) **LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(2):507-12.
- Lagrange T., Kapanidis A.N., Tang H., Reinberg D., Ebright R.H. (1998). **New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: Sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB.** *Genes & Dev.* 12: 34-44.
- Laemmli U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227:680-685.
- Laperriere D., Wang T.T., White J.H., Mader S. (2007) **Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution.** *BMC Genomics.* 8:23.
- Larsen L.K., Amri E.Z., Mandrup S., Pacot C., Kristiansen K. (2002) **Genomic organization of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta gene: alternative promoter usage and splicing yield transcripts exhibiting differential translational efficiency.** *Biochem J.* 366(Pt 3):767-75.
- Lavery D.J., Schibler U. (1993) **Circadian transcription of the cholesterol 7 alpha hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP.** *Genes Dev.* 7(10):1871-84.
- Lazar M.A., Willson T.M. (2007) **Sweet dreams for LXR.** *Cell Metab.* 5(3):159-61.
- Lazarow P.B., Fujiki Y. (1985) **Biogenesis of peroxisomes.** *Annu Rev Cell Biol.* 1:489-530.
- Lazennec G., Canaple L., Saugy D., Wahli W. (2000) **Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators.** *Mol Endocrinol.* 14(12):1962-75.
- Le Minh N., Damiola F., Tronche F., Schütz G., Schibler U. (2001) **Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators.** *EMBO J.* 20(24):7128-36.
- Lee C., Etchegaray J.P., Cagampang F.R., Loudon A.S., Reppert S.M. (2001) **Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock.** *Cell.* 107(7):855-67.
- Lee C.H., Kang K., Mehl I.R., Nofsinger R., Alaynick W.A., Chong L.W., Rosenfeld J.M., Evans R.M. (2006) **Peroxisome proliferator-activated receptor {delta} promotes very low-density lipoprotein-derived fatty acid catabolism in the macrophage.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 pp. 2434–2439.
- Lee C.H., Chawla A., Urbiztondo N., Liao D., Boisvert W.A., Evans R.M., Curtiss L.K. (2003) **Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta.** *Science* 302 pp. 453–457.
- Lee S.J., Sekimoto T., Yamashita E., Nagoshi E., Nakagawa A., Imamoto N., Yoshimura M., Sakai H., Chong K.T., Tsukahara T., Yoneda Y. (2003) **The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor.** *Science.* 302(5650):1571-5.



- Lee S.S., Pineau T., Drago J., Lee E.J., Owens J.W., Kroetz D.L., Fernandez-Salguero P.M., Westphal H., Gonzalez F.J. (1995) **Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators.** *Mol Cell Biol.* 15(6):3012-22.
- Lee Y., Esch F.S., DeLuca M.A. (1981) **Identification of a lysine residue at a nucleotide binding site in the firefly luciferase with p-fluorosulfonyl[<sup>14</sup>C]benzoyl-5'-adenosine.** *Biochemistry.* 20(5):1253-6.
- Lefebvre A.M., Laville M., Vega N., Riou J.P., van Gaal L., Auwerx J., Vidal H. (1998) **Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects.** *Diabetes.* 47(1):98-103.
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J.C., Staels B. (2006) **Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis.** *J Clin Invest.* 116(3):571-80.
- Lehmann J.M., Kliewer S.A., Moore L.B., Smith-Oliver T.A., Oliver B.B., Su J.L., Sundseth S.S., Winegar D.A., Blanchard D.E., Spencer T.A., Willson T.M. (1997) **Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway.** *J Biol Chem.* 272(6):3137-40.
- Lehmann J.M., Moore L.B., Smith-Oliver T.A., Wilkison W.O., Willson T.M., Kliewer S.A. (1995) **An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma).** *J Biol Chem.* 270(22):12953-6.
- Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. (2008) **Insulin Signaling in the Pancreatic beta Cell.** *Annu Rev Nutr.*
- Lekstrom-Himes J., Xanthopoulos K.G. (1998) **Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors.** *J Biol Chem.* 273(44):28545-8.
- Lemberger T., Saladin R., Vázquez M., Assimacopoulos F., Staels B., Desvergne B., Wahli W., Auwerx J. (1996) **Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm.** *J Biol Chem.* 271(3):1764-9.
- Lemon B., Tjian R. (2000) **Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control.** *Genes Dev.* 14(20):2551-69.
- Leone T.C., Lehman J.J., Finck B.N., Schaeffer P.J., Wende A.R., Boudina S., Courtois M., Wozniak D.F., Sambandam N., Bernal-Mizrachi C., Chen Z., Holloszy J.O., Medeiros D.M., Schmidt R.E., Saffitz J.E., Abel E.D., Semenkovich C.F., Kelly D.P. (2005) **PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis.** *PLoS Biol.* (4):e101.
- Lewis G.F., Rader D.J. (2005) **New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport.** *Circ Res.* 96(12):1221-32.
- Li A., Xue Y., Jin C., Wang M., Yao X. (2006) **Prediction of Nepsilon-acetylation on internal lysines implemented in Bayesian Discriminant Method.** *Biochem Biophys Res Commun.* 350(4):818-24.
- Li A.C., Binder C.J., Gutierrez A., Brown K.K., Plotkin C.R., Pattison J.W., Villedor A.F., Davis R.A., Willson T.M., Witztum J.L., Palinski W., Glass C.K. (2004) **Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma.** *J Clin Invest.* 114(11):1564-76.
- Li A.C., Brown K.K., Silvestre M.J., Willson T.M., Palinski W., Glass C.K. (2000) **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice.** *J Clin Invest.* 106(4):523-31.

- Li R., Knight J.D., Jackson S.P., Tjian R., Botchan M.R. (1991) **Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription.** *Cell*. 65(3):493-505.
- Li X., Zhang S., Blander G., Tse J.G., Krieger M., Guarente L. (2007) **SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR.** *Mol Cell*. 28(1):91-106.
- Li Y., Bolten C., Bhat B.G., Woodring-Dietz J., Li S., Prayaga S.K., Xia C., Lala D.S. (2002) **Induction of human liver X receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism.** *Mol Endocrinol*. 16(3):506-14.
- Liang G., Yang J., Horton J.D., Hammer R.E., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002) **Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c.** *J Biol Chem*. 277(11):9520-8.
- Lim H., Gupta R.A., Ma W.G., Paria B.C., Moller D.E., Morrow J.D., DuBois R.N., Trzaskos J.M., Dey S.K. (1999) **Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta.** *Genes Dev*. 13(12):1561-74.
- Lin F.T., Lane M.D. (1994) **CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(19):8757-61.
- Lin F.T., Lane M.D. (1992) **Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.** *Genes Dev*. 6(4):533-44.
- Lin J., Wu P.H., Tarr P.T., Lindenberg K.S., St-Pierre J., Zhang C.Y., Mootha V.K., Jäger S., Vianna C.R., Reznick R.M., Cui L., Manieri M., Donovan M.X., Wu Z., Cooper M.P., Fan M.C., Rohas L.M., Zavacki A.M., Cinti S., Shulman G.I., Lowell B.B., Krainc D., Spiegelman B.M. (2004) **Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice.** *Cell* 119(1):121-35.
- Linhart H.G., Ishimura-Oka K., DeMayo F., Kibe T., Repka D., Poindexter B., Bick R.J., Darlington G.J. (2001) **C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(22):12532-7.
- Liu C., Li S., Liu T., Borjigin J., Lin J.D. (2007) **Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism.** *Nature* 447(7143):477-81.
- Lo K., Smale S.T. (1996) **Generality of a functional initiator consensus sequence.** *Gene*. 182(1-2):13-22.
- Lopes-Cardozo M., Koper J.W., Klein W., Van Golde L.M. (1984) **Acetoacetate is a cholesterogenic precursor for myelinating rat brain and spinal cord. Incorporation of label from [3-14C]acetoacetate, [14C]glucose and 3H2O.** *Biochim Biophys Acta*. 794(2):350-2.
- Lowe DM, Tubbs PK. (1985) **Succinylation and inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase by succinyl-CoA and its possible relevance to the control of ketogenesis.** *Biochem J*. 232(1):37-42.
- Lu S., Yao Y., Cheng X., Mitchell S., Leng S., Meng S., Gallagher J.W., Shelness G.S., Morris G.S., Mahan J., Frase S., Mansbach C.M., Weinberg R.B., Black D.D. (2006) **Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size.** *J Biol Chem*. 281(6):3473-83.
- Lu T.T., Repa J.J., Mangelsdorf D.J. (2001) **Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism.** *J Biol Chem* 276, 37735–37738.

- Lucas R.J., Freedman M.S., Lupi D., Munoz M., David-Gray Z.K., Foster R.G. (2001) **Identifying the photoreceptive inputs to the mammalian circadian system using transgenic and retinally degenerate mice.** *Behav Brain Res.* 125(1-2):97-102.
- Luo Y., Tall A.R. (2000) **Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element.** *J Clin Invest.* 105(4):513-20.
- Luquet S., Lopez-Soriano J., Holst D., Fredenrich A., Melki J., Rassoulzadegan M., Grimaldi P.A. (2003) **Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability.** *FASEB J.* 17(15):2299-301.
- Lusis A.J. (2000) **Atherosclerosis.** *Nature.* 407(6801):233-41.
- MacDonald M.J., Smith A.D. 3rd, Hasan N.M., Sabat G., Fahien L.A. (2007) **Feasibility of pathways for transfer of acyl groups from mitochondria to the cytosol to form short chain acyl-CoAs in the pancreatic beta cell.** *J Biol Chem.* 282(42):30596-606.
- MacDonald M.J., Fahien L.A., Brown L.J., Hasan N.M., Buss J.D., Kendrick M.A. (2005) **Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(1):E1-15.
- MacDougald O.A., Lane M.D. (1995) **Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation.** *Annu Rev Biochem.* 64:345-73.
- Macleod D., Charlton J., Mullins J., Bird A.P. (1994) **Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island.** *Genes Dev.* 8(19):2282-92.
- Mahajan M.A., Samuels H.H. (2005) **Nuclear hormone receptor coregulator: role in hormone action, metabolism, growth, and development.** *Endocr Rev.* 26(4):583-97.
- Maitland N.J., McDougall J.K. (1977) **Biochemical transformation of mouse cells by fragments of herpes simplex virus DNA.** *Cell* 11:233-241.
- Mak P.A., Kast-Woelbern H.R., Anisfeld A.M., Edwards P.A. (2002a) **Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors.** *J Lipid Res.* 43(12):2037-41.
- Mak P.A., Laffitte B.A., Desrumaux C., Joseph S.B., Curtiss L.K., Mangelsdorf D.J., Tontonoz P., Edwards P.A. (2002b) **Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta.** *J Biol Chem.* 277(35):31900-8.
- Mandel M., Higa A. (1970) **Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.** *J Mol Biol* 53(1), 159-162.
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. (1995) **The nuclear receptor superfamily: the second decade.** *Cell.* 83(6):835-9.
- Mangelsdorf D.J., Borgmeyer U., Heyman R.A., Zhou J.Y., Ong E.S., Oro A.E., Kakizuka A., Evans R.M. (1992) **Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid.** *Genes Dev.* 6(3):329-44.
- Marcus S.L., Miyata K.S., Zhang B., Subramani S., Rachubinski R.A., Capone J.P. (1993) **Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(12):5723-7.



- Marquez S., Crespo P., Carlini V., Garbarino-Pico E., Baler R., Caputto B.L., Guido M.E. (2004) **The metabolism of phospholipids oscillates rhythmically in cultures of fibroblasts and is regulated by the clock protein PERIOD 1.** *FASEB J.* 18(3):519-21.
- Martin G., Schoonjans K., Lefebvre A.M., Staels B., Auwerx J. (1997) **Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators.** *J Biol Chem.* 272(45):28210-7.
- Martinez-Balbás M.A., Bannister A.J., Martin K., Haus-Seuffert P., Meisterernst M., Kouzarides T. (1998) **The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription.** *EMBO J.* 17(10):2886-93.
- Mascaró C., Acosta E., Ortiz J.A., Marrero P.F., Hegardt F.G., Haro D. (1998) **Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor.** *J Biol Chem.* 273(15):8560-3.
- Mastrangelo I.A., Courey A.J., Wall J.S., Jackson S.P., Hough P.V. (1991) **DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(13):5670-4.
- Matsusue K., Haluzik M., Lambert G., Yim S.H., Gavrilova O., Ward J.M., Brewer B. Jr., Reitman M.L., Gonzalez F.J. (2003) **Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes.** *J Clin Invest.* 111(5):737-47.
- Mattagajasingh I., Kim C.S., Naqvi A., Yamamori T., Hoffman T.A., Jung S.B., DeRicco J., Kasuno K., Irani K. (2007) **SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(37):14855-60.
- McKinsey T.A., Olson E.N. (2004) **Cardiac histone acetylation--therapeutic opportunities abound.** *Trends Genet.* 20(4):206-13.
- McKnight S., Tjian R. (1986) **Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells.** *Cell* 46:795-805.
- McNamara D.J., Quackenbush F.W., Rodwell V.W. (1972) **Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Developmental pattern.** *J Biol Chem.* 247(18):5805-10.
- McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. (1991) **PCR practical approach.** Oxford University Press. New York.
- Menahan L.A., Hron W.T., Hinkelman D.G., Mizioro H.M. (1981) **Interrelationships between 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, acetoacetyl-CoA and ketogenesis.** *Eur J Biochem.* 119(2):287-94.
- Michalik L., Desvergne B., Basu-Modak S., Tan N.S., Wahli W. (2000) **Nuclear hormone receptors and mouse skin homeostasis: implication of PPARbeta.** *Horm Res.* 54(5-6):263-8.
- Middleton B. (1974) **The kinetic mechanism and properties of the cytoplasmic acetoacetyl-coenzyme A thiolase from rat liver.** *Biochem J.* 139(1):109-21.
- Middleton B. (1973a) **The acetoacetyl-coenzyme A thiolases of rat brain and their relative activities during postnatal development.** *Biochem J.* 132(4):731-7.
- Middleton B. (1973b) **The oxoacyl-coenzyme A thiolases of animal tissues.** *Biochem J.* 132(4):717-30.

Millatt L.J., Bocher V., Fruchart J.C., Staels B. (2003) **Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis.** *Biochim Biophys Acta.* 1631(2):107-18.

Miller DM, Polansky DA, Thomas SD, Ray R, Campbell VW, Sanchez J, Koller CA. **Mithramycin selectively inhibits transcription of G-C containing DNA.** *M J Med Sci* 294(5):388-94.

Misra I., Narasimhan C., Miziorko H.M. (1993) **Avian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase. Characterization of a recombinant cholesterologenic isozyme and demonstration of the requirement for a sulfhydryl functionality in formation of the acetyl-enzyme reaction intermediate.** *J Biol Chem.* 268(16):12129-35.

Mitchell P.J., Wang C., Tjian R. (1987). **Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer binding protein AP2 is inhibited by SV40 T antigen.** *Cell* 50:847-861.

Mitro N., Mak P.A., Vargas L., Godio C., Hampton E., Molteni V., Kreuzsch A., Saez E. (2007) **The nuclear receptor LXR is a glucose sensor.** *Nature.* 445(7124):219-23.

Miyata K.S., McCaw S.E., Meertens L.M., Patel H.V., Rachubinski R.A., Capone J.P. (1998) **Receptor-interacting protein 140 interacts with and inhibits transactivation by, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and liver-X-receptor alpha.** *Mol Cell Endocrinol.* 146(1-2):69-76.

Miziorko H.M., Laib F.E., Behnke C.E. (1990) **Evidence for substrate channeling in the early steps of cholesterologenesis.** *J Biol Chem.* 265(17):9606-9.

Moldes M., Zuo Y., Morrison R.F., Silva D., Park B.H., Liu J., Farmer S.R. (2003) **Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis.** *Biochem J.* 376(Pt 3):607-13.

Moller D.E. (2001) **New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome.** *Nature.* 414(6865):821-7.

Moore R.Y., Eichler V.B. (1972) **Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat.** *Brain Res.* 42,201-206.

Morrison R.F., Farmer S.R. (1999) **Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis.** *J Biol Chem.* 274(24):17088-97.

Motojima K., Passilly P., Peters J.M., Gonzalez F.J., Latruffe N. (1998) **Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner.** *J Biol Chem.* 273(27):16710-4.

Mukherjee R., Jow L., Croston G.E., Paterniti J.R. Jr. (1997) **Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists.** *J Biol Chem.* 272(12):8071-6.

Muñoz E., Brewer M., Baler R. (2002) **Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box.** *J Biol Chem.* 277(39):36009-17.

Muoio D.M., MacLean P.S., Lang D.B., Li S., Houmard J.A., Way J.M., Winegar D.A., Corton J.C., Dohm G.L., Kraus W.E. (2002a) **Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta.** *J Biol Chem.* 277(29):26089-97.

Muoio D.M., Way J.M., Tanner C.J., Winegar D.A., Klierwer S.A., Houmard J.A., Kraus W.E., Dohm G.L. (2002b) **Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells.** *Diabetes*. 51(4):901-9.

Murata Y., Kim H.G., Rogers K.T., Udvardia A.J., Horowitz J.M. (1994) **Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain.** *J Biol Chem*. 269(32):20674-81.

Näär A.M., Beaurang P.A., Robinson K.M., Oliner J.D., Avizonis D., Scheek S., Zwicker J., Kadonaga J.T., Tjian R. (1998) **Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro.** *Genes Dev*. 12(19):3020-31.

Nadra K., Anghel S.I., Joye E., Tan N.S., Basu-Modak S., Trono D., Wahli W., Desvergne B. (2006) **Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta.** *Mol Cell Biol*. 26(8):3266-81.

Nagaraj S., Gasser R. Ranganathan S. (2007) **A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis.** *Brief Bioinform* 8: 6-21.

Nagoshi E., Yoneda Y. (2001) **Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta.** *Mol Cell Biol*. 21(8):2779-89.

Nagoshi E., Imamoto N., Sato R., Yoneda Y. (1999) **Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip.** *Mol Biol Cell*. 10(7):2221-33.

Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J.G., Chen H., Evans R.M. (1998) **Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.** *Cell*. 93(2):229-40.

Nagy L., Kao H.Y., Chakravarti D., Lin R.J., Hassig C.A., Ayer D.E., Schreiber S.L., Evans R.M. (1997) **Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase.** *Cell*. 89(3):373-80.

Nakahata Y., Kaluzova M., Grimaldi B., Sahar S., Hirayama J., Chen D., Guarente L.P., Sassone-Corsi P. (2008) **The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control.** *Cell*. 134(2):329-40.

Nakamoto M, Takahashi N, Iwahori A, Sato H, Fukui T. (1999) **Effects of development on acetoacetyl-CoA synthetase biosynthesis in rat liver.** *Biol Pharm Bull*. 22(9):981-3.

Napal L., Marrero P.F., Haro D. (2005) **An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A.** *J Mol Biol*. 354(4):751-9.

Narkar V.A., Downes M., Yu R.T., Emblar E., Wang Y.X., Banayo E., Mihaylova M.M., Nelson M.C., Zou Y., Juguilon H., Kang H., Shaw R.J., Evans R.M. (2008) **AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics.** *Cell*. 134(3):405-15.

Necela B.M., Su W., Thompson EA. (2008) **Peroxisome proliferator activated receptor gamma downregulates follistatin in intestinal epithelial cells through sp1.** *J Biol Chem*. [Epub ahead of print].

Nehlig A. (2004) **Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 70(3):265-75.

- Nohturfft A., Brown M.S., Goldstein J.L. (1998) **Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain.** *J Biol Chem.* 273(27):17243-50.
- Norris A.W., Chen L., Fisher S.J., Szanto I., Ristow M., Jozsi A.C., Hirshman M.F., Rosen E.D., Goodyear L.J., Gonzalez F.J., Spiegelman B.M., Kahn C.R. (2003) **Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones.** *J Clin Invest.* 112(4):608-18.
- Norris J., Fan D., Aleman C., Marks J.R., Futreal P.A., Wiseman R.W., Iglehart J.D., Deininger P.L., McDonnell D.P. (1995) **Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor-dependent transcriptional enhancers.** *J Biol Chem.* 270(39):22777-82.
- Norton W.T., Poduslo S.E. (1973) **Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation.** *J Neurochem.* 21(4):759-73.
- Oberfield J.L., Collins J.L., Holmes C.P., Goreham D.M., Cooper J.P., Cobb J.E., Lenhard J.M., Hull-Ryde E.A., Mohr C.P., Blanchard S.G., Parks D.J., Moore L.B., Lehmann J.M., Plunket K., Miller A.B., Milburn M.V., Kliewer S.A., Willson T.M. (1999) **A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(11):6102-6.
- Odegaard J.I., Ricardo-Gonzalez R.R., Goforth M.H., Morel C.R., Subramanian V., Mukundan L., Eagle A.R., Vats D., Brombacher F., Ferrante A.W., Chawla A. (2007) **Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance.** *Nature.* 447(7148):1116-20.
- Ohgami M., Takahashi N., Yamasaki M., Fukui T. (2003) **Expression of acetoacetyl-CoA synthetase, a novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, in human brain.** *Biochem Pharmacol.* 65(6):989-94.
- Ohshima T., Koga H., Shimotohno K. (2004) **Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification.** *J Biol Chem.* 279(28):29551-7.
- Oishi K., Shirai H., Ishida N. (2005) **CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice.** *Biochem J.* 386(Pt 3):575-81.
- Okamura H., Miyake S., Sumi Y., Yamaguchi S., Yasui A., Muijtjens M., Hoeijmakers J.H., van der Horst G.T. (1999) **Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock.** *Science.* 286(5449):2531-4.
- Orgel, L.E. and Crick, F.H. (1980) **Selfish DNA: the ultimate parasite.** *Nature*, 284, 604–607
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. (1996) **The general transcription factors of RNA polymerase II.** *Genes Dev.* 10(21):2657-83.
- Ortiz J.A., Mallolas J., Nicot C., Bofarull J., Rodríguez J.C., Hegardt F.G., Haro D., Marrero P.F. (1999) **Isolation of pig mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene promoter: characterization of a peroxisome proliferator-responsive element.** *Biochem J.* 337 ( Pt 2):329-35.
- Osada S., Tsukamoto T., Takiguchi M., Mori M., Osumi T. (1997) **Identification of an extended half-site motif required for the function of peroxisome proliferator-activated receptor alpha.** *Genes Cells.* 2(5):315-27.

- O'Shea-Greenfield A, Smale ST. (1992) **Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription.** *J Biol Chem.* 267(2):1391-402.
- Pai J.T., Guryev O., Brown M.S., Goldstein J.L. (1998) **Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins.** *J Biol Chem.* 273(40):26138-48.
- Palmer C.N., Hsu M.H., Griffin H.J., Johnson E.F. (1995) Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J Biol Chem.* 270(27):16114-21.
- Panda S., Antoch M.P., Miller B.H., Su A.I., Schook A.B., Straume M., Schultz P.G., Kay S.A., Takahashi J.S., Hogenesch J.B. (2002) **Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock.** *Cell* 109(3):307-20.
- Pascal E., Tjian R. (1991) **Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism.** *Genes Dev.* 5(9):1646-56.
- Pascual G., Fong A.L., Ogawa S., Gamliel A., Li A.C., Perissi V., Rose D.W., Willson T.M., Rosenfeld M.G., Glass C.K. (2005) **A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma.** *Nature.* 437(7059):759-63.
- Patel M.S., Owen O.E. (1977) **Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain.** *J Neurochem.* 28(1):109-14.
- Pazin M.J., Sheridan P.L., Cannon K., Cao Z., Keck J.G., Kadonaga J.T., Jones K.A. (1996) **NF-kappa B-mediated chromatin reconfiguration and transcriptional activation of the HIV-1 enhancer in vitro.** *Genes Dev.* 10(1):37-49.
- Peet D.J., Turley S.D., Ma W., Janowski B.A., Lobaccaro J.M., Hammer R.E., Mangelsdorf D.J. (1998) **Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha.** *Cell.* 93(5):693-704.
- Peters J.M., Lee S.S., Li W., Ward J.M., Gavrilo O., Everett C., Reitman M.L., Hudson L.D., Gonzalez F.J. (2000) **Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta).** *Mol Cell Biol.* 20(14):5119-28.
- Peters J.M., Hennuyer N., Staels B., Fruchart J.C., Fievet C., Gonzalez F.J., Auwerx J. (1997) **Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice.** *J Biol Chem.* 272(43):27307-12.
- Peters J.M., Zhou Y.C., Ram P.A., Lee S.S., Gonzalez F.J., Waxman D.J. (1996) **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha required for gene induction by dehydroepiandrosterone-3 beta-sulfate.** *Mol Pharmacol.* 50(1):67-74.
- Philipsen S., Suske G. (1999) **A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors.** *Nucleic Acids Res.* 27(15):2991-3000.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. (1999) **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science.* 284(5411):143-7.
- Powell E., Kuhn P., Xu W. (2007) **Nuclear Receptor Cofactors in PPARgamma-Mediated Adipogenesis and Adipocyte Energy Metabolism.** *PPAR Res.* 2007:53843.
- Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. (2002) **The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator.** *Cell* 110(2):251-60.



- Provencio I., Rollag M.D., Castrucci A.M. (2002) **Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night.** *Nature*. 415(6871):493.
- Provencio I., Rodriguez I.R., Jiang G., Hayes W.P., Moreira E.F., Rollag M.D. (2000) **A novel human opsin in the inner retina.** *J Neurosci*. 2000 Jan 15;20(2):600-5.
- Pugh BF, Tjian R. (1991) **Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex.** *Genes Dev*. 5(11):1935-45.
- Puigserver P., Wu Z., Park C.W., Graves R., Wright M., Spiegelman B.M. (1998) **A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.** *Cell*. 92(6):829-39.
- Qi C., Zhu Y., Pan J., Yeldandi A.V., Rao M.S., Maeda N., Subbarao V., Pulikuri S., Hashimoto T., Reddy J.K. (1999) **Mouse steroid receptor coactivator-1 is not essential for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(4):1585-90.
- Quant P.A., Tubbs P.K., Brand M.D. (1990) **Glucagon activates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in vivo by decreasing the extent of succinylation of the enzyme.** *Eur J Biochem*. 187(1):169-74.
- Quinn C.M., Jessup W., Wong J., Kritharides L., Brown A.J. (2005) **Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands.** *Biochem J*. 385(Pt 3):823-30.
- Radhakrishnan A., Sun L.P., Kwon H.J., Brown M.S., Goldstein J.L. (2004) **Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain.** *Mol Cell*. 15(2):259-68.
- Ralph M.R., Foster R.G., Davis F.C., Menaker M. (1990) **Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period.** *Science*. 247(4945):975-8.
- Rangwala S.M., Lazar M.A. (2004) **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism.** *Trends Pharmacol Sci*. 25(6):331-6.
- Rangwala S.M., Rhoades B., Shapiro J.S., Rich A.S., Kim J.K., Shulman G.I., Kaestner K.H., Lazar M.A. (2003) **Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity.** *Dev Cell*. 5(4):657-63.
- Ray A., Prefontaine K.E. (1994) **Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(2):752-6.
- Ray R., Snyder R.C., Thomas S., Koller C.A., Miller D.M. (1989) **Mithramycin blocks protein binding and function of the SV40 early promoter.** *J Clin Invest*. 83(6): 2003-7.
- Reilly S.M., Lee C.H. (2008) **PPAR delta as a therapeutic target in metabolic disease.** *FEBS Lett*. 582(1):26-31.
- Repa J.J., Berge K.E., Pomajzl C., Richardson J.A., Hobbs H., Mangelsdorf D.J. (2002) **Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta.** *J Biol Chem*. 277(21):18793-800.
- Repa J.J., Liang G., Ou J., Bashmakov Y., Lobaccaro J.M., Shimomura I., Shan B., Brown M.S., Goldstein J.L., Mangelsdorf D.J. (2000a) **Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta.** *Genes Dev*. 14(22):2819-30.

- Repa J.J., Mangelsdorf D.J. (2000b). **The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:459-481.
- Repa J.J., Turley S.D., Lobaccaro J.-M.A., Medina J., Li L., Lustig K., Shan B., Heyman R.A., Dietschy J.M., Mangelsdorf D.J. (2000c) **Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers.** *Science* 289: 1524-1529.
- Reppert S.M., Weaver D.R. (2002) **Coordination of circadian timing in mammals.** *Nature.* 418(6901):935-41.
- Reppert S.M., Weaver D.R. (2001) **Molecular analysis of mammalian circadian rhythms.** *Annu Rev Physiol.* 63:647-76.
- Retnakaran R., Flock G., Giguère V. (1994) **Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator.** *Mol Endocrinol.* 8(9):1234-44.
- Reynolds G.A., Basu S.K., Osborne T.F., Chin D.J., Gil G., Brown M.S., Goldstein J.L., Luskey K.L. (1984) **HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions.** *Cell* (1):275-85.
- Richon V.M., Lyle R.E., McGehee R.E. Jr. (1997) **Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation.** *J Biol Chem.* 272(15):10117-24.
- Roberts P.J., Der C.J.(2007) **Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.** *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3291-310.
- Robinson A.M., Williamson D.H. (1980) **Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues.** *Physiol Rev.* 60(1):143-87.
- Robinson A.M., Williamson D.H. (1978) **Utilization of D-3-hydroxy[3-14C]butyrate for lipogenesis in vivo in lactating rat mammary gland.** *Biochem J.* 176(2):635-8.
- Robinson B.H., Sherwood W.G., Taylor J., Balfe J.W., Mamer O.A. (1979) **Acetoacetyl CoA thiolase deficiency: a cause of severe ketoacidosis in infancy simulating salicylism.** *J Pediatr.* 95(2):228-33.
- Robyr D., Wolffe A.P., Wahli W. (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol.* 14(3):329-47.
- Rodgers J.T., Lerin C., Gerhart-Hines Z., Puigserver P. (2008) **Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways.** *FEBS Lett.* 582(1):46-53.
- Rodríguez J.C., Gil-Gómez G., Hegardt F.G., Haro D. (1994) **Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids.** *J Biol Chem.* 269(29):18767-72.
- Roeder R.G. (1996) **The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II.** *Trends Biochem Sci.* 21(9):327-35.
- Rohr O, Aunis D, Schaeffer E. (1997) **COUP-TF and Sp1 interact and cooperate in the transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in human microglial cells.** *J Biol Chem.* 272(49):31149-55.
- Roos M.D., Su K., Baker J.R., Kudlow J.E. (1997) **O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions.** *Mol Cell Biol.* 17(11):6472-80.
- Rosen E.D., MacDougald O.A. (2006) **Adipocyte differentiation from the inside out.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(12):885-96.

- Rosen E.D., Hsu C.H., Wang X., Sakai S., Freeman M.W., Gonzalez F.J., Spiegelman B.M. (2002) **C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway.** *Genes Dev.* 16(1):22-6.
- Rosen E.D., Sarraf P., Troy A.E., Bradwin G., Moore K., Milstone D.S., Spiegelman B.M., Mortensen R.M. (1999) **PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.** *Mol Cell.* 4(4):611-7.
- Ross S., Choy L., Graves R.A., Fox N., Solvejeva V., Klaus S., Ricquier D., Spiegelman B.M. (1992) **Hibernoma formation in transgenic mice and isolation of a brown adipocyte cell line expressing the uncoupling protein gene.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 7561-7565.
- Ross S.E., Erickson R.L., Gerin I., DeRose P.M., Bajnok L., Longo K.A., Misek D.E., Kuick R., Hanash S.M., Atkins K.B., Andresen S.M., Nebb H.I., Madsen L., Kristiansen K., MacDougald O.A. (2002) **Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism.** *Mol Cell Biol.* 22(16):5989-99.
- Roth G., Kotzka J., Kremer L., Lehr S., Lohaus C., Meyer H.E., Krone W., Müller-Wieland D. (2000) **MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro.** *J Biol Chem.* 275(43):33302-7.
- Rowe A.H., Argmann C.A., Edwards J.Y., Sawyez C.G., Morand O.H., Hegele R.A., Huff M.W. (2003) **Enhanced synthesis of the oxysterol 24(S),25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase: a novel mechanism for the attenuation of foam cell formation.** *Circ Res.* 93(8):717-25.
- Rudic R.D., McNamara P., Curtis A.M., Boston R.C., Panda S., Hogenesch J.B., Fitzgerald G.A. (2004) **BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis.** *PLoS Biol.* 2(11):e377
- Rusak B. (1979) **Neural mechanisms for entrainment and generation of mammalian circadian rhythms.** *Fed Proc.* 38(12):2589-95.
- Russell D.W., Setchell K.D. (1992) **Bile acid biosynthesis.** *Biochemistry.* 31(20):4737-49.
- Rutter J., Reick M., Wu L.C., McKnight S.L. (2001) **Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors.** *Science.* 293(5529):510-4.
- Ryu H., Lee J., Olofsson B.A., Mwidau A., Dedeoglu A., Escudero M., Flemington E., Azizkhan-Clifford J., Ferrante R.J., Ratan R.R. (2003) **Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7):4281-6.
- Sabol S.L., Brewer H.B. Jr, Santamarina-Fojo S. (2005) **The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver.** *J Lipid Res.* 46(10):2151-67.
- Safe S., Kim K. (2004) **Nuclear receptor-mediated transactivation through interaction with Sp proteins.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 77:1-36.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 239(4839):487-91.
- Sakai J., Rawson R.B., Espenshade P.J., Cheng D., Seegmiller A.C., Goldstein J.L., Brown M.S. (1998) **Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells.** *Mol Cell.* 2(4):505-14.



- Sakamoto K., Nagase T., Fukui H., Horikawa K., Okada T., Tanaka H., Sato K., Miyake Y., Ohara O., Kako K., Ishida N. (1998) **Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain.** *J Biol Chem.* 273(42):27039-42.
- Saladin R., Fajas L., Dana S., Halvorsen Y.D., Auwerx J., Briggs M. (1999) **Differential regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma1 (PPARgamma1) and PPARgamma2 messenger RNA expression in the early stages of adipogenesis.** *Cell Growth Differ.* 10(1):43-8.
- Salam W.H., Wilcox H.G., Cagen L.M., Heimberg M. (1989) **Stimulation of hepatic cholesterol biosynthesis by fatty acids. Effects of oleate on cytoplasmic acetoacetyl-CoA thiolase, acetoacetyl-CoA synthetase and hydroxymethylglutaryl-CoA synthase.** *Biochem J.* 258(2):563-8.
- Salam W.H., Cagen L.M., Heimberg M. (1988) **Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis by fatty acids: effect of feeding olive oil on cytoplasmic acetoacetyl-coenzyme A thiolase, beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-CoA synthase, and acetoacetyl-coenzyme A ligase.** *Biochem Biophys Res Commun.* 153(1):422-7.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- Samson S.L., Wong N.C. (2002) **Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression.** *J Mol Endocrinol.* 29(3):265-79.
- Sanchez H.B., Yieh L., Osborne T.F. (1995) **Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene.** *J Biol Chem.* 270(3):1161-9.
- Sassa Y., Hata Y., Aiello L.P., Taniguchi Y., Kohno K., Ishibashi T. (2004) **Bifunctional properties of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 1 in KDR gene regulation mediated via interaction with both Sp1 and Sp3.** *Diabetes* 53:1222-1229.
- Sato H., Takahashi N., Nakamoto M., Ohgami M., Yamazaki M., Fukui T. (2002) **Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetoacetyl-CoA synthetase activity in rats.** *Biochem Pharmacol.* 63(10):1851-5.
- Sato O., Kuriki C., Fukui Y., Motojima K. (2002) **Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands.** *J Biol Chem.* 277(18):15703-11.
- Sato R., Inoue J., Kawabe Y., Kodama T., Takano T., Maeda M. (1996) **Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2.** *J Biol Chem.* 271(43):26461-4.
- Sato T.K., Panda S., Miraglia L.J., Reyes T.M., Rudic R.D., McNamara P., Naik K.A., FitzGerald G.A., Kay S.A., Hogenesch J.B. (2004) **A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock.** *Neuron.* 43(4):527-37.
- Schibler U., Sassone-Corsi P. (2002) **A web of circadian pacemakers.** *Cell.* 111(7):919-22.
- Schnitzer-Polokoff R., von Gunten C., Logel J., Torget R., Sinensky M. (1982) **Isolation and characterization of a mammalian cell mutant defective in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase.** *J Biol Chem.* 257(1):472-6.

- Schoonjans K., Peinado-Onsurbe J., Lefebvre A.M., Heyman R.A., Briggs M., Deeb S., Staels B., Auwerx J. (1996) **PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene.** *EMBO J.* 15(19):5336-48.
- Schoonjans K., Watanabe M., Suzuki H., Mahfoudi A., Krey G., Wahli W., Grimaldi P., Staels B., Yamamoto T., Auwerx J. (1995) **Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter.** *J Biol Chem.* 270(33):19269-76.
- Schultz J.R., Tu H., Luk A., Repa J.J., Medina J.C., Li L., Schwendner S., Wang S., Thoolen M., Mangelsdorf D.J., Lustig K.D., Shan B. (2000) **Role of LXRs in control of lipogenesis.** *Genes Dev.* 14(22):2831-8.
- Schwer B., Bunkenborg J., Verdin R.O., Andersen J.S., Verdin E. (2006) **Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(27):10224-9.
- Seglen P.O. (1973) **Glycogen synthesis in isolated parenchymal rat liver cells.** *FEBS Lett* 30(1):25-28.
- Sensi S., Pace-Palitti V., Guagnaro M.T., (1993) **Chronobiology in endocrinology.** *Ann 1st Super Sanita* (29) 613–631.
- Seo J.B., Moon H.M., Kim W.S., Lee Y.S., Jeong H.W., Yoo E.J., Ham J., Kang H., Park M.G., Steffensen K.R., Stulnig T.M., Gustafsson J.A., Park S.D., Kim J.B. (2004) **Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression.** *Mol Cell Biol.* 24(8):3430-44.
- Shalev A., Siegrist-Kaiser C.A., Yen P.M., Wahli W., Burger A.G., Chin W.W., Meier C.A. (1996) **The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin.** *Endocrinology.* 137(10):4499-502.
- Shao D., Lazar M.A. (1997) **Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation.** *J Biol Chem.* 272(34):21473-8.
- Shatnawi A, Tran T, Ratnam M. (2007) **R5020 and RU486 act as progesterone receptor agonists to enhance Sp1/Sp4-dependent gene transcription by an indirect mechanism.** *Mol Endocrinol* (3):635-50.
- Shearman L.P., Sriram S., Weaver D.R., Maywood E.S., Chaves I., Zheng B., Kume K., Lee C.C., van der Horst G.T., Hastings M.H., Reppert S.M. (2000) **Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock.** *Science.* 288(5468):1013-9.
- Shi Y., Downes M., Xie W., Kao H.Y., Ordentlich P., Tsai C.C., Hon M., Evans R.M. (2001) **Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation.** *Genes Dev.* 15(9):1140-51.
- Shimada J., Suzuki Y., Kim S.J., Wang P.C., Matsumura M., Kojima S. (2001) **Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction: characterization of binding between Sp1 and GC box motif.** *Mol Endocrinol.* 15(10):1677-92.
- Shimano H., Shimomura I., Hammer R.E., Herz J., Goldstein J.L., Brown M.S., Horton J.D. (1997a) **Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene.** *J Clin Invest.* 100(8):2115-24.

- Shimano H., Horton J.D., Shimomura I., Hammer R.E., Brown M.S., Goldstein J.L. (1997b) **Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells.** *J Clin Invest.* 99(5):846-54.
- Shimomura I., Bashmakov Y., Ikemoto S., Horton J.D., Brown M.S., Goldstein J.L. (1999) **Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(24):13656-61.
- Shimomura I., Hammer R.E., Richardson J.A., Ikemoto S., Bashmakov Y., Goldstein J.L., Brown M.S. (1998) **Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy.** *Genes Dev.* 12(20):3182-94.
- Shimomura I., Shimano H., Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (1997) **Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells.** *J Clin Invest.* 99(5):838-45.
- Shiota M., Magnuson M.A. (2008) **Hepatic glucose sensing: does flux matter?** *J Clin Invest.* 118(3):841-4.
- Shou Y., Baron S., Poncz M. (1998) **An Sp1-binding silencer element is a critical negative regulator of the megakaryocyte-specific  $\alpha$ IIb gene.** *J Biol Chem.* 273(10):5716-26.
- Silver R., LeSauter J., Tresco P.A., Lehman M.N. (1996) **A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms.** *Nature.* 382(6594):810-3.
- Singer V.L., Wobbe C.R., Struhl K. (1990) **A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation.** *Genes Dev.* 4(4):636-45.
- Smale S.T., Kadonaga J.T. (2003) **The RNA polymerase II core promoter.** *Annu Rev Biochem* 72:449-79.
- Smale S.T. (1997) **Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes.** *Biochim Biophys Acta.* 1351(1-2):73-88.
- Smale ST, Schmidt MC, Berk AJ, Baltimore D. (1990) **Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(12):4509-13.
- Smale S.T., Baltimore D. (1989) **The 'initiator' as a transcription control element.** *Cell* 57: 103-113
- Smith A.G., Muscat G.E. (2005) **Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease.** *Int J Biochem Cell Biol.* 37(10):2047-63.
- Smith J.R., Osborne T.F., Brown M.S., Goldstein J.L., Gil G. (1988) **Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase.** *J Biol Chem.* 263(34):18480-7.
- Solomin L., Johansson C.B., Zetterström R.H., Bissonnette R.P., Heyman R.A., Olson L., Lendahl U., Frisén J., Perlmann T. (1998) **Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord.** *Nature.* 395(6700):398-402.
- Söling HD, Kattermann R, Schmidt H, Kneer P. (1966) **The redox state of NAD<sup>+</sup>-NADH systems in rat liver during ketosis, and the so-called "triosephosphate block".** *Biochim Biophys Acta.* 115(1):1-14.

- Spengler M.L., Guo L.W., Brattain M.G. (2008) **Phosphorylation mediates Sp1 coupled activities of proteolytic processing, desumoylation and degradation.** *Cell Cycle*. 7(5):623-30.
- Spengler M.L., Brattain M.G. (2006) **Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription.** *J Biol Chem*. 281(9):5567-74.
- Spiegelman B.M., Choy L., Hotamisligil G.S., Graves R.A. Tontonoz P. (1993) **Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes.** *J Biol Chem* 268(10):6823-6
- Starai V.J., Celic I., Cole R.N., Boeke J.D., Escalante-Semerena J.C. (2002) **Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine.** *Science*. 298(5602):2390-2.
- Steiniger H.H., Sørensen H.N., Tugwood J.D., Skrede S., Spydevold O., Gautvik K.M. (1994) **Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription.** *Eur J Biochem*. 225(3):967-74.
- 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(6818):307-12.
- Sterchele P.F., Sun H., Peterson R.E., Vanden Heuvel J.P. (1996) **Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mRNA in rat liver.** *Arch Biochem Biophys*. 326(2):281-9.
- Stern J.R. (1971) **A role of acetoacetyl-CoA synthetase in acetoacetate utilization by rat liver cell fractions.** *Biochem Biophys Res Commun*. 44(4):1001-7.
- Stern, J.R. (1956) **Optical Properties of Acetoacetyl-S-Coenzyme A and its metal chelates.** *J. Biol Chem*. 221, 33-44.
- Stoeckman A.K., Towle H.C. (2002) **The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression.** *J Biol Chem*. 277(30):27029-35.
- Stokkan K.A., Yamazaki S., Tei H., Sakaki Y., Menaker M. (2001) **Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding.** *Science* 291(5503):490-3.
- Stoner M., Wormke M., Saville B., Samudio I., Qin C., Abdelrahim M., Safe S. (2004) **Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins.** *Oncogene*. 23(5):1052-63.
- Storch K.F., Lipan O., Leykin I., Viswanathan N., Davis F.C., Wong W.H., Weitz C.J. (2002) **Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart.** *Nature*. 417(6884):78-83.
- Ström A.C., Forsberg M., Lillhager P., Westin G. (1996) **The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression.** *Nucleic Acids Res*. 24(11):1981-6.
- Su K., Roos M.D., Yang X., Han I., Paterson A.J., Kudlow J.E. (1999) **An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation in vitro.** *J Biol Chem*. 274(21):15194-202.

- Su W., Jackson S., Tjian R., Echols H. (1991) **DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1.** *Genes Dev.* 5(5):820-6.
- Sugawara A., Uruno A., Kudo M., Ikeda Y., Sato K., Taniyama Y., Ito S., Takeuchi K. (2002) **Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  via an interaction with Sp1 in vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 277:9676–9683.
- Sugawara A., Takeuchi K., Uruno A., Ikeda Y., Arima S., Kudo M., Sato K., Taniyama Y., Ito S. (2001) **Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in vascular smooth muscle cells.** *Endocrinology* 142:3125–3134.
- Suske G. (1999) **The Sp-family of transcription factors.** *Gene.* 238(2):291-300.
- Suzuki T., Kimura A., Nagai R., Horikoshi M. (2000) **Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding.** *Genes Cells.* 5(1):29-41.
- Szanto A., Benko S., Szatmari I., Balint B.L., Furtos I., Rühl R., Molnar S., Csiba L., Garuti R., Calandra S., Larsson H., Diczfalusy U., Nagy L. (2004) **Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, peroxisome proliferator-activated receptor, and liver X receptor signaling in macrophages.** *Mol Cell Biol.* 24(18):8154-66.
- Tanaka T., Yamamoto J., Iwasaki S., Asaba H., Hamura H., Ikeda Y., Watanabe M., Magoori K., Ioka R.X., Tachibana K., Watanabe Y., Uchiyama Y., Sumi K., Iguchi H., Ito S., Doi T., Hamakubo T., Naito M., Auwerx J., Yanagisawa M., Kodama T., Sakai J. (2003) **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(26):15924-9.
- Tanaka T., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. (1997) **Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene.** *EMBO J.* 16(24):7432-43.
- Tanese N., Saluja D., Vassallo M.F., Chen J.L., Admon A. (1996) **Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(24):13611-6.
- Taylor S.M., Jones P.A. (1979) **Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine.** *Cell.* 17(4):771-9.
- Teboul M., Guillaumond F., Gréchez-Cassiau A., Delaunay F. (2008) **The Nuclear Hormone Receptors Family Round the Clock.** *Mol Endocrinol.* [Epub ahead of print].
- Thymiakou E., Zannis V.I., Kardassis D. (2007) **Physical and functional interactions between liver X receptor/retinoid X receptor and Sp1 modulate the transcriptional induction of the human ATP binding cassette transporter A1 gene by oxysterols and retinoids.** *Biochemistry* 46(41):11473-83.
- Tildon J.T., Cornblath M. (1972a) **Succinyl-CoA: 3-ketoacid CoA-transferase deficiency. A cause for ketoacidosis in infancy.** *J Clin Invest.* 51(3):493-8.
- Tildon J.T., Sevdalian D.A. (1972b). **CoA transferase in the brain and other mammalian tissues.** *Arch Biochem Biophys.* 148(2):382-90.
- Timchenko N.A., Wilde M., Nakanishi M., Smith J.R., Darlington G.J. (1996) **CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein.** *Genes Dev.* 10(7):804-15.



- Tobin K.A., Ulven S.M., Schuster G.U., Steineger H.H., Andresen S.M., Gustafsson J.A., Nebb H.I. (2002) **Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis.** *J Biol Chem.* 277(12):10691-7.
- Tomilin, N.V. (1999) **Control of genes by mammalian retroposons.** *Int. Rev. Cytol.* 186, 1–48.
- Tontonoz P., Spiegelman B.M. (2008) **Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma.** *Annu Rev Biochem.* 77:289-312.
- Tontonoz, P., and D.J. Mangelsdorf. (2003) **Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease.** *Mol. Endocrinol.* 17: 985–993.
- Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J.G., Thomazy V.A., Evans R.M. (1998) **PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.** *Cell.* 93(2):241-52.
- Tontonoz P., Hu E., Devine J., Beale E.G., Spiegelman B.M. (1995) **PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene.** *Mol Cell Biol.* 15(1):351-7.
- Tontonoz P., Hu E., Graves R.A., Budavari A.I., Spiegelman B.M. (1994a) **mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer.** *Genes Dev.* 8(10):1224-34.
- Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. (1994b) **Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor.** *Cell.* 79(7):1147-56.
- Tontonoz P., Kim J.B., Graves R.A., Spiegelman B.M. (1993) **ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation.** *Mol Cell Biol.* 13(8):4753-9.
- Torra I.P., Ismaili N., Feig J.E., Xu C.F., Cavaotto C., Pancratov R., Rogatsky I., Neubert T.A., Fisher E.A., Garabedian M.J. (2008) **Phosphorylation of liver X receptor alpha selectively regulates target gene expression in macrophages.** *Mol Cell Biol.* 28(8):2626-36.
- Travnickova-Bendova Z., Cermakian N., Reppert S.M., Sassone-Corsi P. (2002) **Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(11):7728-33.
- Tugwood J.D., Issemann I., Anderson R.G., Bundell K.R., McPheat W.L., Green S. (1992) **The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene.** *EMBO J* 11:433–439.
- Turner J., Crossley M. (1999) **Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger.** *Trends Biochem Sci* 24: 236-240.
- Ueda H.R., Chen W., Adachi A., Wakamatsu H., Hayashi S., Takasugi T., Nagano M., Nakahama K., Suzuki Y., Sugano S., Iino M., Shigeyoshi Y., Hashimoto S. (2002) **A transcription factor response element for gene expression during circadian night.** *Nature* 418(6897):534-9
- Ullu, E. and Tschudi, C. (1984) **Alu sequences are processed 7SL RNA genes.** *Nature* 312: 171-172
- Umesono K., Murakami K.K., Thompson C.C., Evans R.M. (1991) **Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors.** *Cell.* 1191 65(7):1255-66.
- Umek R.M., Friedman A.D., McKnight S.L. (1991) **CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch.** *Science.* 251(4991):288-92.

- Uysal K.T., Wiesbrock S.M., Marino M.W., Hotamisligil G.S. (1997) **Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function.** *Nature*. 389(6651):610-4.
- van Bilsen M., van der Vusse G.J., Gilde A.J., Lindhout M., van der Lee K.A. (2002) **Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression.** *Mol Cell Biochem*. 239(1-2):131-8.
- van der Lee K.A., Vork M.M., De Vries J.E., Willemsen P.H., Glatz J.F., Reneman R.S., Van der Vusse G.J., Van Bilsen M. (2000) **Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes.** *J Lipid Res*. 41(1):41-7.
- Van Dyke M.W., Dervan P.B. (1983) **Chromomycin, mithramycin and olivomycin binding sites on heterogeneous deoxyribonucleic acid. Footprinting with (methidiumpropyl-EDTA) iron (II).** *Biochemistry* 22:2373-2377.
- Vansant G., Reynolds W.F. (1995) **The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(18):8229-33.
- Venkateswaran A., Repa J.J., Lobaccaro J.M., Bronson A., Mangelsdorf D.J., Edwards P.A. (2000) **Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols.** *J Biol Chem*. 275(19):14700-7.
- Verrijzer C.P., Tjian R. (1996) **TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity.** *Trends Biochem Sci*. 21(9):338-42.
- Vidal-Puig A.J., Considine R.V., Jimenez-Liñan M., Werman A., Pories W.J., Caro J.F., Flier J.S. (1997) **Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids.** *J Clin Invest*. 99(10):2416-22.
- Vidal-Puig A., Jimenez-Liñan M., Lowell B.B., Hamann A., Hu E., Spiegelman B., Flier J.S., Moller D.E. (1996) **Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents.** *J Clin Invest*. 97(11):2553-61.
- Vidali G., Gershey E.L., Allfrey V.G. (1968) **Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones.** *J Biol Chem*. 243(24):6361-6.
- Vitaterna M.H., Selby C.P., Todo T., Niwa H., Thompson C., Fruechte E.M., Hitomi K., Thresher R.J., Ishikawa T., Miyazaki J., Takahashi J.S., Sancar A. (1999) **Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(21):12114-9.
- Vlahcevic Z.R., Pandak W.M., Stravitz R.T. (1999) **Regulation of bile acid biosynthesis.** *Gastroenterol Clin North Am*. 28(1):1-25, v.
- Vogelstein B., Gillespie D. (1979) **Preparative and analytical purification of DNA from agarose.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(2):615-9.
- Volpe J.J., Kishimoto Y. (1972) **Fatty acid synthetase of brain: development, influence of nutritional and hormonal factors and comparison with liver enzyme.** *J Neurochem*. 19(3):737-53.
- Wan Y.J., Cai Y., Lungo W., Fu P., Locker J., French S., Sucov H.M. (2000a) **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated pathways are altered in hepatocyte-specific retinoid X receptor alpha-deficient mice.** *J Biol Chem*. 275(36):28285-90.

- Wan Y.J., An D., Cai Y., Repa J.J., Hung-Po Chen T., Flores M., Postic C., Magnuson M.A., Chen J., Chien K.R., French S., Mangelsdorf D.J., Sucov H.M. (2000b) **Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver.** *Mol Cell Biol.* 20(12):4436-44.
- Wang H., Maechler P., Antinozzi P.A., Herrero L., Hagenfeldt-Johansson K.A., Bjorklund A., Wollheim C.B. (2003) **The transcription factor SREBP-1c is instrumental in the development of beta-cell dysfunction.** *J Biol Chem.* 278(19):16622-9.
- Wang N.D., Finegold M.J., Bradley A., Ou C.N., Abdelsayed S.V., Wilde M.D., Taylor L.R., Wilson D.R., Darlington G.J. (1995) **Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice.** *Science.* 269(5227):1108-12.
- Wang X., Sato R., Brown M.S., Hua X., Goldstein J.L. (1994) **SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis.** *Cell.* 77(1):53-62.
- Wang X., Briggs M.R., Hua X., Yokoyama C., Goldstein J.L., Brown M.S. (1993) **Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization.** *J Biol Chem.* 268(19):14497-504.
- Wang Y.X., Zhang C.L., Yu R.T., Cho H.K., Nelson M.C., Bayuga-Ocampo C.R., Ham J., Kang H., Evans R.M. (2004) **Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta.** *PLoS Biol.* 2(10):e294.
- Wang Y.X., Lee C.H., Tiep S., Yu R.T., Ham J., Kang H., Evans R.M. (2003) **Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity.** *Cell.* 113(2):159-70.
- Watkins P.A., Maignel D., Jia Z., Pevsner J. (2007) **Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome.** *J Lipid Res.* (12):2736-50.
- Watson J.A., Lowenstein J.M. (1970) **Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. Fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria.** *J Biol Chem.* 245(22):5993-6002.
- Weaver D.R. (1998) **The suprachiasmatic nucleus: A 25-year retrospective.** *J Biol Rhythms* 13:100-112.
- Webber R.J., Edmond J. (1979) **The in vivo utilization of acetoacetate, D(-)-3-hydroxybutyrate, and glucose for lipid synthesis in brain in the 18-day-old rat. Evidence for an acetyl-CoA bypass for sterol synthesis.** *J Biol Chem.* 254(10):3912-20.
- Webber RJ, Edmond J. (1977) **Utilization of L(+)-3-hydroxybutyrate, D(-)-3-hydroxybutyrate, acetoacetate, and glucose for respiration and lipid synthesis in the 18-day-old rat.** *J Biol Chem.* 252(15):5222-6.
- Weis L., Reinberg D. (1997) **Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins.** *Mol Cell Biol.* 17(6):2973-84.
- Wellen K.E., Hotamisligil G.S. (2005) **Inflammation, stress, and diabetes.** *J Clin Invest.* 115(5):1111-9.
- Whitney K.D., Watson M.A., Goodwin B., Galardi C.M., Maglich J.M., Wilson J.G., Willson T.M., Collins J.L., Kliewer S.A. (2001) **Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRA gene in human macrophages.** *J Biol Chem.* 276(47):43509-15.
- Wigler M., Silverstein S., Lee S.L., Pellicer A., Cheng V.C., Axel R. (1977). **Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells.** *Cell* 11:223-232.



- Wiley S.R., Kraus R.J., Mertz J.E. (1992) **Functional binding of the "TATA" box binding component of transcription factor TFIID to the -30 region of TATA-less promoters.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(13):5814-8.
- Williamson D.H., Ilic V. (1985) **Activities of enzymes of acetoacetate metabolism in rat brown adipose tissue during development.** *Biochem J.* 231(3):773-5.
- Williamson D.H., Bates M.W., Page M.A., Krebs H.A. (1971) **Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues.** *Biochem J.* 121(1):41-7.
- Williamson DH, Bates MW, Krebs HA. (1968) **Activity and intracellular distribution of enzymes of ketone-body metabolism in rat liver.** *Biochem J.* 108(3):353-61.
- Willson T.M., Brown P.J., Sternbach D.D., Henke B.R. (2000) **The PPARs: from orphan receptors to drug discovery.** *J Med Chem.* 43(4):527-50.
- Willy P.J., Mangelsdorf D.J. (1997) **Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR.** *Genes & Dev.* 11: 289-298.
- Willy P.J., Umesono K., Ong E.S., Evans R.M., Heyman R.A., Mangelsdorf D.J. (1995) **LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway.** *Genes Dev.* 9, 1033–1045.
- Whitney K.D., Watson M.A., Goodwin B., Galardi C.M., Maglich J.M., Wilson J.G., Willson T.M., Collins J.L., Kliewer S.A. (2001) **Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRA gene in human macrophages.** *J Biol Chem.* 276(47):43509-15
- Woelfle M.A., Ouyang Y., Phanvijhitsiri K., Johnson C.H.(2004) **The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria.** *Curr Biol.* 14(16):1481-6.
- Won J., Yim J., Kim T.K. (2002) **Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells.** *J Biol Chem.* 277(41):38230-8.
- Wong J., Quinn C.M., Brown A.J. (2004) **Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver x receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(12):2365-71.
- Wright H.M., Clish C.B., Mikami T., Hauser S., Yanagi K., Hiramatsu R., Serhan C.N., Spiegelman B.M. (2000) **A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation.** *J Biol Chem.* 275(3):1873-7.
- Wright K.P. Jr, Czeisler C.A. (2002) **Absence of circadian phase resetting in response to bright light behind the knees.** *Science.* 297(5581):571.
- Wu Z., Rosen E.D., Brun R., Hauser S., Adelmant G., Troy A.E., McKeon C., Darlington G.J., Spiegelman B.M. (1999) **Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity.** *Mol Cell.* 3(2):151-8.
- Wu Z., Bucher N.L., Farmer S.R. (1996) **Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids.** *Mol Cell Biol.* 16(8):4128-36.
- Wu Z., Xie Y., Bucher N.L., Farmer S.R. (1995) **Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis.** *Genes Dev.* 9(19):2350-63.
- Xing G., Zhang L., Zhang L., Heynen T., Yoshikawa T., Smith M., Weiss S., Detera-Wadleigh S. (1995) **Rat PPAR delta contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei.** *Biochem Biophys Res Commun.* 217(3):1015-25.

- Xing H., Northrop J.P., Grove J.R., Kilpatrick K.E., Su J.L., Ringold G.M. (1997) **TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression.** *Endocrinology*. 138(7):2776-83.
- Xu H.E., Lambert M.H., Montana V.G., Plunket K.D., Moore L.B., Collins J.L., Oplinger J.A., Kliewer S.A., Gampe R.T. Jr, McKee D.D., Moore J.T., Willson T.M. (2001) **Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(24):13919-24.
- Xu L., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (1999) **Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function.** *Curr Opin Genet Dev*. 9(2):140-7.
- Yabe D., Komuro R., Liang G., Goldstein J.L., Brown M.S. (2003) **Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(6):3155-60.
- Yabe D., Brown M.S., Goldstein J.L. (2002) **Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(20):12753-8.
- Yagita K., Tamanini F., Yasuda M., Hoeijmakers J.H., van der Horst G.T., Okamura H. (2002) **Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein.** *EMBO J*. 21(6):1301-14.
- Yamamoto T., Shimano H., Inoue N., Nakagawa Y., Matsuzaka T., Takahashi A., Yahagi N., Sone H., Suzuki H., Toyoshima H., Yamada N. (2007) **Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver.** *J Biol Chem*. 282(16):11687-95.
- Yamasaki M., Hasegawa S., Kitani T., Hidai K., Fukui T. (2007) **Differential effects of obesity on acetoacetyl-CoA synthetase gene in rat adipose tissues.** *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 109:617-622.
- Yamasaki M., Hasegawa S., Suzuki H., Hidai K., Saitoh Y., Fukui T. (2005) **Acetoacetyl-CoA synthetase gene is abundant in rat adipose, and related with fatty acid synthesis in mature adipocytes.** *Biochem Biophys Res Commun*. 335(1):215-9.
- Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A., Takahashi R., Ueda M., Block G.D., Sakaki Y., Menaker M., Tei H. (2000) **Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats.** *Science*. 288(5466):682-5.
- Yang C., Bolotin E., Jiang T., Sladek F.M., Martinez E. (2007) **Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters.** *Gene*. 389(1):52-65.
- Yang T., Espenshade P.J., Wright M.E., Yabe D., Gong Y., Aebersold R., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002) **Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER.** *Cell*. 110(4):489-500.
- Yang X., Downes M., Yu R.T., Bookout A.L., He W., Straume M., Mangelsdorf D.J., Evans R.M. (2006) **Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism.** *Cell* 126(4):801-10.
- Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, Kudlow JE. (2001) **O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(12):6611-6.

- Yang X.J., Seto E. (2008) **Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications.** *Mol Cell.* 31(4):449-61.
- Yang X.J. (2005) **Multisite protein modification and intramolecular signaling.** *Oncogene.* 24(10):1653-62.
- Yang X.J. (2004a) **Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling.** *Bioessays.* 26(10):1076-87.
- Yang X.J. (2004b) **The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases.** *Nucleic Acids Res.*32(3):959-76.
- Yang-Yen H.F., Chambard J.C., Sun Y.L., Smeal T., Schmidt T.J., Drouin J., Karin M. (1990) **Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction.** *Cell.* 62(6):1205-15.
- Ye J.M., Dzamko N., Cleasby M.E., Hegarty B.D., Furler S.M., Cooney G.J., Kraegen E.W. (2004) **Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin.** *Diabetologia.* 47(7):1306-13.
- Yeh W.C., Cao Z., Classon M., McKnight S.L. (1995) **Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins.** *Genes & Dev.* 15: 168-181.
- Yeh Y.Y., Streuli V.L., Zee P. (1977) **Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rat.** *Lipids* 12(11):957-64.
- Yieh L., Sanchez H.B., Osborne T.F. (1995) **Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(13):6102-6.
- Yin L., Wang J., Klein P.S., Lazar M.A. (2006) **Nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock.** *Science* 311(5763): 1002-1005.
- Yokoyama C., Wang X., Briggs M.R., Admon A., Wu J., Hua X., Goldstein J.L., Brown M.S. (1993) **SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene.** *Cell.* 75(1):187-97.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. and Beppu, T. (1990) **Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A.** *J. Biol. Chem.* 265, 17174–17179.
- Yoshikawa T., Shimano H., Amemiya-Kudo M., Yahagi N., Hasty A.H., Matsuzaka T., Okazaki H., Tamura Y., Iizuka Y., Ohashi K., Osuga J., Harada K., Gotoda T., Kimura S., Ishibashi S., Yamada N. (2001) **Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter.** *Mol Cell Biol.* 21(9):2991-3000.
- Young M.W., Kay S.A. (2001) **Time zones: a comparative genetics of circadian clocks.** *Nat Rev Genet.* 2(9):702-15.
- Yu C., Markan K., Temple K.A., Deplewski D., Brady M.J., Cohen R.N. (2005) **The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis.** *J Biol Chem.* 280(14):13600-5.
- Yu G.S., Lu Y.C., Gulick T. (1998) **Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase I $\beta$  gene promoters by fatty acid enzyme substrate.** *J Biol Chem.* 273(49):32901-9.

- Yu W., Nomura M., Ikeda M. (2002) **Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2.** *Biochem Biophys Res Commun.* 290(3):933-41.
- Zamir I., Dawson J., Lavinsky R.M., Glass C.K., Rosenfeld M.G., Lazar M.A. (1997a) **Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(26):14400-5.
- Zamir I., Zhang J., Lazar M.A. (1997b) **Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors.** *Genes Dev.* 11(7):835-46.
- Zelcer N., Tontonoz P. (2006) **Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling.** *J Clin Invest.* 116(3):607-14.
- Zenzie-Gregory B., Khachi A., Garraway I.P., Smale S.T. (1993) **Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence.** *Mol Cell Biol.* 13(7):3841-9.
- Zhang J.W., Klemm D.J., Vinson C., Lane M.D. (2004) **Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis.** *J Biol Chem.* 279(6):4471-8.
- Zhang X., Yuan Z., Zhang Y., Yong S., Salas-Burgos A., Koomen J., Olashaw N., Parsons J.T., Yang X.J., Dent S.R., Yao T.P., Lane W.S., Seto E. (2007) **HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin.** *Mol Cell.* 27(2):197-213.
- Zhang Y., Dufau ML. (2002a) **Silencing of transcription of the human luteinizing hormone receptor gene by histone deacetylase-mSin3A complex.** *J Biol Chem.* 277(36):33431-8.
- Zhang Y., Mangelsdorf D.J. (2002b) **LuXuRies of lipid homeostasis: the unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing.** *Mol Interv.* 2(2):78-87.
- Zhang, Y., Repa, J.J., Gauthier, K., and Mangelsdorf, D.J. (2001) **Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta.** *J. Biol. Chem.* 276, 43018–43024.
- Zhou Y.T., Shimabukuro M., Wang M.Y., Lee Y., Higa M., Milburn J.L., Newgard C.B., Unger R.H. (1998) **Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in disease of pancreatic beta cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(15):8898-903.
- Zhu Y., Qi C., Jain S., Rao M.S., Reddy J.K. (1997) **Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor.** *J Biol Chem.* 272(41):25500-6.
- Zhu Y., Qi C., Calandra C., Rao M.S., Reddy J.K. (1996) **Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *Gene Expr.* 6(3):185-95.
- Zhu Y., Qi C., Korenberg J.R., Chen X.N., Noya D., Rao M.S., Reddy J.K. (1995) **Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(17):7921-5.
- Zuo Y., Qiang L., Farmer S.R. (2006) **Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter** *J Biol Chem.* 281(12):7960-7.

**APÈNDIX**



## 1. ABREVIATURES.

<b>Ab</b>	Anticòs
<b>AACS</b>	Acetoacetil-CoA sintetasa
<b>AcAc</b>	Acetoacetat
<b>ACC1</b>	Acetil-CoA carboxilasa
<b>Ac-AACS</b>	Acetoacetil-CoA sintetasa acetilada
<b>Ac-Lys</b>	Acetil Lisina
<b>ACO</b>	Acil-CoA oxidasa
<b>ACS</b>	Acetil-CoA sintetasa
<b>Act D</b>	Actinomicina D
<b>ADD1</b>	<i>Adipocyte determination and differentiation factor-1 (SREBP-1c)</i>
<b>AF1</b>	Regió d'activació no depenent de lligant
<b>AF2</b>	Regió d'activació dependent de lligant
<b>AIM</b>	<i>Apoptosis inhibitor expressed by macrophages</i>
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfat
<b>Apo</b>	Apolipoproteïna
<b>Ap2</b>	Proteïna adipocitària unidora d'àcids grassos ( <i>adipocyte fatty acid-binding protein</i> )
<b>AP-2</b>	<i>Activator protein-2</i>
<b>APS</b>	Persulfat amònic
<b>Arg</b>	Arginina
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>atm</b>	Atmosferes
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfat
<b>bHLH</b>	Domini bàsic hèlix-volta-hèlix
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BMAL</b>	<i>Brain and muscle Arnt-like protein</i>
<b>β-OHB</b>	β-hidroxibutirat o 3-hidroxibutirat
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sèrica
<b>Btd</b>	Domini <i>Buttonhead</i>
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>Ci</b>	Curie
<b>cDNA</b>	DNA còpia
<b>C/EBP</b>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
<b>CETP</b>	Proteïna transferidora d'esters de colesterol
<b>ChIP</b>	Immunoprecipitació de cromatina
<b>Cho</b>	Colesterol
<b>ChREBP</b>	<i>Carbohydrate responsive element-binding protein</i>
<b>CHX</b>	Cicloheximida

<b>CIAP</b>	Fosfatasa alcalina de vedella
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CoA</b>	Coenzim A
<b>cpm</b>	Comptes per minut
<b>CPT</b>	Carnitina palmitoil transferasa
<b>CRY</b>	Criptocrom
<b>CT</b>	Temps circadiari
<b>CTE</b>	Extensió carboxi-terminal
<b>Cyp27</b>	Colesterol 27 hidrolasa
<b>D</b>	Dia
<b>DBD</b>	Domini d'unió a DNA
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>dNTP</b>	Desoxiribonucleòtid trifosfat
<b>Dox</b>	Doxiciclina
<b>DPE</b>	<i>Downstream promoter element</i>
<b>DR</b>	Repetició directa
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Etilendiaminotetracetat
<b>ER</b>	Repetició eversa
<b>Erk</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>EST</b>	Marca de seqüència expressada ( <i>expressed sequence tag</i> )
<b>ETF</b>	<i>EGFR-specific transcription factor</i>
<b>FABP</b>	Proteïna d'unió a àcids grassos ( <i>Fatty acid binding protein</i> )
<b>FAS</b>	Àcid gras sintasa ( <i>Fatty acid synthase</i> )
<b>FAT/CD36</b>	Translocasa d'àcids grassos ( <i>Fatty acid translocase</i> )
<b>FATP</b>	Proteïna transportadora d'àcids grassos ( <i>Fatty acid transport protein</i> )
<b>FBS</b>	Sèrum boví fetal
<b>FFA</b>	Àcids grassos lliures
<b>GCF-1</b>	GC factor
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>GST</b>	Glutatió-S-Transferasa
<b>GTF</b>	Factor de transcripció general ( <i>General transcription factor</i> )
<b>HAT</b>	Histona acetil transferasa
<b>HBS</b>	Tampó Hepes ( <i>Hepes-Buffered Saline</i> )
<b>HDAC</b>	Histona desacetilasa
<b>HDL</b>	Lipoproteïna d'alta densitat



<b>HEPES</b>	Àcid N-(2-hidroxietil)-pirenacina-N'-2-etanosulfònic
<b>HMG-CoA</b>	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzim A
<b>HMGCS1</b>	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzim A sintetasa citosòlica
<b>HMGCS2</b>	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzim A sintetasa mitocondrial
<b>HRE</b>	Element de resposta a hormona
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormona ( <i>Hormone sensitive lipase</i> )
<b>IBMX</b>	Isobutilmetilxantina
<b>Ig</b>	Immunoglobulina
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>Inr</b>	Element Iniciador
<b>Ins</b>	Insulina
<b>Insig</b>	<i>Insulin-induced gene protein</i>
<b>IP</b>	Immunoprecipitat
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactopiranòsid
<b>IR</b>	Repetició inversa
<b>k</b>	Kilo ( $10^{-3}$ )
<b>K</b>	Lisina
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>Km</b>	Constant de Michaelis-Menten
<b>KKRR</b>	Substitució de dos residus de lisina per arginina
<b>KR</b>	Substitució d'un residu de lisina per arginina
<b>LB</b>	Medi de cultiu Luria-Bertrani
<b>LBD</b>	Domini d'unió a lligant ( <i>Ligand binding domain</i> )
<b>LCAD</b>	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena llarga ( <i>Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase</i> )
<b>LCAS</b>	Acil-CoA sintetasa de cadena llarga ( <i>Long-Chain Acyl-CoA Synthetase</i> )
<b>LDL</b>	Lipoproteïna de baixa densitat
<b>LDLR</b>	Receptor d'LDL
<b>LDS</b>	Sèrum deslipoproteïnitzat
<b>LPL</b>	Lipoproteïna lipasa
<b>Lys</b>	Lisina
<b>Luc</b>	Gen de la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>
<b>LXR</b>	<i>Liver X Receptor</i>
<b>LXRE</b>	Element de resposta a LXR
<b>m</b>	mili ( $10^{-3}$ )
<b>mA</b>	miliampers
<b>MAPK</b>	Proteïna quinasa activada per mitogen ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )

<b>MCAD</b>	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena mitjana ( <i>Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase</i> )
<b>mg</b>	miligram
<b>MEM</b>	<i>Minimum Essential Medium</i>
<b>min</b>	minut
<b>mL</b>	mililitre
<b>MM</b>	Mitramicina
<b>MOI</b>	Multiplicitat d'infecció
<b>MOPS</b>	Àcid 3-(N-morfolí) propanosulfònic
<b>mU</b>	miliunitat
<b>mut</b>	Mutat
<b>μ</b>	micro ( $10^{-6}$ )
<b>μg</b>	microgram
<b>μL</b>	microlitre
<b>μM</b>	micromolar
<b>n</b>	nano ( $10^{-9}$ )
<b>NAD+</b>	Nicotinamide adenina dinucleòtid
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid reduït
<b>NAM</b>	Nicotinamida
<b>NB</b>	<i>Northern blot</i>
<b>NcoR</b>	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
<b>NEFA</b>	Àcid gras no esterificat
<b>ng</b>	nanogram
<b>nm</b>	nanòmetre
<b>NR</b>	Receptor nuclear
<b>NRRE</b>	Element de resposta a receptors nuclears
<b>NS</b>	No específic
<b>NSQ</b>	Nucli supraquiasmàtic
<b>NT</b>	No transfectat
<b>nSREBP</b>	<i>Sterol-regulatory element-binding protein</i> forma nuclear
<b>O.D<sub>λ</sub></b>	Densitat òptica a la longitud d'ona subindexada ( $\lambda$ )
<b>o/n</b>	Durant la nit ( <i>over night</i> )
<b>ORF</b>	Marc obert de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> )
<b>OLR</b>	Receptor d'LDL oxidades ( <i>oxidized LDL receptor 1</i> )
<b>PACAP</b>	Polipèptid activador de l'adenilil ciclase pituïtària ( <i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide hormone</i> )
<b>PAIL</b>	<i>Prediction of Acetylation on Internal Lysines</i>
<b>pb</b>	Parells de bases
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí
<b>PBS-T</b>	Tampó fosfat salí suplementat amb <i>Tween</i>

<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>PKD4</b>	Quinasa de la piruvat deshidrogenasa
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvat carboxilasa
<b>PER</b>	<i>Period</i>
<b>PGC-1</b>	<i>PPARγ coactivator factor-1</i>
<b>PLTP</b>	Proteïna transferidora de fosfolípids
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonil fluorur
<b>PPAR</b>	Receptor activat per proliferadors de peroxisomes ( <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> )
<b>PPRE</b>	Element de resposta a PPAR
<b>PVDF</b>	Difluorit polivinilidina
<b>q.s.p.</b>	Quantitat suficient per
<b>R</b>	Arginina
<b>RAR</b>	Receptor de l'àcid retinoic ( <i>Retinoic Acid Receptor</i> )
<b>ref.</b>	Referència
<b>RIP140</b>	<i>Receptor interacting protein-140</i>
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>RNAse</b>	Ribonucleasa
<b>ROR</b>	<i>Retinoic acid-related orphan receptor</i>
<b>RORE</b>	Element de resposta a ROR
<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>RSG</b>	Rosiglitazona
<b>RT</b>	Temperatura ambient ( <i>room temperature</i> )
<b>rTetR</b>	Proteïna repressora <i>Tet</i> reversa
<b>RXR</b>	<i>Retinoid X Receptor</i>
<b>SCAP</b>	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
<b>SCD-1</b>	Stearoil-CoA dessaturasa
<b>SCOT</b>	Succinil-CoA:3-oxoàcid CoA transferasa
<b>Ser</b>	Serina
<b>SHARP1</b>	<i>SMRT/HDAC1-Associated repressor protein</i>
<b>SINE</b>	Elements dispersos curts
<b>SMRT</b>	<i>Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors</i>
<b>Sp</b>	<i>Specificity protein</i>
<b>SRC-1</b>	Coactivador dels receptors d'esterols-1
<b>SRE</b>	Element de resposta a SREBP
<b>SREBP</b>	<i>Sterol-regulatory element-binding protein</i>
<b>SSC</b>	salí-citrat sòdic
<b>SV40</b>	Virus 40 de simi ( <i>Simian Virus 40</i> )
<b>S1P</b>	<i>Site-1 protease</i>
<b>S2P</b>	<i>Site-2 protease</i>

<b>TAB</b>	Teixit adipós blanc
<b>TAM</b>	Teixit adipós marró
<b>TAE</b>	Tris-acetat-EDTA
<b>TAF</b>	Factors associats a TBP ( <i>TBP-associated factors</i> )
<b>TBP</b>	Proteïna d'unió a TATA ( <i>TATA binding protein</i> )
<b>TBS</b>	Tampó salí
<b>TBS-T</b>	Tampó salí suplementat amb <i>tween</i>
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<b>TetR</b>	Proteïna repressora <i>Tet</i>
<b>tetO</b>	Operador <i>Tet</i>
<b>Tm</b>	<i>Melting temperature</i>
<b>TNF</b>	Factor de necrosi tumoral ( <i>Tumor necrosis factor</i> )
<b>TnT</b>	Transcripció i traducció <i>in vitro</i>
<b>TR</b>	Receptor de l'hormona tiroïdal
<b>TRE</b>	Element de resposta a tetraciclina
<b>TRAP220</b>	<i>Thyroid hormone receptor associated protein-220</i>
<b>TRH</b>	Tracte retinohipotalèmic
<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil-aminometà
<b>TSA</b>	Tricostatina A
<b>TZD</b>	Tiazolidinediona
<b>UCP</b>	Proteïna desacobladora ( <i>Uncoupling protein</i> )
<b>U.D.O.</b>	Unitats de densitat òptica
<b>U.I.</b>	Unitats internacionals
<b>USF</b>	<i>Upstream stimulatory factor</i>
<b>UTR</b>	Regió transcrita i no traduïda
<b>UV</b>	Raig ultraviolat
<b>VLCAD</b>	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena molt llarga ( <i>Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase</i> )
<b>VLCAS</b>	Acil-CoA sintetasa de cadena molt llarga ( <i>Very Long-Chain Acyl-CoA Synthetase</i> )
<b>vs.</b>	<i>versus</i>
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>Wt</b>	Salvatge ( <i>Wild type</i> )
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
<b><i>Z. ramigera</i></b>	<i>Zoogloea ramigera</i>
<b>9-cisRA</b>	9-cis retinol
<b>25-OH cho</b>	25-hidroxicolesterol
<b>36B4</b>	Fosfoproteïna àcida ribosomal PO

## 2. OLIGONUCLEÒTIDS.

A continuació es detallen els oligonucleòtids emprats durant el present treball. Els llistats corresponen a les seqüències, genòmiques o de cDNA, amb les que hibriden. En minúscules s'indiquen els nucleòtids que no corresponen a la seqüència original, en negreta s'indiquen els que generen dianes de restricció i subratllats, els que introdueixen mutacions. Quan es mostra la posició, aquesta fa referència al inici de transcripció. F i R indiquen *forward* i *reverse*, respectivament.

### 2.1. Oligonucleòtids que hibriden amb vectors.

<b>T3</b>	ATTACCCCTCACTAAAGGGA	oligonucleòtid R del promotor T3
<b>T7</b>	TAATACGACTCACTATAGGG	oligonucleòtid F del promotor T7
<b>SP6</b>	GATTTAGGTGACACTATAG	oligonucleòtid R del promotor Sp6
<b>CMV</b>	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	oligonucleòtid F del promotor CMV
<b>pGEX</b>	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	oligonucleòtid F dels vectors pGEX
<b>pTRE</b>	CGCCTGGAGACGCCATCC	oligonucleòtid F del vector pTRE2Hyg
<b>GL2</b>	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA	oligonucleòtid R dels vectors pGL3
<b>RV3</b>	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	oligonucleòtid F dels vectors pGL3

### 2.2. Homòlegs a la seqüència genòmica del gen AACS humà.

Nom	Posició	F/R	Seqüència (5'- 3')	Diana
<b>DH 782</b>	+62/+79	R	ccc <b>aagctt</b> ACCTGGGACCGGAGGAAG	HindIII
<b>DH 781b</b>	-1425/-1407	F	gga <b>agatct</b> GAGATCAGGGAGGCTCTGG	BglII
<b>DH 832</b>	-810/-797	F	actc <b>gagctc</b> GGGCGACTGAGTGA	SacI
<b>DH 916</b>	-97/-77	F	ctta <b>gagctc</b> CGGGAGGGCGGGCCTGGAAG	SacI
<b>DH 896</b>	-79/-61	F	ctta <b>gagctc</b> AAGGGGGCGGGATTCGAG	SacI
<b>DH 917</b>	-66/-48	F	ctta <b>gagctc</b> TTCGAGGCGGGCCTGCGG	SacI
<b>DH 918</b>	-54/-36	F	ctta <b>gagctc</b> CCTGCGGGCGGGCCTGG	SacI
<b>DH 901</b>	-34/-20	F	actc <b>gagctc</b> CCAAGCGGCCCGCAG	SacI
<b>DH 960</b>	-20/+23	F	GGAGGCGGCGGCGGCCGT <u>actcgag</u> CCTGTTCCTCCGCC GCCGC	
<b>DH 961</b>	-20/+23	R	GCGGCGGCGGGGAACAAG <u>ctcgagt</u> ACGGCCCGCCCG CCTCC	
<b>DH 971</b>	-24/+2	F	<b>gagctc</b> <u>caataattaa</u> CGCAGGAGGCGGCGGCGGCCGTT CAG	SacI

## 2.3. Homòlegs a la seqüència del cDNA de l'AACS humà.

Nom	Posició	F/R	Seqüència (5'- 3')	Diana
DH 475	+145/165	F	cgcaagcttGCCGCCATGTCCAAGGAGGAG	HindIII
DH 476	+2156/2177	R	cagtctagAGTCTGACTCAGAAGCCCTGCA	XbaI
DH 486	+682/702	R	GGACGTGGAGCTCCAGATGGC	
KR	+2030/2065	F	CGTATACGCTCAACGGCagaAAAGTGGAAAGTTGCCG	
KR	+2030/2065	R	CGGCAACTTGCACTTTtcTGCCGTTGAGCGTATACG	
KKRR	+2036/2065	F	CGCTCAACGGCagaAgAGTGGAAAGTTGCCG	
KKRR	+2036/2065	R	CGGCAACTTCCACTcTtcTGCCGTTGAGCG	
AACS-D	+1953/1967	F	GCATTCCGCTGGGGG	
AACS-D	+2028/2046	R	ctcgagtcaGCCGTTGAGCGTATACGGG	XhoI

2.4. Oligonucleòtids emprats en experiments de *ChIP*.

Nom	Gen	Espècie	Posició	F/R	Seqüència (5'- 3')
DH 916 <i>ChIP</i>	AACS	ratolí	-264/-243	F	GAATGAACGAACGAACGAGGG
DH917 <i>ChIP</i>	AACS	ratolí	-4/+15	R	CCACAGCGCGAGACTGAAC
DH 969 <i>ChIP</i>	AACS	ratolí	exó 17	F	GAAGCCTTCGATGAGGTGG
DH 970 <i>ChIP</i>	AACS	ratolí	exó 17	R	GGAATGCCTCGGGTCTCC
OLR-A-F	OLR1	ratolí	-382/-361	F	TGAACAAACAAGTCGAACCATC
OLR-A-R	OLR1	ratolí	-213/-192	R	TGTGGGTGGGGAGAATTATATC

2.5. Oligonucleòtids emprats en experiments de *pull-down*.

Els oligonucleòtids emprats en aquest tipus d'experiments presenten una molècula de biotina en els seu extrem 5'.

**Sp1 Wt:** conté la regió compresa entre -97 i -34 del promotor del gen AACS. En negreta es mostra la seqüència corresponent als llocs Sp1. B indica biotina.

5'-B-CGGG**AGGGCGGGC**CTGGAAGGGGGCGGGG**ATTTCGAGGCGGGC**CTGCGGGGGCGGGCCTGGGC-3'  
 3'-GCCCTCCCGCCCCG**GACCTTCCCCCGCCCTAAGCTCCGCCCCG**GACGCCCGCCCCG**GACCCG**-B-5'

**Sp1 Mut:** com la sonda anterior, conté la regió compresa entre -97 i -34 del promotor del gen AACS però amb els 4 llocs d'unió a Sp1 mutats, indicats en minúscula i subratllats. B indica biotina.

5'-B-CGGGagtctagagcCTGGAAGggtctagagaTTCgatctagagcCTGCggtctagagcCTGGGC-3'  
 3'-GCCCTcagatctcgGACCTTCccagatctctAAGctagatctcgGACGccagatctcgGACCCG-B-5'

## 2.6. Altres oligonucleòtids.

Nom	Gen	Posició	F/R	Seqüència (5' - 3')	Diana
DH 999	36B4 rata	+74/+90	F	cacc <b>gaattc</b> ATGCCCAGGGAAGACAG	EcoRI
DH 1000	36B4 rata	+1005/1024	R	tgtg <b>gaattc</b> TTAGTCGAAGAGACCGAA TC	EcoRI
DH 931	AACS rata	+109/+128	F	ATGTCCAAGCTGGCACGGCT	
DH 932	AACS rata	+2109/2128	R	TTCAGAAGTCCTGCAGCTCA	
DH 839	HMGCS1 hàmsster	-15/+3 vs. traducció	F	tcgag <b>tcgac</b> CACAGCTCTTTCAGCATG	Sall
DH 847	HMGCS1 hàmsster	1561/1577 vs. traducció	R	agct <b>gcgccgc</b> ACCCACAAAGCTCTT A	NotI
DH 1025	HMGCS1 humà	+208/+228	F	gctag <b>aattc</b> aATGCCTGGATCACTTCC TTTG	EcoRI
DH 1026	HMGCS1 humà	+1745/1770	R	cgcc <b>ggtacc</b> TTAATGTTCCCCATTACT AATGACAG	KpnI

## 3. CONSTRUCCIONS.

### 3.1. Plasmidis reporters luc amb el gen AACS humà.

**p-1425:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-1425/+79). Obtinguda per amplificació de DNA genòmic de cèl·lules HepG2 amb els oligonucleòtids DH 781b i DH 782 (HindIII), clonada en pGEMT, digerida amb SacI i HindIII, i subclonada en pGL3basic.

**p-1034:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-1034/+79). Obtinguda mitjançant digestió de la construcció p-1425 amb l'enzim BglII i posterior relligació del vector.

**p-809:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-809/+79). Obtinguda a partir de la construcció p-1425, per amplificació amb els oligonucleòtids DH 832 (SacI) i DH 782 (HindIII) i subclonada en pGL3basic en les dianes de restricció SacI i HindIII.

**p-291:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-291/+79). Obtinguda mitjançant digestió de la construcció p-1034 amb l'enzim BglII, *fill in*, segona digestió amb l'enzim Eco72I i relligació.

**p-97:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-97/+79). Obtinguda a partir de la construcció p-1425, per ampliació amb els oligonucleòtids DH 916 (Sacl) i DH 782 (HindIII) i subclonada en pGL3basic en les dianes de restricció Sacl i HindIII.

**p-79:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-79/+79). Obtinguda a partir de la construcció p-1425, per ampliació amb els oligonucleòtids DH 896 (Sacl) i DH 782 (HindIII) i subclonada en pGL3basic en les dianes de restricció Sacl i HindIII.

**p-66:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-66/+79). Obtinguda a partir de la construcció p-1425, per ampliació amb els oligonucleòtids DH 917 (Sacl) i DH 782 (HindIII) i subclonada en pGL3basic en les dianes de restricció Sacl i HindIII.

**p-54:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-54/+79). Obtinguda a partir de la construcció p-1425, per ampliació amb els oligonucleòtids DH 918 (Sacl) i DH 782 (HindIII) i subclonada en pGL3basic en les dianes de restricció Sacl i HindIII.

**p-33:** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-33/+79). Obtinguda a partir de la construcció p-1425, per ampliació amb els oligonucleòtids DH 901 (Sacl) i DH 782 (HindIII) i subclonada en pGL3basic en les dianes de restricció Sacl i HindIII.

**p-97(M-*Inr*):** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-97/+79) amb el putatiu *Inr* mutat, obtinguda mitjançant la tècnica *overlapping extension*. Per això, es dugueren a terme dos PCR, a partir de la construcció p-97, amb les parelles d'oligonucleòtids DH 916/ DH 961 i DH 960/ DH 782. Els oligonucleòtids DH 960 i DH 961 són solapants i contenen el putatiu *Inr* mutat, de manera que els productes de PCR foren ajuntats i sotmesos a una altra ampliació amb els oligonucleòtids DH 916 i DH 782 amb dianes Sacl i Hind III, respectivament, emprades per al subclonatge en el vector pGL3basic.

**p-33(TATA):** construcció que conté el promotor del gen AACS humà (-24/+79) amb una caixa TATA (AATAATTAA; Shatnawi *et al.*, 2007) en la posició -33/-25. Obtinguda a partir de la construcció p-33, per ampliació amb els oligonucleòtids DH 971 (Sacl i caixa TATA) i DH 782 (HindIII) i subclonada en pGL3basic en les dianes de restricció Sacl i HindIII.



### 3.2. Altres plasmidis reporters luc.

**pSREBP1c:** promotor del gen SREBP1c de ratolí (de -2600 a +1, respecte del inici de traducció) en el vector pGL2 (Hasty *et al.*, 2000). Cedit pel Dr. Shimano.

**pHMGCS1:** seqüència nucleotídica de -528 a +31 del gen de la HMG-CoA sintasa citosòlica de hámster clonada en el vector pGL3basic.

**pApoCIII:** promotor del gen ApoCIII humà (-1408/+24) clonat en el vector pGL3 basic (Coste *et al.*, 2002). Cedit pel Dr. J.C. Rodríguez (Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona).

### 3.3. Construccions amb el cDNA del gen AACS humà.

**pcDNA3AACS:** conté el cDNA del gen AACS humà (NM 023928) amplificat a partir de cèl·lules Caco-2 amb els oligonucleòtids DH 475 i DH 476, que inclouen les dianes HindIII i XbaI, respectivament, emprades per al clonatge en el vector pcDNA3.

**pGEX4T3AACS:** conté el cDNA del gen AACS humà clonat en fase amb la glutatió-S-transferasa. Aquest constructe es va obtenir mitjançant la digestió de pcDNA3AACS amb els enzims HindIII i XbaI i posterior *fill in* per a l'obtenció del cDNA amb extrems roms. El vector pGEX4T3 fou digerit amb l'enzim de restricció SmaI i, finalment, vector i insert foren lligats.

**pTRE2HygAACS:** conté el cDNA del gen AACS humà. Aquest constructe es va obtenir mitjançant la digestió de pcDNA3AACS amb els enzims HindIII i XbaI i posterior *fill in* per a l'obtenció del cDNA amb extrems roms. El vector pTRE2Hyg fou digerit amb l'enzim de restricció EcoRV i, finalment, vector i insert foren lligats.

**pcDNA3mycAACS:** conté el cDNA del gen AACS humà clonat en fase amb l'etiqueta *myc*. Aquest constructe fou obtingut pel subclonatge del cDNA del gen AACS, producte de la digestió de pGEX4T3AACS amb els enzims de restricció EcoRI i NotI, en les dianes EcoRI i NotI del vector d'expressió pcDNA3myc.

**pcDNA3mycAACSKR:** construcció idèntica a l'anterior però amb la Lys 633 mutada a Arg mitjançant la tècnica de mutagènesi dirigida emprant els oligonucleòtids KR *forward* i KR *reverse*.

**pcDNA3mycAACSKKRR:** construcció idèntica a pcDNA3mycAACS amb les Lys 633 i Lys 634 mutades a Arg mitjançant la tècnica de mutagènesi dirigida emprant els oligonucleòtids KKRR *forward* i KKRR *reverse*.

**pcDNA3mycAACSD633-672:** conté el cDNA del gen AACS humà delecionat de l'aminoàcid 633 al 672. Per això, emprant com a motlle la construcció pcDNA3AACS i amb els oligonucleòtids AACS-D *forward* i *reverse*, es dugué a terme un PCR llur amplicó fou clonat en el vector pGEMT. Aquest constructe es digerí amb els enzims BsmI i XhoI i es subclonà el cDNA en el vector pGEX4T3AACS, digerit prèviament amb BsmI i XhoI. Finalment, s'alliberà el cDNA del gen AACS amb les dianes EcoRI i XhoI que fou subclonat en el vector pcDNA3myc digerit també, de manera prèvia, amb els mateixos enzims.

#### 3.4. Altres plasmidis d'expressió.

**pRC-CMVSp1:** plasmidi que conté el cDNA del factor de transcripció Sp1 de rata i que permet l'obtenció de la proteïna Sp1 transcrita i traduïda *in vitro* a través del promotor T7, cedit pel Dr. Suske (Marburg).

**pJCXR8:** plasmidi d'expressió que conté el cDNA del gen RXR $\alpha$  humà en el vector pCDM8, cedit pel Dr. R.M. Evans (Salk Institute, San Diego, USA).

**LXR $\alpha$ :** plasmidi d'expressió que conté el cDNA del gen LXR $\alpha$  humà en el vector pSG5, cedit pel Dr. J. Lehmann (Glaxo Wellcome Research, North Carolina, USA).

**nSREBP1a:** plasmidi d'expressió que conté el cDNA que codifica per a la forma nuclear de la proteïna SREBP1a humana en el vector pCMV5, cedit pel Dr. J.C. Rodríguez (Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona).

**nSREBP1c:** plasmidi d'expressió que conté el cDNA que codifica per a la forma nuclear de la proteïna SREBP1c humana en el vector pcDNA 3.3., cedit pel Dr. Shimano (Universitat de Tsukuba, Tsukuba, Japó).

**nSREBP2:** plasmidi d'expressió que conté el cDNA que codifica per a la forma nuclear de la proteïna SREBP2 humana en el vector pCMV5, cedit pel Dr. J.C. Rodríguez (Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona).

**PPAR $\gamma$ :** plasmidi d'expressió que conté el cDNA del gen PPAR $\gamma$ 2 de ratolí en el vector pSVSport, cedit pel Dr. B.M. Spiegelman (Harvard Medical School, Boston, USA).

**hROR $\alpha$ :** plasmidi d'expressió que conté el cDNA del gen ROR $\alpha$  humà en el vector pSG5, cedit pel Dr. J.C. Rodríguez (Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona).

**hReverb $\alpha$** : plasmidi d'expressió que conté el cDNA del gen Reverb $\alpha$  humà en el vector pSG5, cedit pel Dr. J.C. Rodríguez (Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona).

**pGEX4T3HMGCS1**: conté el cDNA del gen HMGCS1 de hámster clonat en fase amb la glutatió-S-transferasa. Aquest constructe es va obtenir mitjançant PCR a partir del plasmidi p53K-312 (Gil *et al.*, 1986) amb els oligonucleòtids DH 839 i DH 847, que contenen les dianes de restricció Sall i NotI, respectivament, emprades per al clonatge en el vector pGEX4T3.

**pCMV5flagHMGCS1**: conté el cDNA del gen HMGCS1 humà clonat en fase amb l'etiqueta *flag*. Aquest constructe es va obtenir mitjançant PCR a partir de cDNA de cèl·lules HepG2 amb els oligonucleòtids DH 1025 i DH 1026, que contenen les dianes de restricció EcoRI i KpnI, respectivament, emprades per al clonatge en el vector pCMV5flag.

**HA-PPAR $\gamma$** : cedit per la Dra. C. Caelles (Institut de Recerca Biomèdica (IRB), Barcelona).

**GST-PPAR $\gamma$** : conté el cDNA del gen PPAR $\gamma$ 2 humà en el vector pGEX4T2 (Barrero *et al.*, 2003).

### 3.5. Sondes emprades en experiments de *Northern Blot*.

**AACS humà**: fragment específic de 2 Kb obtingut per digestió amb els enzims HindIII i XbaI del plasmidi pcDNA3AACS.

**AACS de rata**: fragment específic de 2 Kb obtingut per digestió amb els enzims ApaI i NotI del plasmidi pGEMTAACSrat. Aquest constructe conté el cDNA del gen AACS de rata (AB026291; Yamasaki *et al.*, 2005), amplificat, amb els oligonucleòtids DH 931 i DH 932, a partir de cDNA de fetge de rata.

**aP2 de ratolí**: fragment específic de 850 pb obtingut per digestió amb l'enzim BamHI del constructe paP2. Cedit per la Dra. Giralt. (Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona).

**$\beta$ -actines humanes**: fragment específic de 700 pb obtingut per digestió amb els enzims HindIII i EcoRI del plasmidi pUC $\beta$ -actina.

**FAS de rata**: fragment específic de 800 pb obtingut per digestió amb l'enzim HindIII del constructe pUC12FAS Cedit per la Dra. Giralt. (Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona).

**HMG-CoA Sintasa de rata:** fragment específic de 2 Kb, obtingut per digestió amb l'enzim HindIII del plasmidi pBSK-SMR.

**HMG-CoA reductasa de hámster:** fragment específic de 0.6 Kb obtingut per digestió amb l'enzim Pst I del clon de cDNA pRed-227 (Chin *et al.*, 1984).

**SREBP-1 humà:** fragment específic de 1.4 Kb obtingut per digestió amb l'enzim Sall del constructe pCMV7SREBP1c-436 (ATCC 99636).

**PGC1 $\alpha$ :** fragment específic de 2.5 Kb, obtingut per digestió amb els enzims NotI-EcoRI del plasmidi pSV2-PGC1.

**PPAR $\gamma$  de ratolí:** fragment específic de 800-900 pb obtingut per digestió amb els enzims EcoRI i BglII del constructe pSG5PPAR $\gamma$ . Cedit per la Dra. Giralt. (Dept. Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona).

**36B4:** fragment específic de 950 pb obtingut per digestió amb l'enzim EcoRI del plasmidi pGEMT36B4. Aquest constructe conté el cDNA del gen de la fosfoproteïna àcida ribosomal PO de rata (X15096; Akamine *et al.*, 2007), amplificat amb els oligonucleòtids DH 999 i DH 1000 a partir de cDNA de fetge de rata.

A cualquier otra parte

Dorian