



# Funció diferencial de les isoformes de l'adenina nucleòtid translocasa en el metabolisme energètic i la proliferació cel·lular. Regulació de l'expressió per PGC-1 $\alpha$

Aleix Gavaldà i Navarro

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
Grup de Genètica i Biologia Molecular de Proteïnes  
Mitocondrials i Patologies Associades  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Facultat de Biologia  
Programa de doctorat de Biomedicina

**Funció diferencial de les isoformes de l'adenina  
nucleòtid translocasa en el metabolisme energètic i la  
proliferació cel·lular. Regulació de l'expressió per  
PGC-1 $\alpha$**

Aleix Gavaldà i Navarro, 2012



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
Grup de Genètica i Biologia Molecular de Proteïnes  
Mitocondrials i Patologies Associades  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Facultat de Biologia  
Programa de doctorat de Biomedicina

**Funció diferencial de les isoformes de l'adenina  
nucleòtid translocasa en el metabolisme energètic i la  
proliferació cel·lular. Regulació de l'expressió per  
PGC-1 $\alpha$**

Memòria presentada per

Aleix Gavaldà i Navarro

Per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Vist-i-plau dels directors

Dra. Teresa Mampel Astals  
Professora titular de Bioquímica  
i Biologia Molecular

Dr. Octavi Viñas Folch  
Professor titular de Bioquímica  
i Biologia Molecular



Als meus pares

Tot en l' amor s' emplena de sentit.  
La força renovada d' aquest cor  
tan malmenat per la vida, d' on surt  
sinó del seu immens cabal d' amor?

Miquel Matí i Pol



## AGRAÏMENTS

Un cop hem arribat a aquest punt del camí, on ja es comença a entreveure la línia de meta (per no dir la llum al final del túnel), toca mirar-se tot el temps invertit amb una mica de perspectiva. I recordar tothom que, d'una manera o altra, ha participat en confeccionar aquesta història.

En primer lloc, reconèixer la tasca dels directors de tesi, Teresa i Octavi. Ha estat molt de temps picant pedra però, al final, sembla ser que hem obtingut resultat. Simplement, agrair-vos profundament el vostre esforç i dedicació. I també a la resta de professors del grup, Francesc, Marta i Roser, ja que sense la vostra col·laboració i, sobretot, gestió dels recursos, aquest treball no s'hagués pogut dur a terme.

Als companys, i amics, del laboratori. Què dir? Han estat uns anys per a recordar per sempre. Mil vivències difícils d'oblidar. Tots i cadascun de vosaltres, tant els que encara hi sou com els que ja han volat del niu, heu participat d'una manera o altra en això, i és de justícia remarcar-ho. És difícil no oblidar-se algú. Heu estat i sou molta gent. Per tant, em permetreu la llicència de no detallar la vida i miracles de cada un i, així, evitar la possibilitat de que sorgeixin greuges comparatius. Només dir, que entre tots us heu encarregat de què, malgrat el color del dia, un se'n vagi a casa amb un somriure als llavis. I això, sincerament, és impagable. No sé què tenim, però tothom que ha passat per aquí, per curta que hagi estat la visita, diu el mateix: sou l'hòstia! I jo, no seré qui els contradigui.

Als Volats de Nonasp, perquè l'oci i l'esbarjo també és imprescindible per a una correcta salut mental, tot i que se'n pugui ressentir la resta del cos. Diego, no hi ha dia que no et recordi.

Als meus pares, germans, cunyats i nebots, perquè sempre m'ho heu donat tot sense mai demanar res a canvi. Durant tot aquest temps hi ha hagut moments de tot. Últimament, potser més difícils del que ens mereixíem, però entre tots ho hem tirat endavant. I és que la clau de l'èxit d'un grup, és que les peces estiguin ben acoblades. Us estimo. I als Esparcia-Castillo, per la comoditat que un hi troba entre vosaltres.

I a la Carolina, perquè "No matter how they toss the dice, it has to be, the only one for me is you, and you for me". Gràcies per haver-hi estat i, sobretot, per ser-hi. Com veus, tot arriba. I tot arribarà.





## PRESENTACIÓ

La present tesi doctoral, que porta per títol **Funció diferencial de les isoformes de l'adenina nucleòtid translocasa en el metabolisme energètic i la proliferació cel·lular. Regulació de l'expressió per PGC-1 $\alpha$** , ha estat realitzada en el grup d'investigació Genètica i Biologia Molecular de Proteïnes Mitocondrials i Patologies Associades del departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, sota la direcció de la Dra. Teresa Mampel i el Dr. Octavi Viñas.

La memòria ha estat organitzada en els següents apartats: **Introducció**, on es realitza una breu compilació dels diferents conceptes que s'han cregut necessaris per a contextualitzar el treball realitzat; **Metodologia**, que recull els protocols i materials de les tècniques utilitzades per a elaborar la part experimental del treball; **Objectius**, on es plantegen els fins a aconseguir amb la present tesi; **Resultats**, on es presenten els estudis realitzats per a assolir els objectius plantejats, estructurats en quatre blocs diferents, segons l'àmbit d'estudi; **Discussió**, on es realitza una anàlisi integradora dels diferents blocs de resultats obtinguts; **Conclusions**, on es resumeixen els principals resultats que assoleixen els diferents objectius; i **Bibliografia**, on es detallen totes les publicacions citades en el treball.



CONTINGUT



<b>AGRAÏMENTS</b>	<b>7</b>
<b>PRESENTACIÓ</b>	<b>9</b>
<b>CONTINGUT</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURES I SIGLES</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>21</b>
<b>I. EL MITOCONDRI</b>	<b>23</b>
1.1 Estructura i fisiologia mitocondrial	24
La cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa	26
1.2 Biogènesi mitocondrial i regulació gènica de proteïnes mitocondrials	28
1.2.1 El genoma mitocondrial	28
La replicació mitocondrial	30
La transcripció mitocondrial	31
La traducció mitocondrial	31
1.2.2 Regulació de l'expressió de gens nuclears codificadors de proteïnes mitocondrials	32
Factors de transcripció	33
Coactivadors de la transcripció	37
1.3 Apoptosi, mPTP i ROS	39
1.4 Metabolisme energètic i càncer	43
<b>II. ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA</b>	<b>49</b>
1.1 Característiques generals de l'adenina nucleòtid translocasa	49
La família de transportadors mitocondrials SLC25	49
Propietats funcionals i estructurals de l'adenina nucleòtid translocasa	50
Inhibidors naturals de l'ANT	53
ANT i l'mPTP	54
Modificacions i interaccions de la proteïna ANT que modulen la seva activitat	55
1.2 Isoformes ANT	56
1.2.1 ANT en llevats	56
1.2.2 ANT en humans	58
hANT1	59
hANT2	60
hANT3	63
hANT4	64
1.2.3 ANT en ratolins	65
mANT1	65
mANT2	67
mANT4	68
<b>OBJECTIUS</b>	<b>71</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>77</b>
<b>I. CULTIUS CEL·LULARS</b>	<b>79</b>
1.1 Línies cel·lulars utilitzades	79
1.2 Manteniment i manipulació dels cultius cel·lulars	81
1.2.1 Descongelació	81
1.2.2 Subcultiu	82

## Índex

I.2.3 Congelació	83
I.2.4 Sembra de cèl·lules	84
<b>II. TRANSDUCCIÓ ADENOVÍRICA</b>	<b>84</b>
II.1 Procediments de transducció	85
II.2 Adenovirus utilitzats	87
<b>III. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA</b>	<b>87</b>
III.1 Procediment de transfecció	87
III.2 Silenciament gènic mitjançant shRNA	89
III.2.1 Construcció dels vectors shRNA	90
III.2.2 shRNA utilitzats	91
III.3 Expressió exògena de gens mitjançant la transfecció transitòria de plasmidis	92
<b>IV. TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS, MINIPREP I MAXIPREP</b>	<b>94</b>
IV.1 Transformació de bacteris competents	94
IV.2 Miniprep i comprovació de la colònia	95
IV.3 Maxiprep	96
<b>V. PURIFICACIÓ D'RNA, RETROTRANSCRIPCIÓ I PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL</b>	<b>97</b>
V.1 Purificació d'RNA	97
V.1.1 Purificació mitjançant fenol-cloroform	97
V.1.2 Purificació mitjançant columnes d'afinitat	98
V.2 Retrotranscripció	98
V.3 PCR quantitativa a temps real	99
<b>VI. PURIFICACIÓ DE DNA I QUANTIFICACIÓ DEL DNA MITOCONDRIAL</b>	<b>102</b>
VI.1 Purificació de DNA	102
VI.2 Quantificació del DNA mitocondrial	103
<b>VII. WESTERN BLOT</b>	<b>103</b>
VII.1 Obtenció d'extractes proteics a partir de cultius cel·lulars	104
VII.2 Valoració de la concentració proteica mitjançant Bradford	106
VII.3 Electroforesi PAGE, transferència i immunodetecció	107
VII.4 Anticossos utilitzats amb més freqüència	109
<b>VIII. VALORACIÓ DE L'ESTAT METABÒLIC CEL·LULAR</b>	<b>109</b>
VIII.1 Quantificació de la glucosa en el medi de cultiu	110
VIII.2 Quantificació del lactat en el medi de cultiu	110
VIII.3 Quantificació del glicerol en el medi de cultiu	111
VIII.4 Quantificació de l'ATP intracel·lular	112
VIII.5 Quantificació del consum d'oxigen	113
VIII.6 Quantificació de l'oxidació de substrats	115
VIII.6.1 Quantificació de l'oxidació de glucosa	115
VIII.6.2 Quantificació de l'oxidació d'àcid palmític	117
VIII.7 Quantificació de proteïna total (correcció mesures i proliferació cel·lular)	118
<b>IX. CITOMETRIA DE FLUX</b>	<b>119</b>
IX.1 Mesura de ROS	120
IX.2 Mesura del Potencial de Membrana	121
IX.3 Mesura de l'apoptosi	122
IX.4 Mesura del cicle cel·lular	124
<b>X. MESURA DE ROS PER FLUORIMETRIA</b>	<b>125</b>
<b>XI. MEDIS CONDICIONATS</b>	<b>127</b>

XII. QUANTIFICACIÓ DE CITOQUINES EN MEDIS	129
XIII. MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA	129
XIV. ANÀLISI ESTADÍSTIC	130
<b>RESULTATS</b>	<b>133</b>
<b>I. ESTUDI DELS CANVIS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES ISOFORMES DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA DEPENDENTS DEL METABOLISME I DE L'ESTAT DE PROLIFERACIÓ EN LÍNIES CEL·LULARS HUMANES I DE RATOLÍ.</b>	<b>135</b>
I.1 HeLa	135
I.2 HepG <sub>2</sub>	145
I.3 SGBS	148
I.4 HIB-1B	150
Per tant, una disminució de la proliferació va acompanyada d'una important disminució de la relació mANT2/mANT1, sobretot pel descens de l'expressió d'mANT2.	152
I.5 3T3-L1	152
I.6 C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	156
<b>II. EFECTES DEL SILENCIAMENT GÈNIC MITJANÇANT shRNA DE LES ISOFORMES DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA HUMANES I DE RATOLÍ.</b>	<b>161</b>
II.1 Silenciament gènic de les isoformes humanes 2 i 3 de l'adenina nucleòtid translocasa.	161
II.2 Silenciament gènic de les isoformes de ratolí 1 i 2 de l'adenina nucleòtid translocasa.	173
II.3 Resposta inflamatòria per efecte del silenciament gènic de l'ANT3 humana i de l'ANT2 de ratolí.	184
<b>III. EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE LA ISOFORMA 2 HUMANA DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA EN LÍNIES CEL·LULARS HUMANES I DE RATOLÍ.</b>	<b>201</b>
III.1 Sobreexpressió de l'ANT2 humana en cèl·lules HeLa.	201
III.2 Sobreexpressió de l'ANT2 humana en cèl·lules HepG <sub>2</sub> .	213
III.3 Sobreexpressió de l'ANT2 humana en miotubs C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> .	216
III.4 Sobreexpressió de l'ANT2 humana en adipòcits 3T3-L1.	222
<b>IV. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LES ISOFORMES ANT1, ANT2 I ANT3 HUMANES I ANT1 I ANT2 DE RATOLÍ PER PGC-1<math>\alpha</math></b>	<b>225</b>
IV.1 Inducció de l'expressió de l'adenina nucleòtid translocasa per PGC-1 $\alpha$	225
IV.2 Factors de transcripció involucrats en la inducció gènica d'ANT per PGC-1 $\alpha$	228
IV.2.1 HeLa	228
IV.2.2 C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	237
IV.2.3 3T3-L1	245
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>253</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>289</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>295</b>





## ABREVIATURES I SIGLES

<b>AAC</b>	Transportador ADP/ATP ( <i>ADP/ATP carrier</i> )	<b>Kd</b>	Constant de dissociació
<b>Ad</b>	Adenovirus	<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>adipoQ</b>	Adiponectina	<b>LDH</b>	Lactat deshidrogenasa
<b>ADP</b>	Adenosina difosfat	<b>LND</b>	Lonidamina
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfat	<b>LPS</b>	Lipopolisacàrid
<b>AMPK</b>	Kinasa activada per AMP	<b>MAC</b>	Canal induït per apoptosi mitocondrial
<b>ANT</b>	Adenina nucleòtid translocasa	<b>MCAD</b>	Deshidrogenasa d'àcils de cadena mitja
<b>aP2</b>	<i>Adipocyte protein 2</i>	<b>MCF</b>	Família de transportadors mitocondrials
<b>AP-2</b>	<i>Activating protein 2</i>	<b>MCP-1</b>	Proteïna quimiotàctica de monòcits 1
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfat	<b>MEF-2</b>	Factor estimulador de miòcits 2
<b>ATP(x)</b>	Subunitat x de l'ATP-sintasa	<b>MME</b>	Membrana mitocondrial externa
<b>ATR</b>	Atractilat	<b>MMI</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>BA</b>	Àcid bongkrekiac	<b>MOI</b>	Multiplicitat d'infecció
<b>bp</b>	parell de bases	<b>mPTP</b>	Porus de transició de la permeabilitat mitocondrial
<b>BSA</b>	Albúmina de sèrum boví	<b>mRNA</b>	RNA missatger
<b>CATR</b>	Carboxiatractilat	<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>CCCP</b>	<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone</i>	<b>mTERF</b>	Factor terminador de la transcripció mitocondrial
<b>cDNA</b>	DNA còpia	<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>CK</b>	Creatina kinasa	<b>MYOG</b>	Miogenina
<b>CL</b>	Cardiolipina	<b>NAC</b>	N-acetilcisteïna
<b>CoA</b>	Coenzim A	<b>NAD(H)</b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid (Forma oxidada/reduïda)
<b>COX</b>	Citocrom oxidasa	<b>NADP(H)</b>	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (Forma oxidada/reduïda)
<b>CpG</b>	Illa de citosines-guanines	<b>ndufb5</b>	Subcomplex 5 de la NADH deshidrogenasa ubiquinona 1 beta
<b>CREB</b>	Element d'unió en resposta a AMP cíclic	<b>NF-1</b>	Factor nuclear 1
<b>CsA</b>	Ciclosporina A	<b>NF-κB</b>	Factor nuclear estimulador de la cadena lleugera kappa de cèl·lules B
<b>CTRL</b>	Control	<b>NRF</b>	Factor respiratori nuclear (diferents isoformes)
<b>CypD</b>	Ciclofilina D	<b>OXPBOS</b>	Fosforilació oxidativa
<b>Cytb</b>	Citocrom b	<b>P/S</b>	Penicil·lina/Estreptomicina
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	<b>PBR</b>	Receptor de benzodiazepines
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid	<b>PBS</b>	Salí fosfat tamponat
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic	<b>PCNA</b>	Antigen nuclear de cèl·lules proliferants
<b>ΔΨ<sub>m</sub></b>	Potencial de membrana mitocondrial	<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>ERR</b>	Receptor relacionat amb l'estrogen	<b>PDH</b>	Piruvat deshidrogenasa
<b>ETO</b>	Ètopòsid	<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvat
<b>FAD(H<sub>2</sub>)</b>	Flavina adenina dinucleòtid (forma oxidada/reduïda)	<b>PGC-1</b>	Coactivador PPAR gamma 1 (diferents isoformes)
<b>FBS</b>	Sèrum fetal boví	<b>PI3K</b>	Kinasa del fosfatidilinositol 3
<b>FCCP</b>	<i>Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>	<b>PiC</b>	Transportador de fosfats
<b>FOXO-1</b>	<i>Forkhead box protein O1</i>	<b>PK</b>	Piruvat kinasa
<b>G-6P</b>	Glucosa-6-fosfat	<b>POLRMT</b>	Polimerasa d'RNA mitocondrial dirigida per DNA
<b>GFP</b>	Proteïna fluorescent verda	<b>PPAR</b>	Receptor activat per proliferació peroxisomal (diferents isoformes)
<b>GLN</b>	Glutamina	<b>PPi</b>	Pirofosfat
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa	<b>PRC</b>	Coactivador relacionat amb PGC-1α
<b>GPX1</b>	Glutatí peroxidasa 1	<b>PTEN</b>	Proteïna homòloga a fosfatasa i tensina
<b>GST</b>	Glutatíó-S-transferasa	<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>HIF-1α</b>	Factor induïble per hipòxia 1 alfa	<b>ROS</b>	Espècies reactives de l'oxigen
<b>HK</b>	Hexoquinasa	<b>RXR</b>	Receptor de retinoid X
<b>HS</b>	Sèrum de cavall	<b>SIRT</b>	Sirtuïna (diferents isoformes)
<b>IBMX</b>	3-isobutil-1-metilxantina	<b>SLC25</b>	Subfamília 25 dels transportadors de soluts
<b>IFN-γ</b>	Interferó gamma		
<b>IL</b>	Interleucina		
<b>IP</b>	iodur de propidi		

## Abreviatures i sigles

<b>SOD</b>	Superòxid dismutasa (diferents isoformes)	<b>TIM</b>	Translocasa de la membrana mitocondrial interna
<b>Sp1</b>	Proteïna d'especificitat 1	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosi tumoral $\alpha$
<b>SRB</b>	Sulforodamina B	<b>TOM</b>	Translocasa de la membrana mitocondrial externa
<b>STS</b>	Estaurosporina	<b>tRNA</b>	RNA de transferència
<b>TAB</b>	Teixit adipós blanc	<b>TZD</b>	Tiazildiones
<b>TAM</b>	Teixit adipós marró	<b>UCP</b>	Proteïna desacoblant
<b>TCA</b>	Àcid tricloroacètic	<b>VDAC</b>	Transportador d'anions dependent de voltatge
<b>TFAM</b>	Factor de transcripció A mitocondrial	<b>YY-1</b>	Factor de transcripció Yin yang 1
<b>TFB</b>	Factor de transcripció B		





# INTRODUCCIÓ



# INTRODUCCIÓ

## I. EL MITOCONDRI

El grau de complexitat de les cèl·lules eucariotes i la seva elevada especialització en organismes pluricel·lulars (un exemple són els més de 200 tipus cel·lulars diferents en un humà) no hagués estat possible sense l'aparició dels mitocondris. S'ha postulat que l'origen dels mitocondris s'ajusta, molt probablement, a la teoria endosimbiòtica (Margulis, 1970; Margulis, 1981), la qual estableix que els mitocondris són la coevolució d'un eubacteri ancestral, és a dir, un bacteri endosimbiont molt similar filogenèticament als de la família Rickettsiaceae, dins un proteobacteri que actuà com a hoste, procés que donà lloc a les cèl·lules eucariotes. L'avantatge evolutiu que aporta els mitocondris a les cèl·lules eucariotes és la seva capacitat, sempre en presència d'oxigen, de dur a terme la respiració cel·lular, és a dir, l'obtenció d'energia química en forma d'ATP mitjançant l'oxidació de diferents substrats, principalment la glucosa i els àcids grassos. Així, per exemple, l'oxidació d'una única molècula de glucosa aporta més de 30 molècules d'ATP, augmentant de forma substancial l'eficiència energètica de la cèl·lula, ja que per via glucolítica (fermentació anaeròbica) només obtindria 2 molècules d'ATP per cada una de glucosa.

Els mitocondris són uns orgànuls altament dinàmics que posseeixen la capacitat de canviar de mida, forma i distribució dins el citoplasma gràcies als fenòmens de fusió i fissió mitocondrial, i el que és més important, adaptar la seva activitat en resposta a les condicions fisiològiques (i patològiques) de l'organisme (Rojo et al., 1998). Les seves principals funcions estan relacionades amb el metabolisme energètic, la producció de radicals lliures, l'homeòstasi del calci, l'apoptosi i en la transducció de senyals reguladores de la proliferació cel·lular (Wallace, 2008; Wallace, 2010). Una de les característiques que fan únic al mitocondri respecte a la resta d'orgànuls subcel·lulars (tret dels cloroplasts) és la possessió d'un genoma propi: el DNA mitocondrial (mtDNA), el qual és



## Introducció

probablement la reminiscència del genoma de l'endosimbiont primitiu, com a resultat de la transferència d'aquest DNA al genoma de l'hoste. És la pèrdua d'aquest material genètic i el benefici energètic que obté l'hoste a partir de la respiració aeròbica del simbiont, el que segurament marcà que aquesta relació simbiòtica original fos seleccionada evolutivament fins a l'aparició de les cèl·lules eucariotes.

Per tant, els mitocondris són uns orgànuls molt complexos i desenvolupen un paper clau en la fisiologia cel·lular.

### I.1 Estructura i fisiologia mitocondrial

Els mitocondris són uns orgànuls subcel·lulars formats per una doble membrana, cada una de les quals està altament especialitzada i amb funcions molt diferents, que delimita una sèrie de subestructures responsables de la compartimentalització dels processos mitocondrials. Aquests diferents espais són (Figura 1A):

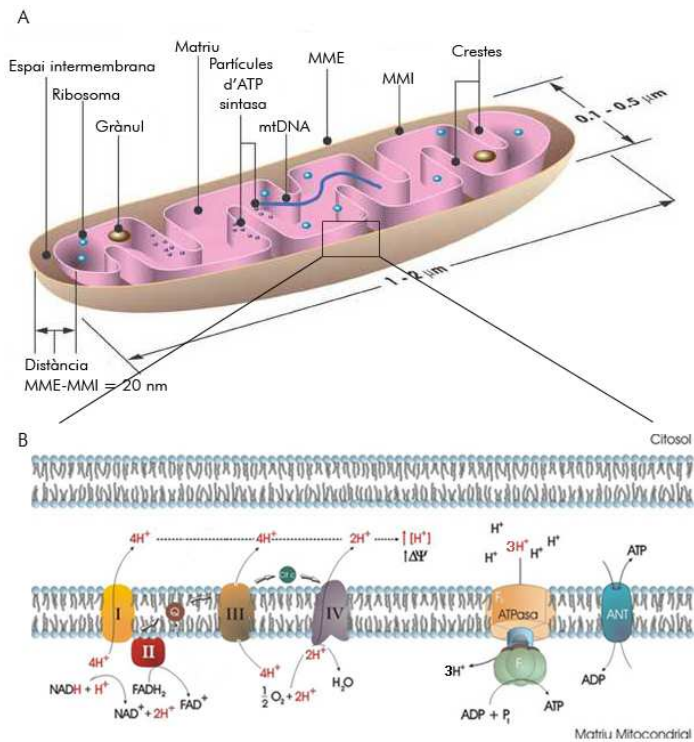
- **Matriu.** Des d'un punt de vista funcional, la matriu, juntament amb la MMI, és el compartiment més important, ja que en ella tenen lloc la majoria dels processos enzimàtics del mitocondri, com són l'oxidació del piruvat i dels àcids grassos. A més, en la matriu també s'hi troba el mtDNA i tota la maquinaria replicativa, transcripcional i traductora imprescindible per a la síntesi de totes les proteïnes codificades en el genoma mitocondrial.
- **Membrana mitocondrial interna (MMI).** Aquesta estructura es caracteritza per estar formada per una bicapa lipídica amb una alta proporció del fosfolípide cardiolipina, el qual confereix una alta impermeabilitat iònica a la membrana, i per presentar nombroses invaginacions, anomenades crestes, que permeten al mitocondri disposar d'una gran superfície

d'aquesta membrana en relació al volum mitocondrial. Aquesta membrana conté un gran número de proteïnes, les quals s'engloben bàsicament en tres grans grups, depenent de l'activitat que realitzen: (i) les proteïnes que duen a terme les reaccions d'oxidació de la cadena respiratòria, (ii) l'ATP sintasa i (iii) els diferents transportadors responsables del pas selectiu de tots els soluts que han d'entrar o sortir de la matriu (petits metabòlits, nucleòtids, coenzims, metalls), així com el complex TIM (*translocase of the inner membrane*), responsable de la importació de proteïnes citosòliques que realitzen la seva activitat en la matriu, com poden ser els factors involucrats en la replicació i la transcripció del mtDNA o els enzims responsables de la metabolització del piruvat i els àcids grassos a acetil-coA i els que oxiden aquest en el cicle de l'àcid cítric. Per tant, és evident la importància de la MMI en relació a l'obtenció d'energia, ja que no només és imprescindible per al transport d'aquests enzims, sinó que en ella també es troben els complexos proteics que realitzen el transport d'electrons derivats del poder reductor generat pel cicle i la fosforilació oxidativa.

- **Espai intermembrana.** L'espai intermembrana té una composició a nivell de soluts molt similar a la del citosol (degut a l'alta permeabilitat de la MME) i es caracteritza fonamentalment per ser l'espai on s'acumulen els protons transportats pels complexos de la cadena respiratòria (pH baix) i per ser on es localitzen els enzims responsables de fosforilar els diferents nucleòtids a partir de l'ATP generat a la matriu.
- **Membrana mitocondrial externa (MME).** Per últim, la MME és una bicapa lipídica que embolcalla tota l'estructura i es caracteritza per contenir una gran quantitat de proteïnes formadores de canals, les porines o VDAC (*Voltage-dependent anion channel*), responsables de l'alta permeabilitat de la membrana, la qual permet el pas de soluts de fins a 5000 Da. En la MME també s'hi troben els enzims responsables de la síntesi mitocondrial de lípids, els receptors d'importació de proteïnes mitocondrials i el complex

## Introducció

TOM (*translocase of the outer membrane*), així com tota la maquinaria enzimàtica per a dur a terme la divisió i fusió mitocondrial.



**Figura 1.** Esquemes d'un mitocondri (A) i del sistema OXPHOS i ANT (B). *Modificat a partir de la tesi del Dr. Jordi Armengol (2007).*

### *La cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa*

La cadena respiratòria, o cadena de transport d'electrons del mitocondri, i la fosforilació oxidativa formen el sistema enzimàtic responsable d'aprofitar l'energia oxidativa i convertir-la en energia química (energia continguda en l'enllaç fosfodièster de l'ATP), sempre i quan la cèl·lula es trobi en condicions aeròbiques. Aquest sistema està format per cinc complexos multienzimàtics localitzats en la MMI, distribuïts segons el seu potencial redox: el complex I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa), el complex II

(Succinat deshidrogenasa), el complex III (Ubiquinona-citocrom c oxidoreductasa), el complex IV (Citocrom oxidasa) i el complex V ( $F_0F_1$ -ATP sintasa) (Schultz and Chan, 2001). A més, el coenzim Q o Ubiquinona (compost derivat d'una quinona amb una cua d'isoprenils) i el citocrom C (proteïna soluble de l'espai intermembrana) també formen part de la cadena respiratòria. A aquests elements transportadors d'electrons, s'ha d'afegir l'activitat de l'adenina nucleòtid translocasa (ANT) (Klingenberg, 1992) i del transportador de  $P_i$  (Walker and Runswick, 1993), per a què el sistema disposi dels substrats necessaris per a la síntesi d'ATP i no es trobi limitat pel producte. Tots aquests complexos i transportadors formen el sistema OXPHOS (Figura 1B) (Wallace, 1989). En la matriu mitocondrial té lloc la transformació del piruvat i dels àcids grassos en acetil-CoA, el qual és oxidat fins a  $CO_2$  en el cicle de l'àcid cítric o cicle de Krebs. Com a resultat d'aquesta oxidació es produeix una important font de poder reductor en forma de NADH i  $FADH_2$  (derivat de l'oxidació del succinat), que cedeixen els seus electrons als complexos I i II, respectivament, iniciant un seguit de transferències d'electrons a acceptors més electronegatius, és a dir, a elements de la cadena amb potencial redox inferior. Així, els complexos I o II cediran els electrons al coQ; d'aquí passaran al complex III que els cedirà al citocrom C que al seu torn els transferirà al complex IV. L'energia resultant d'aquesta diferència en el potencial redox i de la combinació d'aquests electrons amb l' $O_2$  com a acceptor final (producció d' $H_2O$ ), és utilitzada pels complexos de la cadena mitocondrial pel bombeig de protons ( $H^+$ ) de la matriu a l'espai intermembrana, creant un gradient electroquímic. Els elements responsables del bombeig de protons són els complexos I, III i IV. Per tant, l'entrada d'electrons pel complex II va associada a una capacitat energètica menor, ja que es perd el bombeig de protons del complex I. Aquest gradient de  $H^+$  és utilitzat per l'ATP sintasa (complex V) com a força protomotriu per a dur a terme la fosforilació oxidativa o, el que és el mateix, la síntesi d'ATP a partir d'ADP i  $P_i$  (Mitchell, 1966). A més a més, aquest gradient també és necessari per al manteniment del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) i per al transport actiu de metabòlits. Emperò, l'eficiència en el transport d'electrons al llarg de la cadena respiratòria i la seva cessió a l' $O_2$  no és total i, fins i tot en situacions normals, existeix un cert pas d'electrons a la matriu

## Introducció

mitocondrial, no regulada pel complex IV (el que origina 2 molècules d' $\text{H}_2\text{O}$  per la transferència de 4 electrons a l' $\text{O}_2$ ), que poden dur a terme una reducció parcial de l' $\text{O}_2$  i donar lloc a espècies reactives de l'oxigen (ROS) com l'anió superòxid (transferència d'un electró a l' $\text{O}_2$ ) i el peròxid (2 electrons).

## 1.2 Biogènesi mitocondrial i regulació gènica de proteïnes mitocondrials

El contingut mitocondrial d'una cèl·lula està sotmès a una estricta regulació fisiològica, la qual pot variar, per exemple, en funció de la demanda energètica del teixit, com en el cas del múscul esquelètic en resposta a l'exercici (Booth and Thomason, 1991) o com un procés d'adaptació del teixit adipós marró al fred en rosegadors (Cannon and Nedergaard, 2004), però també per canvis microambientals, com la hipòxia (Hoppeler et al., 2003) o per efecte de les hormones tiroïdals (Weitzel et al., 2003). Per tant, és evident que existeixen factors específics tissulars que regulen el contingut mitocondrial en un organisme adult i, en conseqüència, la seva quantitat de genoma mitocondrial (Heerdt and Augenlicht, 1990; Moraes, 2001). Tots els processos associats a la biogènesi mitocondrial necessiten d'una estreta coordinació entre el genoma nuclear i mitocondrial, ja que la pràctica totalitat de les proteïnes que hi participen, ja siguin estructurals, enzims, factors de transcripció, replicació o traducció, són codificades pel genoma nuclear, mentre que una mínima part de les proteïnes mitocondrials provenen de la informació genètica del mtDNA.

### 1.2.1 El genoma mitocondrial

En humans, el genoma mitocondrial està format per una doble cadena de DNA circular de 16569 bp, el qual es transmet per herència materna (Attardi and Schatz, 1988). Els mitocondris són poliploides, és a dir, el número de còpies de mtDNA que podem trobar en una cèl·lula són molt nombroses. Aquest número és

molt variable i depèn del llinatge i de l'estat de diferenciació de la cèl·lula, ja que està condicionat pel número de còpies per mitocondri així com del número de mitocondris per cèl·lula, podent oscil·lar entre un centenar i milers. Un concepte important a tenir en compte associat a la poliploïdia, sobretot en l'estudi de mutacions i malalties genètiques d'origen mitocondrial és l'heteroplasmia, que consisteix en la barreja de 2 o més genotips mitocondrials, en un mateixa cèl·lula (Schon and Gilkerson, 2010).

Les dues cadenes es poden diferenciar en cadena pesada o H (*heavy chain*) i lleugera o L (*light chain*), en funció de la densitat diferencial que presenten després de centrifugar el mtDNA en un gradient de CsCl. Dels 13 gens mitocondrials que codifiquen per a diferents subunitats dels complexos del sistema OXPHOS, 12 es troben en la cadena H, així com 14 dels 22 RNA de transferència (tRNA) i els 2 RNA ribosòmics (rRNA) de 16S i 23S (Clay Montier et al., 2009) (Figura 2). A part de totes aquestes característiques, hi ha un factor determinant que fa el mtDNA particularment singular: l'ambient on es troba. La matriu mitocondrial és un espai reduït que ha d'albergar un gran nombre de còpies del mtDNA, totes les maquinaries de replicació, transcripció i traducció, i de tots els sistemes enzimàtics que duen a terme totes les reaccions metabòliques pròpies del mitocondri. Aquesta limitació d'espai ha conduït al mtDNA a presentar una estructura altament compacta, on hi manquen els introns, els tRNA i rRNA són més petits que els seus respectius nuclears i, fins i tot, té lloc el solapament de gens (Bogenghagen, 2011). Un altre factor derivat del microambient matricial és l'estrès oxidatiu al que està sotmès el mtDNA (i la resta de factors i components presents en la matriu), causat per la presència continua de ROS, els quals són responsables de l'oxidació de les molècules de DNA, fenomen que causa alteracions en la replicació del mateix i el fan susceptible a la mutagènesi, tot i la presència d'antioxidants com la superòxid dismutasa 2 (SOD2). Totes aquestes agressions poden conduir a l'acumulació de mutacions, delecions i, fins i tot, deplecions del mtDNA, les quals, depenent del grau d'heteroplasmia que presenti el teixit, poden acabar manifestant-se en alguna de les malalties d'origen mitocondrial (Cui et al., 2012).

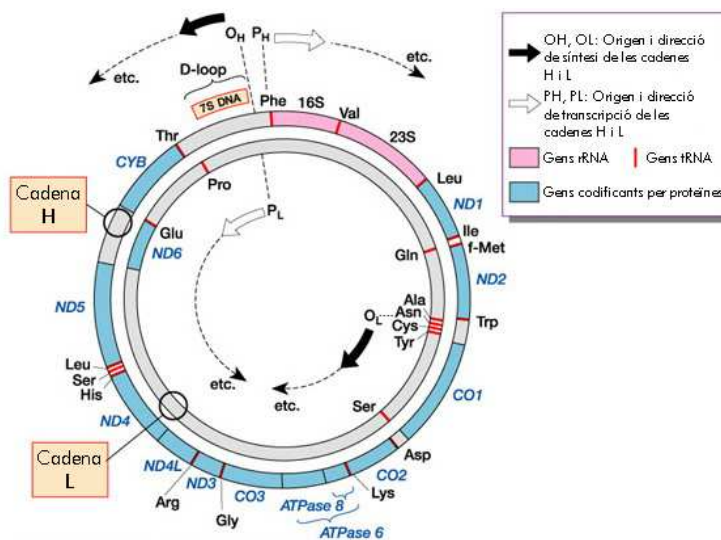


Figura 2. Esquema del genoma mitocondrial.

### La replicació mitocondrial

La replicació consisteix en la síntesi *de novo* de les dues cadenes que conformen el mtDNA. Aquest procés està regulat pel genoma nuclear, ja que tots els enzims i factors implicats estan codificats per aquest. Els elements necessaris per a la replicació són la DNA polimerasa  $\gamma$ , la p55, les *mitochondrial single-stranded DNA binding proteins* (SSBP) i l'helicasa *Twinkle*. A més, s'ha de destacar que la replicació i la transcripció són processos interrelacionats, ja que els primers transcrits a partir del promotor de la cadena lleugera ( $P_L$ ) són utilitzats com a encebadors per al començament de la replicació, la qual té lloc de forma unidireccional i asincrònica: primer la cadena pesada a partir del  $O_H$ , situat en el *D-loop* (que és l'única zona del mtDNA no codificant) i després la lleugera a partir de l'  $O_L$  (Clayton, 2003). Emperò, no es descarta que aquest sistema de replicació asimètrica coexisteixi amb un model similar al nuclear basat en una forquilla de replicació (Holt et al., 2000).

*La transcripció mitocondrial*

La transcripció del mtDNA es caracteritza per la producció d'un únic transcrit corresponent a la còpia sencera de tota la cadena, H o L, de manera que el processament posttranscripcional d'aquest transcrits policistrònics és imprescindible per a la correcta traducció de les proteïnes a partir dels seus mRNA madurs. Breument, el model transcripcional del mtDNA consisteix en l'acoblament dels complexos d'iniciació de la transcripció als promotors, tant al LSP com al HSP, situats al D-loop. Aquests complexos estan integrats per l'RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT), Tfam, el qual actua tant com a factor d'iniciació de la transcripció, per la seva capacitat topoisomerasa, com a molècula encobridora, i una de les dues isoformes TFB, TFB1M o TFB2M, les quals estan relacionades amb rRNA dimetiltransferases i podrien col·laborar amb el processament dels mRNA. Un cop format el complex, la transcripció transcorre fins a arribar al final de la cadena o a un punt de terminació determinat, el Term, el qual és reconegut pel factor mTERF, que s'acomplexa amb la maquinària transcripcional, desencadenant la finalització del procés. També s'ha vist que mTERF, a part d'unir-se al lloc de finalització, també ho fa al HSP, indicant un possible mecanisme de reciclatge de l'aparell transcripcional, acoblant la fi amb l'inici d'un altre cicle de transcripció (Scarpulla, 2008).

*La traducció mitocondrial*

La síntesi proteica mitocondrial és duta a terme conjuntament pels 2 rRNA i els 22 tRNA codificats en el mtDNA i per un ampli nombre de proteïnes d'origen nuclear, com són els factors d'iniciació, elongació i terminació, i proteïnes dels complexos ribosomals. El mecanisme concret amb el que transcorre tot el procés no es coneix amb profunditat. Només se sap que el codi genètic mitocondrial presenta algunes diferències amb el del genoma nuclear i que se suposa que el mecanisme és diferent al citosòlic ja que els mRNA mitocondrials no tenen regions

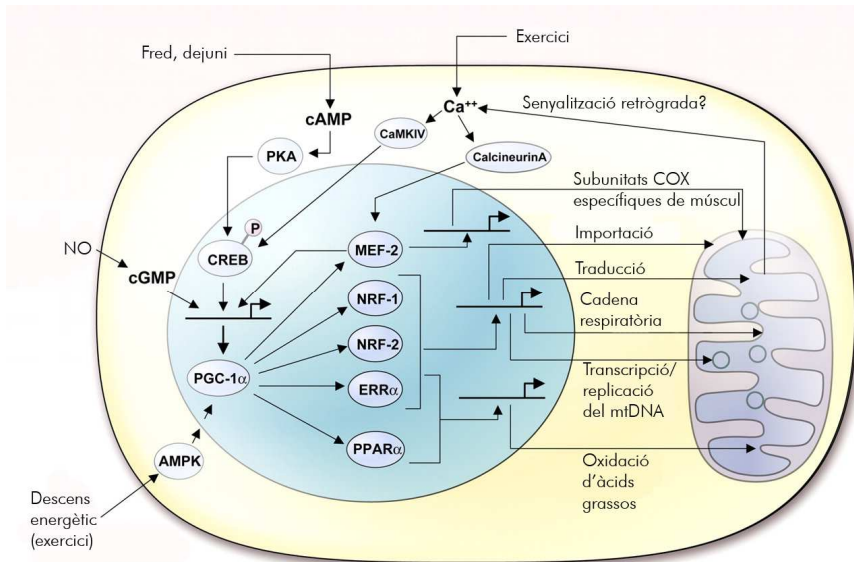


## Introducció

no-codificants ni el cap a 5', els quals són imprescindibles per al reconeixement dels mRNA nuclears per part de l'aparell ribosomal (Rotig, 2011).

### **I.2.2 Regulació de l'expressió de gens nuclears codificadors de proteïnes mitocondrials**

A part de les 13 proteïnes codificades pel mtDNA, són necessaris uns 100 gens nuclears per a completar l'estructura del sistema OXPHOS, així com uns altres 1000 responsables del correcte funcionament i manteniment de l'òrgànul (Taanman, 1999). Per tant, és evident la necessitat d'una fina coordinació entre els dos genomes per a l'èxit del mitocondri. Concretament, a nivell de les proteïnes del sistema OXPHOS, els responsables de la seva regulació són una sèrie de reguladors de la transcripció codificats per gens nuclears. Aquests reguladors es divideixen en dues classes: els que actuen regulant l'expressió dels gens mitocondrials, com són la POLRMT, el Tfam, els TFB1M i TFB2M, i l'mTERF (descrits en el punt anterior), o els que actuen a nivell nuclear. Dintre d'aquest últim grup, es poden diferenciar dos tipus diferents d'elements: els factors de transcripció i els coactivadors de l'expressió, els quals poden actuar conjuntament regulant l'activitat del promotor dels gens involucrats en la respiració (Figura 3). A més, cal recordar la importància dels sistemes TOM i TIM, responsables de la translocació de proteïnes a través de les membranes externa i interna, sense els quals no seria possible la importació de totes les proteïnes amb activitat mitocondrial.



**Figura 3.** Esquema-resum de les principals vies reguladores de la funció i biogènesi mitocondrial mediades per PGC-1 $\alpha$ . *Modificat a partir de Scarpulla, R.C. (2008).*

### *Factors de transcripció*

- **Nuclear Respiratory Factor-1:** NRF-1 va ser el primer factor de transcripció regulador de gens nuclears implicats en la respiració descrit, concretament en els gens del citocrom c i algunes de les subunitats de la citocrom oxidasa (Evans and Scarpulla, 1989). Actualment se sap que participa en la regulació de gairebé 700 gens (Cam et al., 2004), la majoria dels quals són mitocondrials, com subunitats dels 5 complexos de la cadena transportadora d'electrons, reguladors de la transcripció i replicació, com Tfam, TFBS, POLRMT o MRP, enzims de la via de biosíntesi del grup hemo, o components dels aparells d'importació de proteïnes i assemblatge (Scarpulla, 1997). NRF-1 actua com a homodímer reconeixent un lloc d'unió palindròmic de seqüència consens (T/C)GCGCA(C/T)GCGC(A/G). La seva activitat està regulada per fosforilació, per efecte de diferents factors de creixement, augmentant la seva unió al DNA i les funcions de transactivació i per glucosilació, que reprimeix la transcripció. També

sembla estar implicat en la regulació de la proliferació cel·lular, ja que interacciona amb un conjunt de gens regulats pel factor de transcripció regulador del creixement E2F, sent NRF-1 un nexa d'unió entre l'activitat mitocondrial i la proliferació (Herzig et al., 2000).

- **Nuclear Respiratory Factor-2:** NRF-2 es va identificar com un activador de la transcripció de COXIV (Virbasius and Scarpulla, 1991) i s'ha vist que també regula la transcripció d'altres subunitats dels complexos de la cadena transportadora d'electrons, sobretot del complex II, i de les maquinaries transcripcional i traduccionals. El lloc de reconeixement d'aquest factor conté un motiu GGAA, característica comuna en la família de factors de transcripció amb domini ETS (Batchelor et al., 1998). Està format per un complex de 5 subunitats, una de les quals és l'encarregada de la unió al DNA i la resta de l'activació de la transcripció. Molts dels gens regulats per NRF-1 també presenten llocs de reconeixement per NRF-2 (Scarpulla, 2002b), tot i que no és una regla general.
- **Estrogen-Related Receptor  $\alpha$ :** Els ERR són una família de receptors nuclears, formada pels membres  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , amb elevada homologia amb el receptor d'estrògens, que pertanyen a la família de receptors orfes, ja que no s'ha descrit cap lligand endogen conegut. El seu lloc de reconeixement en el DNA, conegut com *ERR response elements* (ERRE) tenen com a seqüència consens TNAAGCTCA. La distribució tissular d'ERR- $\alpha$  és ubíqua, però es troba majoritàriament en teixits amb elevat metabolisme oxidatiu que participen de l'homeòstasi energètica, com múscul cardíac i esquelètic i TAM (Ranhotra, 2009). ERR- $\alpha$  s'ha identificat com un element important de la regulació de gens involucrats en el metabolisme oxidatiu, especialment els involucrats en la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos, el cicle de Krebs, la fosforilació oxidativa i els processos encaminats a contrarestar l'estrès oxidatiu (Villena and Kralli, 2008). També s'ha relacionat la seva expressió amb la diferenciació adipocitària (Nichol et al., 2006). La seva activitat com a factor de transcripció és molt dependent de la presència

dels coactivadors PGC-1 ( $\alpha$  o  $\beta$ ), sistema que és molt important en el control de la biogènesi mitocondrial i del metabolisme energètic (Schreiber et al., 2004).

- **Peroxisome Proliferator-Activated Receptors:** Els PPARs són factors de transcripció dependents de lligand que actuen com a reguladors de la transcripció de gens implicats en el metabolisme glucídic i lipídic, del balanç energètic, de la resposta inflamatòria, la diferenciació cel·lular, l'adipogènesi i la tumorigènesi. Els PPARs reconeixen els seus elements de resposta específics (PPRE) mitjançant la heterodimerització amb un subtipus concret d'RXR (Keller et al., 1993). Aquests PPRE tenen com a seqüència consens dos hexàmers AGGTCA en repetició directa separats per una A. Els principals lligands naturals dels PPARs són els àcids grassos, especialment els poliinsaturats de cadena llarga. Tanmateix, també existeixen lligands sintètics amb elevada selectivitat, com els fibrats o les tiazildiones (TZD). Els PPARs es divideixen en tres subtipus, els quals presenten diferents patrons d'expressió tissular (Braissant et al., 1996) d'acord amb la seva funció:
  - PPAR- $\alpha$ : S'expressa majoritàriament en teixits amb elevada capacitat oxidativa (fetge, ronyó, TAM, múscul, cor). S'ha relacionat principalment amb la regulació de gens que participen en el catabolisme lipídic en fetge i múscul, estimulant els processos de  $\beta$ -oxidació (Desvergne and Wahli, 1999). També participa en la resposta al dejuni com a regulador de l'homeòstasi energètica, ja que incrementa l'oxidació d'àcids grassos a cossos cetònics, els quals seran utilitzats com a substrat energètic pels teixits perifèrics en situacions de baixa glucèmia (Kersten et al., 1999; Leone et al., 1999).
  - PPAR- $\delta$ : Expressió ubiqua. S'ha relacionat amb la regulació del catabolisme dels àcids grassos i l'homeòstasi energètica. Per

exemple, la seva activació en múscul esquelètic augmenta l'expressió de gens que promouen el catabolisme lipídic i de proteïnes desacobladors, incrementant la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos (Tanaka et al., 2003). A més, la sobreexpressió d'una forma activa de PPAR- $\delta$  en ratolins indueix la diferenciació de les fibres musculars a fibres de tipus I, les quals es caracteritzen per la seva capacitat oxidativa degut al seu elevat número de mitocondris (Wang et al., 2004).

- **PPAR- $\gamma$** : Expressió majoritària en teixit adipós blanc i marró on actua com un important regulador de l'adipogènesi. La seva expressió augmenta durant la diferenciació adipocitària i, la seva activació mitjançant TZD promou la conversió dels preadipòcits a adipòcits madurs, procés que va acompanyat d'un augment en l'expressió de gens implicats en la captació i acumulació de lípids (Tontonoz et al., 1994). A part d'aquest paper en l'adipogènesi, PPAR- $\gamma$  també regula els processos de lipogènesi en l'adipòcit madur. En aquest sentit, la inhibició de la seva activitat provoca una disminució dels dipòsits de lípids en TAB i TAM (Rieusset et al., 2002). A més, PPAR- $\gamma$  és important en la captació d'àcids grassos en l'adipòcit (Desvergne et al., 2006).
- **cAMP response element binding protein**: CREB, el qual reconeix l'element de resposta CRE que té una seqüència consens palindròmica TGACGTCA, juntament amb NRF-1, està involucrat amb la regulació de l'expressió d'alguns gens codificants de proteïnes mitocondrials, com el citocrom c en resposta a estímuls proliferatius (Herzig et al., 2000) o UCP1 en resposta a senyals adrenèrgics en TAM (Thonberg et al., 2002). Emperò, CREB no és un factor gaire comú en gens mitocondrials.
- **Proteïna repressora de la transcripció YY-1**: YY-1, el qual reconeix com a lloc d'unió la seqüència del DNA (A/C)GCCATNTT, s'ha descrit com un regulador, tant positiu com negatiu, de l'expressió de certes subunitats de

la citocrom c oxidasa, així com altres subunitats del sistema OXPHOS i de factors d'assemblatge (van Waveren and Moraes, 2008). Per altra banda, YY-1 s'ha identificat també com una diana d'mTOR, el qual actua com un sensor dels nutrients cel·lulars (Cunningham et al., 2007).

- **Sp1**: Sp1 està implicat en l'activació i/o repressió dels gens del citocrom c<sub>1</sub> (Li et al., 1996b) i de l'adenina nucleòtid translocasa 2 humana (Li et al., 1996a), els quals no tenen llocs de reconeixement per NRF (Zaid et al., 1999). El seu lloc d'unió al DNA és típicament una caixa GC, amb seqüència consens (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T).
- **MEF-2/E-box**: Aquests dos elements, els quals tenen per seqüència consens d'unió al DNA CT(A/t)(a/t)AAATAG i el palíndrom CANNTG, respectivament, s'han descrit en la regulació de les subunitats específiques de múscul de la COX, seguint un patró comú de regulació amb altres gens específics d'aquest teixit (Lenka et al., 1996).

### *Coactivadors de la transcripció*

- **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 $\alpha$** : PGC-1 $\alpha$  és el membre fundador d'una família de coactivadors transcripcionals encarregats de la regulació del programa de biogènesi mitocondrial. Va ser identificat en teixit adipós marró (TAM) per la seva interacció amb PPAR $\gamma$  i per l'augment de la seva expressió, i conseqüent augment de la biogènesi mitocondrial, com a resposta adaptativa al fred o a estímuls  $\beta$ -adrenèrgics (Puigserver et al., 1998). També s'ha vist, que la seva sobreexpressió en pre-adipòcits i mioblasts condueix a la inducció de gens, tant nuclears com mitocondrials, relacionats amb la funció mitocondrial, així com un augment del mtDNA (Wu et al., 1999). A part dels seus efectes, via NRF-1, sobre l'expressió de gens de la cadena respiratòria com

COXIV o citocrom c, PGC-1 $\alpha$  també indueix l'expressió de gens de les vies de la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos, a través de la interacció amb PPAR $\alpha$  (Huss and Kelly, 2004), o de la biosíntesi del grup hemo, mitjançant NRF-1 i FOXO1 (Handschin et al., 2005). PGC-1 $\alpha$  també interactua amb ERR- $\alpha$  en la inducció gènica d'MCAD (via de l'oxidació dels àcids grassos) (Huss and Kelly, 2004) i en la transactivació dels gens del citocrom c i de l'ATP sintasa (Schreiber et al., 2004).

- **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 $\beta$** : PGC-1 $\beta$  és un membre de la mateixa família de coactivadors que PGC-1 $\alpha$ , amb una elevada similitud de seqüència i distribució tissular a aquest, sobretot en TAM i múscul cardíac i esquelètic. Emperò, PGC-1 $\beta$  no s'indueix en TAM per efecte del fred i té poca capacitat d'induir gens gluconeogènics en hepatòcits (Lin et al., 2005). PGC-1 $\beta$  és un potent coactivador d'NRF-1 (Lin et al., 2003) i la seva expressió ectòpica condueix a un augment de la biogènesi mitocondrial i del consum d'oxigen, i amb una menor inducció del *leakage* de protons que PGC-1 $\alpha$  (St-Pierre et al., 2003). A més, també s'ha descrit que PGC-1 $\beta$ , i no PGC-1 $\alpha$ , és el coactivador transcripcional implicat en la regulació de l'expressió de gens mitocondrials en adipòcits blancs (Pardo et al., 2011).
- **PGC-1 $\alpha$ -related coactivator**: PRC és el membre de la família identificat més recentment (Andersson and Scarpulla, 2001) i s'ha vist que és capaç d'unir-se a NRF-1 i transactivar alguns dels seus gens diana. També s'ha descrit la seva activitat en l'expressió dels gens TFB1M i TFB2M (Gleyzer et al., 2005), tal i com ho fa PGC-1 $\alpha$ . Pel que fa a la distribució tissular, PRC no es troba tan enriquit en TAM, en comparació al teixit adipós blanc (TAB), com PGC-1 $\alpha$ , i la seva inducció en resposta al fred és molt dèbil. Emperò, PRC és molt abundant en cèl·lules proliferants i s'ha vist que interacciona amb CREB, el qual és un factor de resposta ràpida als factors de creixement sèrics, pel que es podria associar a PRC amb la biogènesi mitocondrial durant la proliferació.

### I.3 Apoptosi, mPTP i ROS

Els mitocondris, a part de la seva activitat energètica, també intervenen en l'execució de l'apoptosi. Així com els organismes unicel·lulars, la supervivència passa per la ràpida divisió i així assegurar la transmissió del seu material genètic als seus descendents, en els organismes multicel·lulars la mort cel·lular és un dels processos imprescindibles per al manteniment de l'homeòstasi, ja que és l'encarregada d'eliminar les cèl·lules defectuoses, infectades o danyades, permetent el recanvi cel·lular i així garantir la supervivència de l'organisme sencer. Així mateix, aquests processos també són necessaris des de la fecundació, ja que la majoria de fenòmens relacionats amb el desenvolupament embrionari i l'adquisició de la maduresa dels diferents teixits impliquen la mort cel·lular. Aquest tipus de mort cel·lular s'anomena apoptosi, i a diferència de la necrosi, que és la mort cel·lular derivada d'una lesió aguda i amb greus conseqüències tòxiques per al teixit on es troba pel vessament incontrolat del seu contingut, és un fenomen programat i organitzat. L'execució de l'apoptosi comença amb una sèrie d'estímuls fisiològics o patològics que conduiran a que la cèl·lula iniciï una sèrie de canvis bioquímics i morfològics com són la formació d'evaginacions, la pèrdua del volum cel·lular, la condensació de la cromatina i la fragmentació del nucli i dels cromosomes, desembocant en la seva descomposició en diverses vesícules o cossos apoptòtics, que a la seva vegada seran fagocitades pels macròfags, eliminant qualsevol risc tòxic per al teixit.

L'apoptosi es pot dividir, segons com s'iniciï el procés, en dos mecanismes d'execució, tot i que el resultat final és idèntic, gràcies a la convergència de les dues vies en uns efectors comuns. La via extrínseca, també coneguda com la via regulada per receptors de mort, és activada extracel·lularment per la interacció de diferents lligands amb diferents receptors de mort, com Fas, TNF- $\alpha$ , TRAIL o DR3-6. Després de la seva activació, els diferents receptors són capaços de formar el DISC (*death-inducing signaling complex*) mitjançant el reclutament de l'adaptador FADD (*Fas-associated death domain*) i les procaspases 8/10. Com a conseqüència, les caspases 8/10 són activades, les quals, al seu torn, activen per



## Introducció

proteòlisi les caspases efectores 3/7, punt de convergència amb la via intrínseca (Gonzalvez and Ashkenazi, 2010). Les caspases (*cystein-aspartic acid protease*) són una família de proteases que tallen les seves proteïnes diana específicament per residus aspartat i la seva activitat és clau en l'execució de l'apoptosi. Aquests enzims són sintetitzats en forma de zimogen, les procaspases, i requereixen de l'oligomerització i/o proteòlisi per a la seva activació. D'aquesta manera, un cop activades les caspases de l'inici de la via, aquestes desencadenaran en una cascada de proteòlisi de diverses procaspases que acabaran amb l'execució final de l'apoptosi (Taylor et al., 2008).

Per altra banda, la via intrínseca és iniciada per l'alliberament, des del mitocondri al citosol, d'una sèrie de factors apoptogènics, com el citocrom c o Smac/DIABLO, i per la permeabilització de la MME per efecte de l'oligomerització de Bax i Bak. Breument, davant d'un estímul apoptogènic, les proteïnes BH3 (Puma, Noxa, Bid, Bad, Bim, Bik, Hrk, Bmf) són sobreexpressades o activades post-traduccionament, unint-se a les proteïnes antiapoptòtiques de la família Bcl-2, alliberant el seu efecte inhibitori sobre Bax i Bak, o activant-les directament (Youle and Strasser, 2008). Un cop actives, Bax, que és translocada a la MME, i Bak, que ja en forma part, oligomeritzen formant el MAC (*mitochondrial apoptosis-induced channel*) i desencadenen l'alliberament del citocrom c, Smac/DIABLO, endonucleasa G, AIF i Omi/HtrA2. El citocrom c alliberat s'uneix a Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) per a induir la formació de l'apoptosoma, juntament amb la procaspasa 9, que s'activarà i, que al seu torn activarà les caspases 3 i 7 (Budihardjo et al., 1999), mentre que Smac/DIABLO (Srinivasula et al., 2000) i Omi/HtrA2 (Suzuki et al., 2001) s'uneixen a XIAP, eliminant-ne el seu efecte inhibitori.

La permeabilització de la MME per part del MAC és imprescindible per a l'alliberament del citocrom c (Dejean et al., 2006). Però a més a més, lligat a aquest fenomen de permeabilització del mitocondri, també s'ha descrit l'existència de porus en la MMI, l'mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*). L'obertura de l'mPTP condueix a l'inflament de la matriu, la despolarització de la membrana,

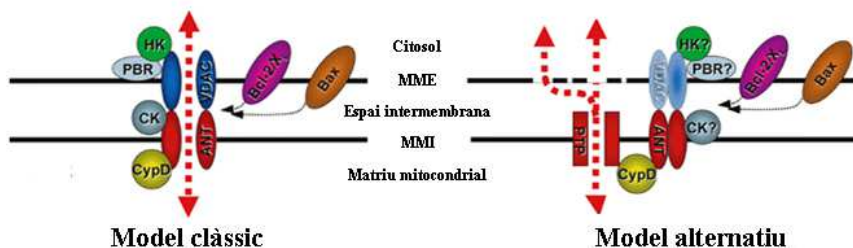
el trencament de la MME i el consegüent alliberament inespecífic de les proteïnes de l'espai intermembrana. La relació entre aquest fenomen i l'apoptosi encara és confusa. Originalment se l'havia descrit com el responsable de l'alliberament del citocrom c, després de la seva activació per efecte de les diferents proteïnes apoptogèniques (Bax i Bak) i del trencament físic de la MME (Kroemer et al., 2007), però cada vegada més se l'està considerant una conseqüència final de l'apoptosi i que l'alliberament del citocrom c és mediat pel MAC, fins i tot amb una possible participació de VDAC (Shoshan-Barmatz et al., 2010).

Per tant, l'obertura de l'mPTP actua com un canal no selectiu que permet el pas de qualsevol molècula inferior a 1,5 kDa, i la seva activació està vehiculada principalment per un augment en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriu (Haworth and Hunter, 1979). Però, a part del  $\text{Ca}^{2+}$ , existeixen altres factors activadors, com són l'estrès oxidatiu, alts nivells de fosfat i la depleció de nucleòtids d'adenina (Halestrap and Pasdois, 2009). Per altra banda, un pH inferior a 7.0, probablement com a conseqüència de la competència entre els  $\text{H}^+$  amb el  $\text{Ca}^{2+}$  pel lloc d'unió/activació del porus (Bernardi et al., 1992), tal i com fan altres cations divalents com el  $\text{Mg}^{2+}$ , i un  $\Delta\Psi_m$  altament negatiu (Petronilli et al., 1993), són potents inhibidors de l'obertura del porus.

El model clàssic del PTP estableix que està format físicament per VDAC a la MME i ANT a la MMI, amb la interacció de l'hexoquinasa II (HKII) i el receptor de benzodiazepines (PBR) amb VDAC, i de la creatina quinasa (CK) (per la cara de l'espai intermembrana) i de la ciclofilina D (CypD) (per la part de la matriu) amb ANT. Aquest conjunt de proteïnes satèl·lit, juntament amb membres de la família Bcl-2, tindria un paper regulador sobre l'activitat del porus. La identificació d'aquests elements de l'mPTP s'ha establert mitjançant la utilització de diferents compostos químics inhibidors de diferents proteïnes mitocondrials i les conseqüències derivades a nivell de la regulació de l'activitat del porus (Beutner et al., 1998). Emperò, aquest model ha estat revisat durant la segona meitat de la dècada dels 2000 en estudis basats en *knockouts* dels diferents elements del porus, establint que el porus estaria constituït per altres proteïnes ja que la manca

## Introducció

d'aquests teòrics membres permet el desenvolupament de l'apoptosi i només impliquen canvis de sensibilitat en l'activació del porus. En aquest sentit, s'ha descrit que la manca de ciclofilina D continua permetent la inducció del PTP via  $\text{Ca}^{2+}$ , tot i que se'n requereixen nivells més alts (Baines et al., 2005; Basso et al., 2005) i que la manca d'ANT (Kokoszka et al., 2004) o de VDAC (Baines et al., 2007) tampoc impedeix la formació de l'mPTP, relegant tots aquests elements a un paper més aviat regulador. L'alternativa estructural al model clàssic proposada recentment es basa en el transportador de fosfat (PiC) (Halestrap, 2009), gràcies a les evidències que es tenen de la capacitat del fosfat per a obrir el porus (Leung et al., 2008) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquemes dels 2 models proposats per l'mPTP. *Adaptat a partir de (Alcala et al., 2008)*

La relació dels mitocondris amb la mort cel·lular no només passa pel seu paper en interrompre el transport electrònic i el metabolisme energètic, o en l'alliberament i/o activació de proteïnes apoptòtiques, sinó també a través de l'alteració dels nivells de potencial redox cel·lular. Així, els mitocondris estan considerats com la principal font de ROS, les quals són uns elements clau en la senyalització, especialment en el balanç entre supervivència i mort cel·lular (Rigoulet et al., 2011).

Les ROS són molècules originades com a coproductes de reaccions incompletes d'oxidació-reducció on hi intervé l'oxigen i que es caracteritzen per la seva elevada reactivitat química. Entre les diferents molècules que formen part d'aquest grup hi ha el peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'àcid hipoclorós (HClO) i els

radicals lliures, com l'oxihidril ( $\cdot\text{OH}$ ) o el superòxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Tal i com s'ha explicat en el punt 1.1, el transport de  $\text{H}^+$  està associat a un d'electrons, el qual es realitza a través dels diferents complexos de la cadena respiratòria fins a arribar a l' $\text{O}_2$ , que actua com a acceptor final, reduint-se a  $\text{H}_2\text{O}$ . Emperò, una certa proporció dels electrons transportats són reduïts de manera incompleta, sobretot en els complexos I i III, generant radicals superòxid, a partir dels quals es genera peròxid. L'estrès oxidatiu és la situació en què la producció de ROS és notablement elevada i supera l'activitat dels diferents agents antioxidants cel·lulars, com els enzims superòxid dismutasa, catalasa o glutatió peroxidasa, desencadenant-se una sèrie de fenòmens causants de dany cel·lular, com pot ser la peroxidació de lípids o l'oxidació de proteïnes. Com a conseqüència la membrana mitocondrial queda danyada, permetent la sortida de ROS al citosol, els quals afectaran altres orgànuls (Ravikumar et al., 2010) i el DNA nuclear, l'oxidació del qual origina mutacions que poden conduir a la transformació de la cèl·lula, sent ROS un possible agent cancerigen. A més a més, els ROS actuen com senyalitzadors proapoptòtics, activant l'mPTP a través del seu efecte sobre VDAC (Madesh and Hajnoczky, 2001) o sobre ANT (Costantini et al., 2000). En aquest darrer cas, ROS és capaç d'oxidar les cisteïnes de les posicions 160 i 257, formant-se un pont disulfid entre aquests dos residus, el que altera la conformació de la translocasa i la seva impossibilitat d'unir nucleòtids, permetent l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  i consegüent activació de l'mPTP.

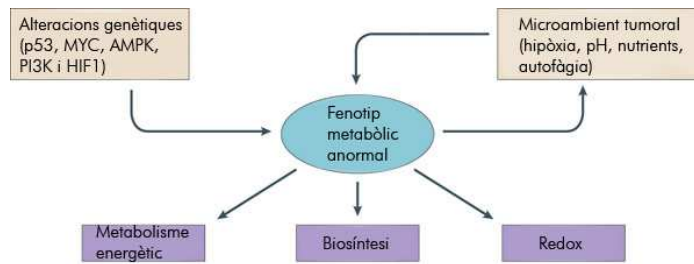
#### 1.4 Metabolisme energètic i càncer

En el metabolisme es poden diferenciar dos processos diferents però estretament coordinats: el catabolisme i l'anabolisme. El catabolisme compren totes aquelles reaccions que tenen com a resultat l'obtenció d'energia i de poder reductor, normalment a través de la transformació de macromolècules a molècules més senzilles. Per altra banda, l'anabolisme és el conjunt de reaccions encaminades a la síntesi de noves molècules complexes a partir de precursors més

## Introducció

senzills, amb un consum energètic associat. En condicions fisiològiques existeix un balanç entre aquests dos processos, el qual està regulat principalment per l'estat energètic de la cèl·lula i per la necessitat de síntesi de macromolècules. Tot aquest conjunt de reaccions està destinat a mantenir l'equilibri de les condicions cel·lulars, és a dir, l'homeòstasi.

Tanmateix, existeix una situació patològica, el càncer, en què la cèl·lula perd el control sobre la regulació d'aquests processos. Les cèl·lules canceroses presenten una sèrie de capacitats distintives que permeten el creixement tumoral i la disseminació metastàtica. Aquests senyals d'identitat, descrits per D. Hanahan i R. A. Weinberg com a *The Hallmarks of Cancer* (Hanahan and Weinberg, 2000), consisteixen essencialment en una senyalització proliferativa mantinguda, l'evasió dels sistemes supressors del creixement, la resistència a la mort cel·lular, la immortalitat replicativa, la inducció de l'angiogènesi, i l'activació de la invasió i la metàstasi. No obstant, totes aquestes adaptacions no serien possibles sense una reprogramació del metabolisme energètic que permeti el subministrament de l'energia necessària per al creixement cel·lular i la divisió (Hanahan and Weinberg, 2011). Moltes de les vies de senyalització oncogèniques convergeixen en l'objectiu final d'adaptar el metabolisme de la cèl·lula tumoral per tal de garantir el seu creixement i supervivència. És més, algunes d'aquestes alteracions metabòliques semblen ser absolutament necessàries per a la transformació d'una cèl·lula normal a cèl·lula tumoral. Aquests mecanismes d'adaptació es fonamenten principalment en satisfer tres necessitats bàsiques derivades de l'alta taxa proliferativa: (i) l'obtenció ràpida d'ATP per tal de mantenir un estat energètic viable; (ii) un augment en la biosíntesi de macromolècules; i (iii) un estret manteniment de l'estat redox de la cèl·lula (Cairns et al., 2011) (Figura 5).



**Figura 5. Determinants del fenotip metabòlic tumoral.** *Modificat a partir de Cairns et al., 2011.*

En una cèl·lula normal, l'energia és subministrada principalment a partir de dos substrats: els àcids grassos i la glucosa. En el primer cas, la principal via catabòlica implicada és la  $\beta$ -oxidació mitocondrial, que consisteix en l'alliberament consecutiu de molècules d'acetil-CoA a partir d'un acil-CoA (unió d'un àcid gras amb un coenzim A). Aquestes molècules d'acetil-CoA ingressaran a cicle de Krebs i seran oxidades a  $\text{CO}_2$  a la vegada que generen potencial redox, el qual serà utilitzat per la cadena respiratòria per a la generació d'un gradient electroquímic imprescindible per a la síntesi d'ATP mitjançant la fosforilació oxidativa.

Quan el substrat energètic utilitzat és la glucosa, aquesta és sotmesa a una sèrie de reaccions catabòliques, conegudes com a glucòlisi, fins a la formació de piruvat. D'acord amb el camí catabòlic que segueixi el piruvat, el rendiment energètic que s'obtingui de la glucosa variarà enormement. Així, en condicions aeròbiques, és a dir, amb disponibilitat d'oxigen, el piruvat es transformarà en acetil-CoA i ingressarà al cicle de Krebs, on serà oxidat, generant 32 molècules d'ATP per cada glucosa. En canvi, quan la quantitat d'oxigen és insuficient per a realitzar l'oxidació mitocondrial, el piruvat serà substrat de la lactat deshidrogenasa (LDH), obtenint un rendiment net directe de només 2 molècules d'ATP per glucosa. En condicions aeròbiques, les cèl·lules normals catabolitzen la glucosa de forma oxidativa en el mitocondri. Emperò, sota condicions anaeròbiques, com és el cas del microambient tumoral, la glucòlisi és l'única via

## Introducció

per a metabolitzar la glucosa. Tanmateix, Otto Warburg va ser el primer en observar que les cèl·lules canceroses, tot i la presència d'oxigen, poden reprogramar el seu metabolisme glucídic i realitzar majoritàriament la glucòlisi, el que es coneix com a glucòlisi aeròbica o "efecte Warburg" (Warburg, 1956a). Bàsicament (Figura 6), en cèl·lules normals, la glucosa és fosforilada per l'hexoquinasa I (HK) i majoritàriament és degradada via glucòlisi a piruvat, el qual entra al mitocondri on és descarboxilat i oxidat per la piruvat deshidrogenasa (PDH) a acetil-CoA. L'acetil-CoA ingressa al cicle de Krebs on els 2 carbonis del seu esquelet són oxidats completament a  $\text{CO}_2$  mentre que els àtoms d'hidrogen redueixen el  $\text{NAD}^+$  i el FAD, els quals alimentaran el transport d'electrons de la cadena respiratòria. Paral·lelament, una part de la glucosa-6-fosfat (G-6P) és utilitzada per a produir ribosa-5-fosfat i NADPH, els quals seran utilitzats per a sintetitzar nucleòtids i àcids grassos, així com també una petita proporció de les trioses fosfat també són utilitzades per a la síntesi de lípids i fosfolípids, juntament amb el NADPH i l'acetil-CoA. Els aminoàcids, inclosa la glutamina (Gln) entren en el cicle de recanvi fisiològic de les proteïnes, tot i que una petita quantitat és utilitzada per a la síntesi de nucleòtids. L'excés d'aminoàcids són desaminats i entren a cicle de Krebs per a produir energia. Aproximadament entre l'1-2% de l'oxigen captat pel mitocondri és reduït a radical superòxid i a ROS. En canvi, en cèl·lules tumorals, on les vies anabòliques es troben augmentades, la glucosa és majoritàriament fosforilada per l'HKII, la qual es troba sobreexpressada en aquestes cèl·lules. Només una part de la G-6P resultant és convertida a piruvat, que al seu torn és majoritàriament reduït a lactat, gràcies a la sobreexpressió de la lactat deshidrogenasa (LDH) i de la PDH kinasa (PDK), inhibidora de la PDH. Una proporció significativa de la G-6P s'utilitza per a la síntesi de nucleòtids. A més, part del citrat del cicle de Krebs és exportat al citosol on, per acció de la citrat liasa, es transformarà en acetil-CoA que és utilitzat per a la síntesi de lípids i fosfolípids. En el cas de les cèl·lules tumorals, els nivells de ROS acostumen a ser superiors als de les cèl·lules normals (Solaini et al., 2011).

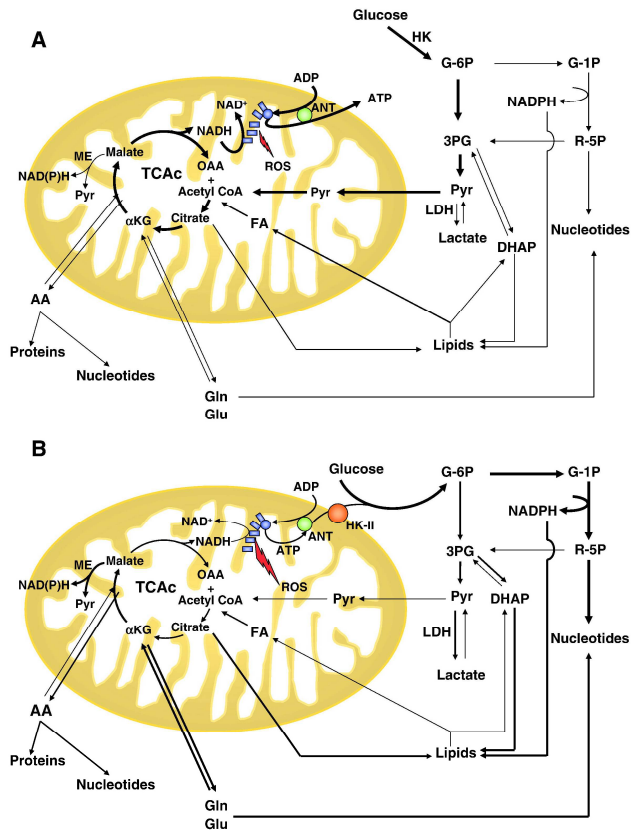


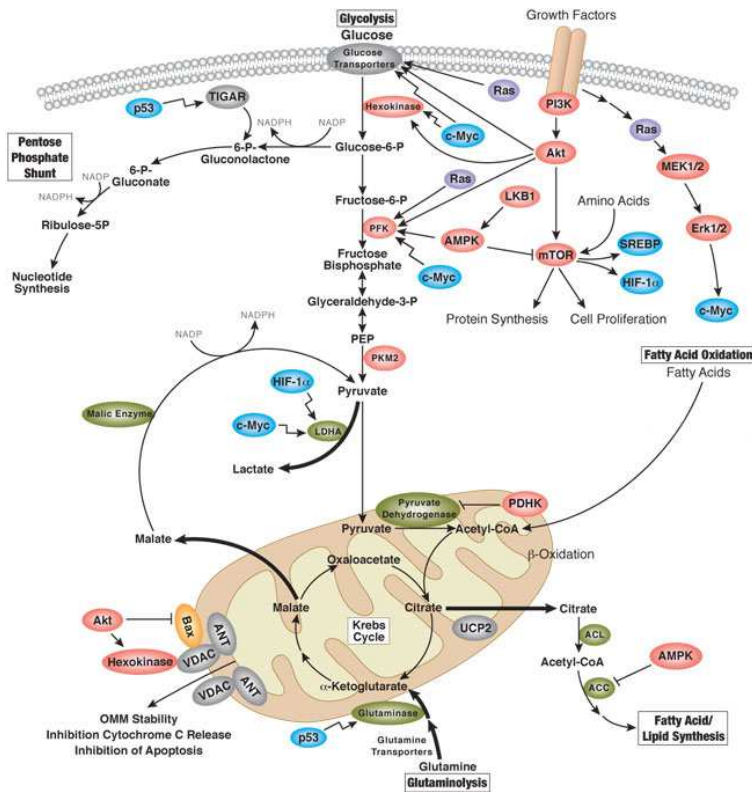
Figura 6. Esquema del metabolisme mitocondrial en cèl·lules normals (A) i de la reprogramació metabòlica que té lloc en cèl·lules tumorals (B). Adaptat de (Solaini et al., 2011).

Entre els principals elements involucrats en regular la glucòlisi aeròbica (Figura 7), hi trobem la isoforma M2 de la piruvat kinasa (PKM2), la qual és majoritària en cèl·lules tumorals i participa d'un circuit de retroalimentació positiva que amplifica l'activitat d'HIF-1, responsable de la progressió del càncer; l'HKII, que és un enzim glucolític clau i que es troba sobrerregulat en tumors; l'LDH, imprescindible per al manteniment de la glucòlisi, a part de què la producció de lactat genera un microambient tumoral àcid que facilita la invasió tumoral i la metàstasi; i diversos oncògens, com Ras, c-Myc, NF-κB, AKT, PI3K i mTOR, i gens supressors de tumors, com TP53 i PTEN, que han estat relacionats amb les



## Introducció

adaptacions metabòliques, les altes taxes de glucòlisi i la transcripció de gens involucrats en les vies glucolítiques i glutaminolítiques (Bayley and Devilee, 2012).



**Figura 7. Principals vies metabòliques implicades en l'efecte Warburg.** Adaptat de Cell Signaling Technology®.

El sentit funcional de la glucòlisi en les cèl·lules tumorals, donat el seu baix rendiment energètic, podria explicar-se per la capacitat de la via de generar intermediaris que són utilitzats en múltiples vies biosintètiques, incloses les de síntesi de nucleòtids, a través de la via de les pentoses fosfat, i d'aminoàcids. Això facilitaria la síntesi de macromolècules, les qual són imprescindibles per a la formació de noves cèl·lules. Malgrat totes les evidències que hi ha al voltant de la importància de la reprogramació del metabolisme energètic en les cèl·lules tumorals, aquesta encara és generalment considerada una conseqüència derivada dels altres sis processos descrits originalment per Hanahan i Weinberg, degut a

què hi intervenen molts elements comuns amb aquests processos. Tanmateix, cada vegada hi ha més evidències que determinats canvis metabòlics són imprescindibles per a què una cèl·lula normal esdevingui cancerosa.

## II. ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA

### II.1 Característiques generals de l'adenina nucleòtid translocasa

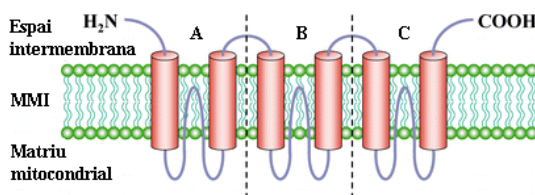
#### *La família de transportadors mitocondrials SLC25*

Els mitocondris, com ja hem vist, són uns orgànuls imprescindibles per al correcte funcionament de les cèl·lules, especialment en l'àmbit del metabolisme energètic. La compartimentalització de les activitats degut als diferents espais en què s'organitzen estructuralment els mitocondris fa que el pas de substrats inicials i productes finals a través de les membranes mitocondrials sigui clau per al manteniment de totes aquestes vies metabòliques. Els encarregats de facilitar el flux d'aquesta gran varietat de soluts a través de la membrana mitocondrial interna (MMI) són els membres d'una família de transportadors mitocondrials (MCF, *Mitochondrial Carrier Family*), els quals són proteïnes integrals de membrana codificades pels gens SLC25 (Palmieri, 2004). Per tant, la seva activitat exerceix un control del flux de les vies metabòliques que tenen lloc en el mitocondri, intervenint en el transport de metabòlits relacionats, entre altres activitats, amb la fosforilació oxidativa, els cicle de Krebs, l'oxidació d'àcids grassos, la gluconeogènesi, la lipogènesi, la transferència de poder reductor, la síntesi d'urea, la degradació d'aminoàcids, o la síntesi de DNA, RNA i proteïnes mitocondrials. Tot i l'elevada divergència a nivell filogenètic, tots els MCFs amb funció coneguda presenten una estructura formada per sis hèlixs que travessen la MMI amb els extrems C- i N-terminal situats a l'espai intermembrana i que es repleguen en cercle formant un canal central (Figura 8). Aquesta estructura

## Introducció

s'organitza en tres dominis homòlegs repetits en tàndem (A, B i C), cada un dels quals està format per uns 100 aminoàcids. Cada domini conté dos trams hidròfobs integrats en la membrana i connectats entre ells, per la cara de la matriu, per un llarg *loop* hidròfil que s'internalitzaria dins la membrana. La majoria dels MCFs aïllats formen homodímers, tot i que la raó funcional subjacent a aquesta organització quaternària no es coneix.

A part de l'ANT mitocondrial, també existeix un transportador de nucleòtids d'adenina ANC (codificat pel gen SLC25A17) en els peroxisomes. La seva activitat està relacionada amb la  $\beta$ -oxidació peroxisomal, sent l'encarregada d'introduir l'ATP necessari per a l'activació dels àcids grassos a canvi de l'AMP resultant d'aquesta reacció (Visser et al., 2002).



**Figura 8.** Model topològic del monòmer d'un membre de la família de transportadors mitocondrials. *Adaptat de* (Palmieri, 2004).

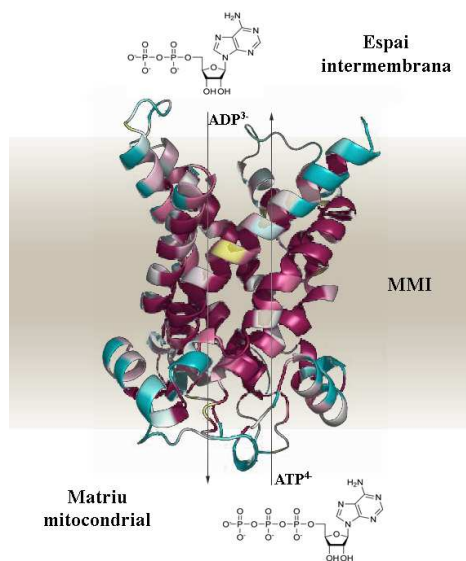
### *Propietats funcionals i estructurals de l'adenina nucleòtid translocasa*

Entre tots els soluts que han de travessar la MMI hi trobem el trifosfat d'adenosina o ATP, molècula que és considerada com la moneda d'intercanvi energètic per excel·lència, gràcies a la seva estructura química, ja que posseeix 2 enllaços fosfoanhídrids d'alta energia entre els 3 grups fosfats units a la ribosa (adenina). La hidròlisi d'aquests enllaços allibera una gran quantitat d'energia, en concret, 7.7 kcal/mol d'ATP hidrolitzat a ADP (difosfat d'adenosina). L'ATP és sintetitzat en el mitocondri per l'ATP-sintasa, la qual afegeix un fosfat inorgànic ( $P_i$ ) a un ADP gràcies a l'energia que aprofita de la força protomotriu derivada del

potencial electroquímic de protons generat pel transport d'electrons al llarg de la cadena respiratòria. Per a què aquesta reacció existeixi i, en conseqüència, per a què tot el sistema OXPHOS mantingui la seva activitat, s'ha de garantir la disponibilitat d'un *pool* d'ADP suficient dins el mitocondri. A més, la majoria de l'ATP sintetitzat en la matriu mitocondrial ha de ser transportat al citosol on és necessari per a satisfer les innumerables activitats que requereixen energia per a què es duguin a terme. El membre de la família SLC25 responsable d'aquest transport és l'adenina nucleòtid translocasa mitocondrial (ANT) o transportador ADP/ATP (AAC, de l'anglès *ADP/ATP carrier*). La proteïna ANT està formada per uns 298 aminoàcids (33 kDa aproximadament de pes molecular) que adopten l'estructura terciària característica de la família MCFs, formant un canal a través de la MMI (Figura 9) (Pebay-Peyroula et al., 2003). La cristal·lització de l'ANT1 bovina ha permès observar la possibilitat de què ANT pugui actuar en forma de monòmer, tot i que històricament s'ha considerat que ANT actua en forma d'homodímer (Hackenberg and Klingenberg, 1980; Block et al., 1982). El procés de dimerització estaria regulat per una transglutaminasa de tipus 2 (TG2) gràcies a la seva activitat PDI (*protein disulphide isomerase*) (Malorni et al., 2009). Sigui com sigui, ANT realitza el bescanvi entre l'ADP provinent del citosol i l'ATP sintetitzat *de novo* per fosforilació oxidativa dins el mitocondri en una relació d'1 a 1 (Fiore et al., 1998). A més, aquest bescanvi és electrogènic, ja que ANT importa ADP, que conté 3 càrregues negatives, i exporta ATP, que en conté 4. Per tant, l'activitat transportadora d'ANT depèn d'un estret acoblament amb la cadena respiratòria i la síntesi de l'ATP per l'ATP-sintasa, que són els altres dos mecanismes responsables de la generació del potencial de membrana mitocondrial. Cal destacar que el bescanvi ADP/ATP no és dependent d'energia i només funciona com un facilitador del pas de les dues molècules, pel que aquest trànsit podria donar-se en ambdós sentits. La polarització de la membrana mitocondrial en condicions normals permet que el bescanvi es realitzi a favor de l'entrada d'ATP i de la sortida d'ADP (Pfaff and Klingenberg, 1968; Pfaff et al., 1969). A més, l'elevada selectivitat del substrat sembla recaure en el número de càrregues dels grups fosfat, ja que l'AMP amb només un grup fosfat i dues càrregues negatives està totalment exclòs del transport. Tot indica que ANT és

## Introducció

capaç de reconèixer cada una de les parts de l'estructura del nucleòtid (Klingenberg, 2008). Curiosament, ANT també pot transportar petits soluts anònics, tot i que en una proporció molt inferior, ja que disposen de transportadors específics propis. Entre aquests soluts hi trobem el fosfoenolpiruvat (PEP) (Shug and Shrago, 1973) o el pirofosfat (PP<sub>i</sub>) (Asimakis and Aprille, 1980), els quals presenten 3 o 4 càrregues negatives, el que podria explicar la permissivitat d'ANT pel seu transport.



**Figura 9. Esquema de l'adenina nucleòtid translocasa en la MMI i el bescanvi ADP-ATP a través d'ella. Modificat a partir de la imatge de la cristal·lització de la translocasa ADP/ATP 1 de *B. taurus* (Nury et al., 2005)**

Tal i com passa amb els altres membres de la família de transportadors mitocondrials, la proteïna és sintetitzada en el citosol i ha de ser importada al mitocondri (Reichert and Neupert, 2004). El sistema TOM és l'encarregat de importar la proteïna al mitocondri, com la majoria de transportadors als que els hi manca una seqüència senyal (de Marcos-Lousa et al., 2006). A més, la integració en la MMI depèn de xaperones, en concret de l'Hsc70 i de l'Hsp90, i coxaperones, com p23 i Aha1, ja que l'existència en ANT de dominis altament hidròfobs requereix del complexament amb xaperones (Bhangoo et al., 2007).

*Inhibidors naturals de l'ANT*

L'estudi i caracterització de l'activitat transportadora d'ANT ha estat possible gràcies a l'ús d'inhibidors naturals específics. Aquests inhibidors es poden diferenciar en dues classes d'acord amb la seva naturalesa química (Trezeguet et al., 2008). El primer grup està format per l'atractilòsid (ATR) i pel carboxiatractilòsid (CATR), els quals són uns heteroglucòsids produïts pel card *Atractylis gummifera*. Els segon grup correspon a uns derivats d'àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga, l'àcid bongkreic (BA) i l'àcid isobongkreic (isoBA), secretats pels bacteris *Burkholderia cocovenans*. El seu ús ha permès identificar que ANT adopta dos estats conformacionals i que la interconversió entre ells dos és el que permet el transport d'ADP i ATP. En l'estat citoplasmàtic (estat *c*), un *loop* hidròfil de l'ANT, que és el lloc d'unió del nucleòtid, s'exposa cap a la cara citoplasmàtica (estrictament parlant, l'espai intermembrana), mentre que en l'estat matricial (estat *m*), aquest *loop* queda exposat cap a la cara de la matriu mitocondrial. L'estabilització en un o altre estat és clau per a la formació de l'mPTP, ja que mentre el BA s'uneix a ANT en el seu estat *m* i impedeix l'obertura del porus i la sortida del citocrom c (Brandolin et al., 1993; Marzo et al., 1998), l'ATR estabilitza ANT en l'estat *c*, induint l'obertura del porus (Klingenberg, 1993; Kantrow and Piantadosi, 1997).

Per altra banda, també s'ha descrit que certs acil-CoA, com el palmitoil-CoA o l'oleil-CoA, són capaços d'inhibir el transport d'ADP i ATP (Pande and Blanchaer, 1971; Lerner et al., 1972). Aquests acil-CoA competeixen amb l'ADP i l'ATR, però no amb el BA, indicant que la seva unió és propera al centre d'unió del nucleòtid.

### *ANT i l'mPTP*

Com acabem de veure, a part de la seva activitat bescanviadora, ANT està implicada amb l'activitat de l'mPTP. Aquesta relació va aparèixer arran dels estudis en què s'observava que l'obertura de l'mPTP, i la conseqüent propagació de la via apoptòtica, pot ser inhibida per l'ATP, l'ADP i l'àcid bongkreic, els quals actuarien disminuint la sensibilitat a l'efecte del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre l'obertura del porus (Hunter and Haworth, 1979; Halestrap and Davidson, 1990; Novgorodov et al., 1991). Per altra banda, la inhibició d'ANT per atractilat induïx l'obertura del porus (Halestrap et al., 1997). Sabent que cada un dels dos inhibidors s'uneix específicament a una de les dues conformacions d'ANT, en un primer moment es va considerar que ANT era un element estructural o regulador del porus. Aquest model es basa en què la CypD s'uneix a ANT i per efecte del  $\text{Ca}^{2+}$  té lloc un canvi conformacional en cadena de les diferents proteïnes integrants del porus que conduiria a la seva obertura (Halestrap and Brenner, 2003). A més, també s'ha demostrat *in vitro* que l'ANT purificat i reconstituït és capaç de formar porus a elevades concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brustovetsky and Klingenberg, 1996) i que la probabilitat d'obertura d'aquests canals augmenta en les situacions on es produeix un increment del potencial de membrana per efecte de l'estrès oxidatiu i per la presència de la CypD (Brustovetsky et al., 2002). Emperò, recentment s'ha posat en dubte aquest paper essencial de l'ANT en la formació de l'mPTP, ja que s'ha vist que en mitocondris mancats d'ANT, l'mPTP continua sent sensible a la ciclosporina A, la qual és un inhibidor del porus gràcies a la seva unió a la CypD, impedit el seu canvi conformacional vehiculat pel  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la calcineurina (Kokoszka et al., 2004). Tanmateix, l'mPTP en aquests mitocondris és insensible als lligands d'ANT i requereix unes concentracions molt més elevades de  $\text{Ca}^{2+}$  que en condicions normals per a induir l'obertura del porus. Per tant, semblaria que ANT no és un component essencial de l'mPTP i que és prescindible per a la inducció de certes vies apoptòtiques dependents de l'activitat del porus. Tot i això, ANT continua tenint un paper essencial en la regulació de l'mPTP a través de la modulació de la sensibilitat del porus a la seva activació pel  $\text{Ca}^{2+}$  i pels lligands de la pròpia ANT. Aquest model alternatiu de l'estructura del porus

apuntaria cap al transportador mitocondrial de fosfat (PiC) com a component integrant de l'mPTP en la MMI (Leung et al., 2008). En aquest model existiria una interacció física de PiC amb ANT a la MMI i l'obertura del porus dependria de la conformació en què es trobés ANT (*m* o *d*) (Kokoszka et al., 2004) i de l'activitat peptidil-prolil cis-trans isomerasa de la CypD (Basso et al., 2005) (Revisar figura 4).

### *Modificacions i interaccions de la proteïna ANT que modulen la seva activitat*

A part de la regulació transcripcional de les diferents isoformes d'ANT (com veurem més endavant), la proteïna també pot estar sotmesa a modificacions postraduccionals. Les modificacions postraduccionals són canvis químics que tenen lloc en una proteïna un cop ha estat sintetitzada i que poden modular la seva activitat. Aquests canvis poden consistir en l'addició d'un grup funcional químic, el canvi de la naturalesa química d'un aminoàcid (conversió d'un aminoàcid), canvis estructurals de la proteïna, la pèrdua d'una part del polipèptid o l'addició d'altres proteïnes. En el cas d'ANT, s'han descrit diverses modificacions postraduccionals, bàsicament per l'addició d'un grup funcional, així com interaccions (no permanents) de la proteïna ANT amb altres proteïnes o molècules químiques que modulen la seva activitat. Les principals modificacions per addició de grups funcionals descrites són la glutationilació (Queiroga et al., 2010), la carbonilació (Yan and Sohal, 1998), la fosforilació (Feng et al., 2010), la modificació de grups tiol (McStay et al., 2002), l'alquilació (Boulay and Vignais, 1984), la nitroalquilació (Nadtochiy et al., 2012) i l'acilació (Rasmussen et al., 1993). Respecte a les interaccions que modifiquen l'activitat d'ANT, trobem que ANT interacciona amb la cardiolipina (Beyer and Klingenberg, 1985; Hoffmann et al., 1994), la VDAC (Das et al., 2008), el coenzim A (Cione et al., 2010), l'àcid retinoic (Notario et al., 2003; Zamora et al., 2006), l'NF- $\kappa$ B (Zamora et al., 2004b), l'MT1-MMP (Radichev et al., 2009), l'adenilat kinasa 4 (Liu et al., 2009),



## Introducció

la creatina kinasa (Schlattner et al., 2006), la proteïna tau (Atlante et al., 2008) i la proteïna Vpr (Deniaud et al., 2004).

## II.2 Isoformes ANT

Com hem vist, els transportadors d'ADP/ATP són components clau en les cèl·lules eucariotes. Aquests sistemes de transport s'han descrit en tres tipus principals d'òrgànuls i cèl·lules: els mitocondris, els plastidis i els paràsits intracel·lulars obligats. Estudis filogenètics suggereixen que el sistema bioenergètic present en els mitocondris prové d'un ancestre dels  $\alpha$ -proteobacteris (Sicheritz-Ponten et al., 1998). ANT comparteix una elevada homologia amb un gran nombre de transportadors mitocondrials, els quals deriven, mitjançant processos de duplicació gènica o genòmica, d'una proteïna transportadora ancestral amb una àmplia especificitat de substrat (Runswick et al., 1987).

Una de les característiques de l'ANT és l'existència de diverses isoformes codificades per gens diferents. Degut a la seva importància funcional, els ANTs es troben en tots els organismes eucariotes. En la present tesi doctoral s'ha treballat amb les isoformes de ratolí i humanes, pel que en aquesta introducció només es farà un repàs als ANTs d'aquests dos organismes. Tanmateix, no es poden obviar els estudis realitzats en llevats, en els quals han estat claus per a la descripció dels mecanismes de regulació gènica de les diferents isoformes.

### II.2.1 ANT en llevats

Gràcies a l'elevada taxa de proliferació del *Saccharomyces cerevisiae* (temps de duplicació aproximat de dues hores), els llevats han estat utilitzats àmpliament en estudis de manipulació gènica i han estat clau per a l'estudi de l'estructura i la funció dels ANTs. Els llevats contenen tres gens paràlegs que

codifiquen per a transportadors d'ADP/ATP: AAC1 (Adrian et al., 1986), AAC2 (Lawson and Douglas, 1988) i AAC3 (Kolarov et al., 1990) (de l'anglès, *ADP/ATP carriers*).

D'una forma interessant, en condicions anaeròbiques el transport mitocondrial de nucleòtids d'adenina és essencial per al creixement dels llevats (Drgon et al., 1991). La raó d'aquesta dependència en AAC és que, malgrat els llevats puguin realitzar la fermentació i no depenguin de l'ATP produït per fosforilació oxidativa, el potencial elèctric que el sistema OXPHOS genera sí és vital per al funcionament mitocondrial ja que, per exemple, la importació de proteïnes sintetitzades en el citosol depenen del  $\Delta\Psi_m$  de la MMI (Gasser et al., 1982; Schleyer et al., 1982). A part del bombeig de protons associat al transport electrònic de la cadena respiratòria, que és el sistema típic d'energitzar la MMI en situacions aeròbiques, existeixen uns altres dos mecanismes alternatius per al manteniment del potencial quan la cadena respiratòria no funciona, com en el cas d'una situació d'anaerobiosi. Aquests dos sistemes són el bombeig de protons acoblat a la hidròlisi de l'ATP realitzat per la  $F_1F_0$ -ATPasa, i el bescanvi d'ADP<sup>3-</sup> mitocondrial, generat per l'ATPasa, per ATP<sup>4-</sup> citosòlic, que alhora subministra nou substrat a l'ATPasa (Giraud and Velours, 1997; Chinopoulos et al., 2010). A més, la disponibilitat d'ATP en el mitocondri és imprescindible per al correcte funcionament cel·lular i per a la biogènesi de l'òrganul. Per tal de mantenir-se la viabilitat de les cèl·lules, es necessita com a mínim l'activitat d'un dels tres sistemes de generació de potencial.

AAC1, tot i tenir una expressió constitutiva en condicions aeròbiques, presenta uns nivells de transcripció molt baixos. Aquesta expressió es troba reprimida en situacions anaeròbiques (Gavurnikova et al., 1996). AAC2 és el transportador majoritari en llevats en creixement en condicions aeròbiques i també és regulat positivament per l'oxigen (Betina et al., 1995). En canvi, AAC3 només s'expressa en condicions anaeròbiques (Sabova et al., 1993). Per tant, l'oxigen és un potent regulador dels gens AAC en llevats, però la forma en què ho fa varia entre ells. Així, la influència de l'oxigen en la transcripció d'AAC1, a diferència

## Introducció

d'AAC2 i AAC3, és independent d'hemo o de factors de transcripció dependents d'hemo, i sembla que es realitza a través d'un repressor anaeròbic (encara no identificat) (Gavurnikova et al., 1996). Per altra banda, l'expressió del gen AAC2, sí depèn del grup hemo i d'HAP2, HAP3, HAP4 i ABT1, que són factors de transcripció implicats en la regulació de molts gens nuclears que codifiquen per proteïnes mitocondrials. A més, AAC2 és regulat negativament per la glucosa, indicant que la seva expressió també depèn del tipus de font de carboni (Betina et al., 1995). Finalment, i a diferència d'AAC1 i AAC2, l'expressió d'AAC3 és reprimida per l'oxigen a través del repressor transcripcional ROX1, ja que l'expressió d'aquest factor depèn d'hemo i, per tant, d'oxigen (Lowry and Zitomer, 1984; Sabova et al., 1993). Per tant, la hipòtesi que existeixin diferències funcionals (Smith and Thorsness, 2008) entre les tres isoformes d'AAC que permetin el bescanvi de nucleòtids en un o altre sentit depenent de les condicions és plausible i, en conseqüència, que també existeixin diferències en la regulació de la seva expressió. Així, mentre que AAC2 seria la isoforma encarregada de realitzar el bescanvi de l'ATP mitocondrial per l'ADP citosòlic en condicions aeròbiques, AAC3 seria capaç de realitzar el transport revers, important ATP al mitocondri per tal de mantenir la viabilitat funcional de l'òrganul.

### II.2.2 ANT en humans

A part dels estudis sobre els gens ANT realitzats en llevats, també s'han identificat i clonat els gens ANT en bovins (identificant-ne 3 isoformes), humans (4 isoformes), i rata i ratolí (3 isoformes). Totes aquestes espècies tenen múltiples isoformes ANT amb la característica comú que l'estructura gènica es troba altament conservada, amb un elevat grau d'identitat entre homòlegs (interespecíficament) i paràlegs (intraespecíficament). Així, tant les proteïnes hANT1, hANT2 i hANT3 humanes com mANT1 i mANT2 de ratolí són codificades per gens formats per 4 exons separats per 3 introns (Levy et al., 2000), mentre que els gens d'ANT4 estan estructurats en 6 exons (Brower et al., 2007). Les principals

característiques de les diferents isoformes ANT humanes són una certa especificitat en l'expressió tissular (Lunardi et al., 1992; Doerner et al., 1997) i que la regulació diferencial d'aquesta expressió depèn de la capacitat proliferativa del teixit i/o del tipus de metabolisme energètic que aquest presenti (glucòlisi o fosforilació oxidativa) (Lunardi and Attardi, 1991; Palmieri and Pierri, 2010).

### *hANT1*

El gen SLC25A4, que codifica l'hANT1 humà, es troba localitzat en el cromosoma 4 (4q35) (Li et al., 1989; Cozens et al., 1989; Wijmenga et al., 1993). La distribució tissular en humans de la proteïna hANT1 es limita majoritàriament a cor i múscul esquelètic i, en menor quantitat, a cervell (Stepien et al., 1992) i fetge perinatal (Grado et al., 1998). Pel que fa a la regulació de la seva expressió, el promotor d'hANT1 conté un tàndem TATA-CCAAT, una caixa OXBOX, responsable teòric de la seva regulació específica en teixits oxidatius (Li et al., 1990), i una caixa REBOX, que sembla modular l'activitat de l'OXBOX en resposta a canvis ambientals i hormonals, constituint un mecanisme d'adaptació del metabolisme energètic a les necessitats ambientals i del desenvolupament (Chung et al., 1992) (Figura 10).

La sobreexpressió d'hANT1 en cèl·lules en cultiu té un efecte dominant en la inducció de l'apoptosi dependent de mitocondri. Aquesta inducció per hANT1 es caracteritza per un potent alliberament del citocrom c i de l'activació de les caspases 9 i 3 (Bauer et al., 1999) i per una disminució en l'expressió de gens antiapoptòtics, produïda pel segrest del factor de transcripció NF- $\kappa$ B a mitocondri per hANT1 (Zamora et al., 2004b). A més, la sobreexpressió d'hANT1 en cardiomiòcits també induïx significativament l'apoptosi, amb una disminució de l'activitat NF- $\kappa$ B, AKT i Bcl-XL, una despolarització del  $\Delta\Psi_m$  i un augment de l'expressió de Bax (Baines and Molkentin, 2009). Fins i tot, aquesta capacitat d'hANT1 per induir apoptosi és tan potent, que la seva sobreexpressió en tumors introduïts en ratolins *nude* produeix una regressió tumoral (Jang et al., 2008a). En

## Introducció

aquest mateix sentit, s'ha vist com un augment de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  en cor durant un episodi d'isquèmia, redueix la tolerància als processos d'anòxia-reoxigenació i disminueix la recuperació de la contractibilitat posterior al fenomen d'isquèmia-reperfusió. Aquest efecte de PGC-1 $\alpha$  tindria lloc a través d'ANT1, l'expressió del qual s'indueix per PGC-1 $\alpha$  (Lynn et al., 2010).

També s'ha descrit que la deficiència d'hANT1 en neurones incrementa la resistència a l'apoptosi davant un estrès excitotòxic, reforçant aquest paper proapoptòtic d'hANT1 (Lee et al., 2009). En aquest cas, els autors proposen que la resistència a l'apoptosi en astròcits per la deficiència en hANT1 seria a través d'una disminució de la conductància de protons, una de les funcions claus per a la viabilitat cel·lular que també duu a terme ANT (Brand et al., 2005). Emperò, també han aparegut dades que constaten que un silenciament d'hANT1 en cèl·lules de glioblastoma humà induïx estrès oxidatiu i apoptosi (Lena et al., 2010). En aquesta mateixa línia d'atribuir un paper antiapoptòtic a hANT1, també s'ha descrit que un augment de l'activitat translocasa d'hANT1 en endoteli induïda per una sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  evita l'apoptosi en aquestes cèl·lules, atribuint-li un possible paper en la prevenció de l'aterosclerosi (Won et al., 2010).

Per tant, tot i que el primer paper que se li havia atribuït a hANT1 en el camp de l'apoptosi era el d'actuar com un inductor, també existeixen dades que li atribueixen un efecte protector. Aquesta dualitat en l'activitat d'hANT1 depèn estretament del teixit d'estudi.

## *hANT2*

El gen que codifica per la isoforma hANT2 humana és l'SLC25A5, situat en el cromosoma X (Xq24-q26) (Ku et al., 1990). Comparteix un 78% d'identitat amb el gen de l'hANT1 (SLC25A4) i l'homologia entre les dues proteïnes és del 84%

(Levy et al., 2000). Originàriament es va identificar en fibroblasts humans com un transportador ADP/ATP regulat pel creixement cel·lular diferent al transportador present en cor (Battini et al., 1987). Així, hANT2 és pràcticament indetectable en teixits madurs (Schiebel et al., 1994), mentre que la seva expressió és molt important en teixits amb elevada renovació cel·lular o en cèl·lules proliferants, com és el cas dels teixits en desenvolupament o tumors (Lunardi et al., 1992; Stepien et al., 1992; Le Bras M. et al., 2006).

L'expressió del gen d'hANT2 és induïble. El promotor d'aquest gen conté, a part d'una caixa TATA, elements Sp1, els quals s'han descrit com a reguladors de l'expressió de gens en les primeres etapes del desenvolupament d'un organisme. Dos d'aquests elements Sp1, denominats caixes A i B (Figura 10), es troben en la regió proximal del promotor, i semblen ser els responsables de l'activació de la transcripció d'hANT2. Un tercer element Sp1, la caixa C, que es troba adjacent a l'inici de transcripció actua com un inhibidor de l'expressió (Li et al., 1996a; Luciakova et al., 2000; Zaid et al., 2001). Aquests elements Sp1 també se'ls ha identificat en la regulació de diversos gens que participen de la fosforilació oxidativa en mamífers, com el citocrom  $c_1$  o la subunitat  $\beta$  de la  $F_1$ -ATPasa (Zaid et al., 1999). En el cas d'hANT2, l'activitat d'Sp1 també depèn de l'estructura de la cromatina, ja que la hipocetilació inhibeix l'expressió mentre que la seva hiperacetilació l'activa (Hodny et al., 2000). A més, el lloc d'unió AP-2 actuaria com un intensificador de l'activació de la transcripció per Sp1 (Li et al., 1999). Un major aprofundiment en la caracterització del promotor també va revelar l'existència de dues regions essencials per al silenciament (Barath et al., 1999a), anomenades Go-1 i Go-2. Aquestes caixes són llocs d'unió del factor NF-1, el qual s'hi uneix quan les cèl·lules es troben en estat de quiescència, reprimint l'expressió gènica d'hANT2 en aquestes condicions (Luciakova et al., 2003; Barath et al., 2004). En aquest sistema de repressió d'hANT2 en cèl·lules quiescents també hi participen proteïnes Smad, que són factors de transcripció transductors del senyal de TGF- $\beta$  (Luciakova et al., 2008).

## Introducció

Finalment també s'ha identificat un altre element inhibidor, el GRBOX (*glycolysis regulated box*), el qual és homòleg a l'element Rox1 de llevats (Giraud et al., 1998). La funció que se li ha atribuït és la de bloquejar l'expressió d'hANT2 en teixits madurs i en situacions on no es requereixi la importació a mitocondri d'ATP d'origen glucolític. Concretament, degut a què l'expressió d'hANT2 és majoritària en cèl·lules tumorals i que aquestes obtenen l'energia principalment de la glucòlisi, s'ha considerat que hANT2 seria la isoforma responsable de realitzar el transport revers d'ATP per tal de mantenir la funcionalitat del mitocondri, essencialment el  $\Delta\Psi_m$  (Chevrollier et al., 2005), quan el ràpid creixement o l'anaerobiosi limita la producció d'ATP (Giraud and Velours, 1997), tal i com passa en llevats fermentatius. D'ençà d'aquestes observacions que constaten que l'expressió d'hANT2 depèn del creixement de la cèl·lula, es va proposar a hANT2 com un marcador de la proliferació cel·lular (Barath et al., 1999b).

Pel que fa a la participació d'hANT2 en l'apoptosi, des del moment en què es va descriure com la isoforma pròpia de cèl·lules i teixits en proliferació/desenvolupament i en tumors, sempre s'ha considerat hANT2 com una isoforma antiapoptòtica amb efectes citoprotectors. En aquest sentit, s'ha proposat un model en què hANT2, a part de ser fonamental per a la importació d'ATP en situacions de manca de producció d'ATP mitocondrial, podria interaccionar amb Bcl-2, estabilitzant les membranes mitocondrials i inhibint l'mPTP (Belzacq et al., 2003). Així, s'ha descrit que el silenciament d'hANT2 sensibilitza les cèl·lules a l'apoptosi induïda per Ionidamina (Le Bras M. et al., 2006) i que, fins i tot, la pròpia supressió d'hANT2 induïx apoptosi i inhibeix el creixement tumoral, tant *in vitro* com *in vivo* (Jang et al., 2008b) i la capacitat d'invasió de cèl·lules de càncer de mama (Jang et al., 2010a). A més, s'ha descrit també com hANT2 es troba sobreexpressada en molts càncers, sobretot els dependents d'hormones (Brenner et al., 2011) i com una proteïna que s'uneix a hANT2, C2orf18 (ANT2BP) és una de les responsables de la carcinogènesi pancreàtica, a través de la participació en processos de resistència a la hipòxia i a la quimioteràpia (Kashiwaya et al., 2009).

*hANT3*

L'expressió d'hANT3 és ubiqua i no depèn de l'estat de proliferació com hANT2 (Stepien et al., 1992). El grau d'identitat de la proteïna hANT3 amb hANT1 és del 84% i del 88% amb hANT2. El gen que codifica per hANT3 és l'SLC25A6, amb una homologia de la seqüència codificant del 78% amb els gens SLC25A4 i SLC25A5, i localitza en la regió pseudoautosomal del cromosoma X (Xp22.32) (Slim et al., 1993). El promotor d'hANT3 no conté elements TATA ni CCAAT, però sí múltiples elements Sp1 (Cozens et al., 1989) (Figura 10). A diferència de la resta de gens ANT, el promotor d'hANT3 no conté illes CpG, pel que els processos de metilació no semblarien estar involucrats en la regulació de l'expressió. El fet que el promotor no disposa d'elements de regulació específics encaixa amb el fet de la seva expressió ubiqua.

A nivell funcional, a part de la seva activitat translocasa, a hANT3 també se li ha atribuït un paper proapoptòtic com a hANT1. Primerament, el fet de tenir nombrosos elements Sp1 recolzaria aquesta activitat (Deniaud et al., 2006), ja que Sp1 inhibeix la progressió del cicle cel·lular en els estadis previs a l'apoptosi. A més, la sobreexpressió d'hANT3, a diferència de la d'hANT2, induïx apoptosi en cèl·lules en cultiu (Zamora et al., 2004a), per interacció amb l'mPTP, ja que l'efecte apoptòtic de la sobreexpressió d'hANT3 es pot evitar tant amb inhibidors del porus (CsA) com d'ANT (BA). També existeixen treballs en què proposen que l'efecte apoptòtic del TNF- $\alpha$  en cèl·lules MCF-7 (cèl·lules de càncer de mama) té lloc amb la participació indispensable d'hANT3 (Yang et al., 2007). Tanmateix, tal i com passa amb hANT1, existeixen dades que indiquen un paper protector d'hANT3 davant l'apoptosi. En cèl·lules Th, la IL-4 i l'IFN- $\gamma$  induïxen l'expressió d'hANT3 a través de vies dependents d'STAT (Jang and Lee, 2003) i, davant un tractament apoptòtic amb dexametasona, aquesta sobreexpressió d'hANT3 seria la responsable de la protecció, ja que el *knockout* d'hANT3 induïx apoptosi en cèl·lules Th i suprimeix l'efecte prosupervivència de la IL-4 (Jang and Lee, 2006). Per tant, igual que amb hANT1, també existeix certa controvèrsia en el rol específic d'hANT3 en la regulació de l'apoptosi.



## Introducció

### *hANT4*

*hANT4* és la isoforma de més recent descobriment. És codificada pel gen *SLC25A31*, localitzat en el cromosoma 4 (4q28.1) i la seva distribució tissular en humans es redueix a testicles (Dolce et al., 2005). El control tan estricte de la distribució tissular d'*hANT4* sembla dependre majoritàriament de l'estat de metilació del seu promotor, ja que en testicles es troba hipometilat mentre que en cèl·lules somàtiques està hipermetilat (Rodic et al., 2005), i de l'element E2F6, clau en el silenciament d'*hANT4* en teixits somàtics (Kehoe et al., 2008) (Figura 10).

El fet que la seva expressió estigui restringida a cèl·lules mare embrionàries i a cèl·lules germinals de ratolí, és a dir, cèl·lules en proliferació, es va considerar que *hANT4* havia de jugar un paper similar a *hANT2*, actuant com a protector de l'apoptosi. En aquest sentit, la sobreexpressió d'*hANT4* en cèl·lules tumorals inhibeix l'apoptosi mitocondrial, a través del control de la producció de ROS (Gallerne et al., 2010). A part d'aquest rol antiapoptòtic d'*hANT4*, la seva activitat és clau per a la supervivència dels espermatozoides, ja que seria responsable de regular el metabolisme energètic en aquestes cèl·lules, les qual depenen enormement de la glucòlisi per a cobrir les seves elevades necessitats d'ATP (Dupont and Stepien, 2011). A més, en totes aquelles cèl·lules que donaran lloc a espermatozoides Y i, per tant, que no disposen d'una dotació de cromosoma X, ni *hANT2* ni *hANT3* hi són presents, pel que *hANT4* seria la isoforma que assumiria l'activitat translocasa d'ANT (Brower et al., 2007).

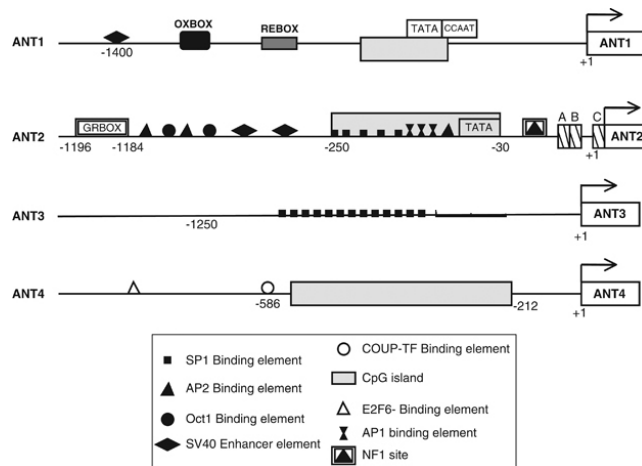


Figura 10. Esquema de l'organització dels promotors ANT1-ANT4 humans. (Brenner et al., 2011).

### II.2.3 ANT en ratolins

A diferència dels gens humans, en ratolí només s'han identificat tres gens que codifiquin per a transportadors de nucleòtids d'adenina: mANT1 (SLC25A4), mANT2 (SLC25A5) i mANT4 (SLC25A31). Per ara, no s'ha descrit cap gen homòleg a l'hANT3 humà. L'estructura d'aquests gens és igual a la dels gens humans, on mANT1 i mANT2 estan formats per 4 exons i mANT4 per 6 exons.

#### *mANT1*

El gen SLC25A4 comparteix un 91% d'identitat amb el seu homòleg humà i la proteïna resultant, mANT1, un 95% (Levy et al., 2000). mANT1 es troba localitzat al cromosoma 8 (Mills et al., 1996). L'mANT1 de ratolí mostra un patró d'expressió similar a l'hANT1 humà, expressant-se majoritàriament en cor i múscul esquelètic (Stepien et al., 1992). Pel que fa a l'organització del seu promotor, l'mANT1 disposa de caixes CCAAT i TATA com l'humà, però hi manquen els elements de resposta OXBOX i REBOX, pel que tot i tenir un perfil d'expressió

## Introducció

similar, els seus elements reguladors són diferents. Aquesta diferència és prou destacable, ja que posa en dubte la necessitat d'aquests dos elements en la regulació de l'expressió de l'hANT1 humà en cor i múscul, els quals són teixits amb una elevada dependència en l'energia mitocondrial i, per tant, de l'oxigen, el qual regula l'expressió d'hANT1 a través d'aquests dos elements (Levy et al., 2000).

La importància d'mANT1 en cor i múscul esquelètic és vital, ja que la seva manca en ratolins *knock-out* específics d'mANT1 comporta el desenvolupament de miopatia i cardiomiopatia mitocondrial i una severa intolerància a l'exercici, alteracions que van acompanyades d'alteracions en l'acoblament de la respiració i l'acidosi metabòlica (Graham et al., 1997; Palmieri et al., 2005). A més, la deficiència d'mANT1 en múscul esquelètic condueix a una regulació a l'alça de gens, nuclears i mitocondrials, que codifiquen per proteïnes mitocondrials, en un intent de compensació al mal funcionament mitocondrial per efecte de la manca d'activitat bescanviadora de nucleòtids (Murdock et al., 1999).

Per altra banda, a mANT1 també se li ha atribuït un possible paper en la modulació de la conductància de protons. En mitocondris de múscul de ratolí mancats d'mANT1, la conductància de protons es troba disminuïda mentre que la sobreexpressió d'mANT1 l'augmenta (Brand et al., 2005). Aquesta activitat d'mANT1 ja s'havia proposat quan es va relacionar la seva activitat amb UCP3 en el control del  $\Delta\Psi_m$  durant el procés de diferenciació del cor en rata (Skarka et al., 2003). També, s'ha descrit que l'absència d'UCP3 provoca una major activació de la conductància de protons vehiculada per mANT1 en múscul esquelètic de ratolins sota restricció calòrica (Bevilacqua et al., 2010).

*mANT2*

El grau d'identitat entre els gens SLC25A5 humà i de ratolí és d'un 78%, i l'homologia de les proteïnes mANT2 és del 84%. Respecte a l'mANT1 de ratolí, el seu grau d'identitat és del 78% a nivell gènic i del 85% entre proteïnes (Levy et al., 2000). mANT2 es localitza al cromosoma X (Ellison et al., 1996). En el cas d'mANT2, la comparació de la isoforma de ratolí amb la humana presenta més peculiaritats que mANT1 ja que, tot i compartir una gran homologia en l'organització dels seus promotors, el patró d'expressió d'ambdós és completament diferent, sent més semblant a la distribució de l'hANT3 humà. En ratolins, mANT2 s'expressa en grans quantitats en tots els teixits, a excepció del múscul esquelètic, on és pràcticament indetectable, mentre que l'hANT2 humà només s'expressa en cèl·lules en proliferació (Stepien et al., 1992). Malgrat aquestes diferències en la seva distribució tissular, el promotor d'mANT2 també conté una caixa TATA i tres elements Sp1, una seqüència AP-2 i un lloc de reconeixement de l'element GRBOX. Així, mentre que en humans s'ha proposat a GRBOX com un potent repressor transcripcional que s'allibera amb la inducció del gen (Giraud et al., 1998), en ratolins no pot actuar de la mateixa manera, ja que mANT2 s'hi expressa constitutivament. S'ha proposat que, possiblement, les diferències funcionals de l'element depenen de les seqüències adjacents al GRBOX, les quals no són iguals entre espècies, pel que és probable que aquest element per si sol sigui insuficient per a la repressió del gen (Barath et al., 1999a).

Un altre punt a destacar és que, sabent que l'mANT2 de ratolí s'expressa pràcticament en tots els teixits i que no existeix cap isoforma equivalent a l'hANT3 humà, és possible que mANT2 hagi adquirit una barreja de funcions pròpies de l'hANT2 i l'hANT3 humans, sent la isoforma capaç de realitzar tant el transport directe en condicions oxidatives com el recíproc d'ATP/ADP en condicions anaeròbiques (Giraud et al., 1998), permetent així l'adaptació metabòlica dels teixits davant les diferents condicions (Levy et al., 2000).

## Introducció

Per últim, a mANT2 també se li ha atribuït una activitat protectora davant l'envelliment i l'estrès oxidatiu en fetge, ja que s'ha vist que la seva expressió disminueix significativament en fetges de rates velles (2 anys) i en models de fibrosi hepàtica, mentre que la seva sobreexpressió en línies hepàtiques de ratolí confereix una major resistència a l'estrès oxidatiu, gràcies a la seva capacitat per a mantenir el  $\Delta\Psi_m$  i incrementar la producció d'ATP (Kim et al., 2012).

### *mANT4*

El gen SLC25A31 de ratolí localitza en el cromosoma 3 i la proteïna que codifica, mANT4, presenta un grau d'identitat del 88% amb l'hANT4 humana. La identitat d'AmNT4 amb les seves paràlegues és del 70% amb mANT1 i del 69% amb mANT2 (Brower et al., 2007). El patró d'expressió d'mANT4 és semblant al del seu homòleg humà, expressant-se únicament en cèl·lules mare embrionàries i en cèl·lules germinals del mascle (Rodic et al., 2005). La regulació transcripcional d'mANT4 en ratolins, igual que en humans, també depèn de l'element E2F6, el qual és essencial per a la seva repressió en teixits somàtics (Kehoe et al., 2008) i del grau de metilació de les illes CpG (Brower et al., 2009a). Així, mentre el gen d'mANT4 es troba hipometilat en testicles, l'illa CpG es troba hipermetilada en els teixits somàtics, on la seva expressió és indetectable. Curiosament, tots els gens ANT de ratolí contenen regions CpG, tot i que el seu estat de metilació és diferent entre ells. Els promotors d'mANT1 i mANT2 no mostren diferències en el patró de metilació en funció del teixit, malgrat que sí existeixen diferències d'expressió. En canvi, mANT4 sí es troba hipermetilat en els teixits on la seva expressió es troba inhibida. Per tant, la metilació de CpG, la qual regula l'estructura de la cromatina i l'accessibilitat de la maquinària transcripcional, només sembla tenir rellevància en la regulació de gens específics en cèl·lules germinals.

La importància d'mANT4 en el desenvolupament de les cèl·lules germinals sembla ser prou destacable, ja que el *knockout* específic d'mANT4 presenta una reducció significativa de la mida dels testicles (sense alteració dels altres teixits), una severa disminució en el número d'espermatòcits per l'augment de l'apoptosi, fet que els mascles deficients per mANT4 siguin estèrils (Brower et al., 2007). El mecanisme concret és que la deficiència d'mANT4 produeix una manca de la disponibilitat d'ATP, molt necessari en les primeres etapes de la meiosi, sobretot en la formació dels espermatòcits (Brower et al., 2009b). Aquesta dada obre la possibilitat de què mANT4 sigui una isoforma especialitzada i més eficient en el bescanvi d'ADP/ATP en un context hipòxic com és el que hi ha en el compartiment adluminal de l'epiteli seminífer, que és on té lloc l'espermatogènesi.



OBJECTIUS





## OBJECTIUS

L'existència de diferents isoformes d'ANT i que el patró d'expressió de cada una d'elles depèn del teixit i del seu estat de desenvolupament ens indica que existeix la possibilitat de què cada una de les isoformes duguin a terme activitats específiques en l'àmbit del metabolisme energètic i de la capacitat proliferativa de les cèl·lules depenent del context cel·lular en què es trobi. Partint d'aquesta base, el nostre primer objectiu va ser:

- 1. Establir si existeix una relació específica de l'expressió de les isoformes d'ANT amb el metabolisme energètic i la capacitat proliferativa de diferents línies cel·lulars humanes i de ratolí.**

A continuació, sabent que existeixen diferències en la distribució de les isoformes d'acord amb el metabolisme de cada tipus cel·lular, ens vam plantejar el següent objectiu de treball:

- 2. Estudiar, mitjançant el silenciament per *short-hairpin* RNA o la sobreexpressió per transducció adenovírica, si canvis d'expressió de les isoformes d'ANT modifiquen el metabolisme cel·lular i la capacitat proliferativa de les cèl·lules.**

D'acord amb treballs previs del grup en els que es descriu el paper apoptòtic d'hANT1 i hANT3, però no el d'hANT2, vam aprofundir en:

- 3. Descriure, mitjançant la sobreexpressió per transducció adenovírica, l'activitat protectora de la isoforma hANT2 humana davant estímuls apoptòtics.**

## Objectius

Sabent de l'existència de diferències en la regulació de l'expressió de les isoformes d'ANT i tenint en compte que totes elles són proteïnes mitocondrials, ens vam plantejar:

- 4. Comprovar si PGC-1 $\alpha$ , coactivador transcripcional implicat en la regulació de la biogènesi mitocondrial, regula de forma diferencial l'expressió de les isoformes d'ANT i a través de quins factors de transcripció realitza aquesta activitat.**





## METODOLOGIA



# METODOLOGIA

## I. CULTIUS CEL·LULARS

Durant el present treball, els models experimentals s'han basat en estudis *in vitro* mitjançant la utilització de diferents línies cel·lulars, tant d'origen humà com murí, el que ens ha permès treballar en un context metabòlic únic dintre les característiques pròpies de cada espècie.

### I.1 Línies cel·lulars utilitzades

Les diferents línies cel·lulars utilitzades, en major o menor freqüència, són les següents:

**HeLa:** Cèl·lules epitel·lials humanes provinents de carcinoma de cèrvix. Les seves principals característiques són l'elevada taxa de proliferació i, degut al seu origen tumoral, un metabolisme bàsicament glucolític. El seu manteniment es realitza amb medi *Dulbecco's Modified Eagle's Media* (DMEM) (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen - Life Technologies) suplementat amb un 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS) (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen - Life Technologies) i un 1% de la barreja a parts iguals dels antibiòtics Penicil·lina i Estreptomicina (P/S) (GIBCO<sup>®</sup>, Invitrogen - Life Technologies).

**HepG2:** Hepatòcits humans provinents de carcinoma hepatocel·lular. També es tracta d'una línia força proliferativa tot i que manté un important metabolisme oxidatiu. El seu cultiu també es realitza amb DMEM més un 10% d'FBS i un 1% de P/S.

**C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>:** Línia cel·lular immortalitzada provinent de teixit muscular esquelètic de ratolí. S'ha utilitzat tant en forma de mioblasts com de miotubs, els quals són



## Metodologia

altament oxidatius. Per al creixement dels mioblasts s'ha utilitzat DMEM més un 10% d'FBS i un 1% de P/S. Per tal d'induir-ne la diferenciació, es deixen multiplicar els mioblasts fins a arribar a una confluència aproximada del 80%, moment en què es realitza un canvi de medi a DMEM més un 2% de *Horse Serum* (HS) (GIBCO®, Invitrogen - Life Technologies) i un 1% de P/S fins a obtenir els miotubs.

**HIB-1B:** Línia cel·lular obtinguda d'hibernomes de ratolí, que són tumors de teixit adipós marró de ratolins transgènics que expressen l'antigen T del virus SV40 de forma teixit-específica, ja que està regulat pel promotor del gen  $\alpha P2$ . En el nostre cas, només s'han utilitzat en la seva forma indiferenciada o preadipocitària, els quals presenten una morfologia típica dels fibroblasts. Per al seu manteniment s'utilitza DMEM:F12 (GIBCO®, Invitrogen - Life Technologies) més un 10% d'FBS inactivat i un 1% de P/S. La inactivació del sèrum consisteix en escalfar-lo a 56 °C durant 30 minuts per tal de destruir-ne el sistema del complement i evitar-ne una possible activació que conduiria a la lisi cel·lular.

**3T3-L1:** Línia cel·lular derivada de cèl·lules 3T3 (línia immortalitzada de fibroblasts embrionics de ratolí), amb una morfologia típicament fibroblàstica i amb la capacitat de diferenciar-se a adipòcits blancs per efecte de diversos compostos. El manteniment dels fibroblasts es realitza amb DMEM més 10% d'FBS inactivat i 1% de P/S. Per a induir la diferenciació, es deixen créixer els fibroblasts fins a un estat post-confluent (aproximadament uns 2 dies després d'assolir la confluència) i es canvia el medi pel medi de manteniment suplementat amb 0.5 mM d'isobutilmetilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich Co.), 0.25  $\mu$ M de dexametasona (Sigma-Aldrich Co.) i 5  $\mu$ g/ml d'insulina (Sigma-Aldrich Co.), durant 48 hores. En aquest moment, es realitza un altre canvi de medi pel medi de manteniment però només suplementat amb 5  $\mu$ g/ml d'insulina durant 48 hores més, quan es realitzarà un canvi de medi definitiu pel de manteniment durant un mínim de 48 hores més (el grau de diferenciació dels adipòcits, determinat per l'acumulació de lípids, dependrà del número de dies que es mantinguin els adipòcits en aquest medi).

**RAW 264.7:** Línia cel·lular de macròfags obtinguda a partir de tumors induïts pel retrovirus de la leucèmia murina d'Abelson (A-MuLV) en ratolins adults BALB/c. El seu creixement es duu a terme amb medi *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) més 10% d'FBS inactivat i 1% P/S. Per a realitzar els experiments, les cèl·lules sembrades es fan créixer amb RPMI 1640 i un 10% d'FBS però sense antibiòtics i, 12 hores abans d'utilitzar les cèl·lules, s'ha de fer una depleció de sèrum, on es compensarà la font d'aminoàcids complementant el medi RPMI 1640 amb un 0.05% d'albumina sèrica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Co.).

## 1.2 Manteniment i manipulació dels cultius cel·lulars

En general, els cultius cel·lulars s'han mantingut en incubadors de camisa d'aigua amb sistema de filtrat d'aire HEPA (NuAire o Forma Scientific), capaços de mantenir de forma constant els nivells d'humitat relativa, CO<sub>2</sub> i temperatura al 90%, 5% i 37 °C, respectivament. Només en el cas de la línia 3T3-L1 s'ha treballat amb la particularitat de mantenir el CO<sub>2</sub> al 7%, ja que s'ha observat una millor diferenciació dels adipòcits en aquestes condicions. La manipulació de les cèl·lules (en tot cas i extensible a la resta de protocols experimentals que han implicat l'ús de cultius) sempre s'ha realitzat en una campana de flux laminar amb filtrat d'aire HEPA (Telstar o Cytair) per tal de garantir-ne l'esterilitat de la zona de treball. Així mateix, tot el material utilitzat també ha de ser totalment estèril.

### 1.2.1 Descongelació

Per a iniciar el cultiu d'una línia cel·lular, normalment s'ha partit d'un vial amb el número de subcultiu més baix possible congelat en N<sub>2</sub> líquid. Es descongela per xoc tèrmic en un bany a 37 °C el més ràpid possible per tal d'evitar al màxim els efectes citotòxics del DMSO present en el medi de

## Metodologia

congelació i diluir-ho amb 10 ml del medi adient per al tipus cel·lular en un tub de centrifugació. A continuació, centrifugar a 1200 rpm durant 4 minuts. Retirar cuidadosament mitjançant aspiració el medi sobrenedant, el qual conté les restes de DMSO, i resuspendre el sediment de cèl·lules amb 10 ml de medi i dispensar-ho en una placa o flascó.

### 1.2.2 Subcultiu

El subcultiu consisteix en la transferència d'una petita part de la població cel·lular subconfluent d'un cultiu a un altre suport de cultiu amb medi fresc per tal de mantenir la viabilitat de la població. En el nostre cas, sempre s'ha treballat amb línies cel·lulars adherents cultivades en plaques de 100 mm de diàmetre (7854 mm<sup>2</sup> d'àrea de creixement) o flascons de 7500 mm<sup>2</sup>, pel que el següent procediment ha estat comú per a totes elles. En el cas d'haver necessitat treballar amb altres superfícies, s'ha realitzat un escalat proporcional als volums que s'indiquen.

#### *Procediment*

- Retirar el medi del cultiu per aspiració.
- Rentar la monocapa de cèl·lules afegint suament 10 ml de tampó *Phosphate Buffered Saline* o PBS 1x (NaCl 136 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM a pH 7.4) i retirar-lo per aspiració.
- Afegir 1 ml de Tripsina 0.05% - EDTA 1x (GIBCO®, Invitrogen - Life Technologies) temperada prèviament a 37°C i retornar la placa a l'incubador a 37 °C durant un parell de minuts per a permetre l'activitat proteolítica de les molècules d'adhesió cel·lular (MAC) i poder dissociar les cèl·lules entre elles i de la superfície.
- Un cop s'observi que les cèl·lules han començat a desenganxar-se (procés que es pot facilitar mitjançant suaus cops al lateral de la placa)

inactivar l'activitat de la tripsina afegint 10 ml del medi corresponent (suplementat amb FBS).

- D'aquesta suspensió, agafar un petit volum i afegir-lo al volum necessari de medi fresc fins a un total de 10 ml (normalment es realitza un subcultiu 1/10) i dispensar-ho en una nova placa o flascó, que ha d'estar correctament identificat indicant el nom del manipulador, de la línia cel·lular, el número de subcultiu i la data de realització.

### 1.2.3 Congelació

Amb la finalitat de crear un estoc propi, a partir del cultiu de cèl·lules que s'han descongelat es passa a congelar un cert número de vials o criotubs.

Un cop el cultiu arriba a un estat proper a la confluència, tripsinitzar i obtenir una suspensió de cèl·lules (és el mateix procediment utilitzat per a realitzar el subcultiu), de la qual es realitza un comptatge per tal de trobar la concentració cel·lular de la suspensió. Breument, es barregen 10  $\mu$ l de suspensió amb 10  $\mu$ l de Trypan Blue (Invitrogen - Life Technologies) diluït al 10% en PBS 1x i es dispensen 10  $\mu$ l de la barreja en la cambra d'un portaobjectes especial per a la realització del comptatge automatitzat mitjançant el sistema *Countess® Automated Cell Counter* (Invitrogen - Life Technologies). Seguidament, centrifugar la suspensió cel·lular i resuspendre el sediment amb el volum adient de medi de congelació (DMEM 50%, FBS 40% i DMSO 10%) per a disposar aproximadament d'un milió de cèl·lules per mil·lilitre, que es el volum que es distribueix per vial. Aquests vials es col·loquen dins un tanc d'isopropanol en un congelador a -80 °C, sistema que garanteix el descens gradual de la temperatura dels vials i evita la formació de cristalls que lisarien les cèl·lules. Al cap de 24 hores, passar els criotubs del congelador al tanc de N<sub>2</sub> per a la seva conservació a llarg temps.

### 1.2.4 Sembra de cèl·lules

A l'hora de realitzar els experiments, a partir de la placa de manteniment es sembraran, en el format adient per a cada cas (generalment, plaques multipou de 6 o 12 pous), el número de cèl·lules necessari en cada cas. Així, es procedeix a tripsinitzar les cèl·lules, realitzar el seu comptatge i agafar el volum que contingui el número de cèl·lules a sembrar, a la densitat estipulada, el número plaques multipou de l'experiment, i portar-lo fins al volum total necessari de sembra (el qual dependrà del format de placa i sempre d'acord amb el fabricant) amb el medi adient al tipus cel·lular. D'aquest pool, es distribueix el volum corresponent per pou. Les densitats de sembra normalment han estat de  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules/pou per a les plaques de 6 pous i  $1 \cdot 10^4$  cèl·lules/pou per a les plaques de 12 pous.

## II. TRANSDUCCIÓ ADENOVÍRICA

Amb la finalitat d'aconseguir l'expressió de gens exògens en cèl·lules en cultiu, una de les estratègies adoptades ha estat la infecció mitjançant vectors adenovírics, el qual és un sistema senzill i d'elevada eficiència per a la introducció de material genètic dins la cèl·lula. Aquest procediment té l'inconvenient de que només s'aconsegueix una expressió transitòria del gen exògen, ja que els vectors adenovírics no tenen la capacitat d'integrar el seu material genètic en el genoma de l'hoste, fet que no permet la replicació del plasmidi durant les successives divisions cel·lulars i conduirà a la progressiva desaparició del vector. Tot i així, és un sistema que permet un temps d'expressió exògena més llarg, i més eficient, que la transfecció transitòria de material genètic nu. El principal factor a tenir en compte per aconseguir una bona reproductibilitat entre experiments és establir el número de partícules víriques per cèl·lula, o MOI (*Multiplicity of Infection*), que ens garanteixi l'obtenció un grau d'inducció del gen exògen satisfactori. Aquesta determinació es pot realitzar quantificant la inducció del gen tant a nivell d'expressió de l'mRNA per *Real-time PCR* quantitativa com a nivell de proteïna per *western blot*.

## II.1 Procediments de transducció

En el present treball s'han utilitzat dos procediments diferents de transducció adenovírica en funció de la línia cel·lular a infectar:

A) Transducció de cèl·lules HeLa, miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i fibroblasts HIB-1B:

- Previ a la transducció, s'hauran sembrat el número de cèl·lules de cada línia adient. En el cas de les cèl·lules HeLa i HIB-1B, se sembren 2·10<sup>5</sup> cèl·lules per pou en plaques de 6 pous (el número de pous ve determinat pel número de condicions experimentals i el número de rèpliques de cada una d'elles) i es deixen créixer unes 24 hores, per tal d'assolir un número aproximat de 4-5·10<sup>5</sup> cèl·lules/pou, dada que ens permetrà calcular la quantitat d'adenovirus per a assolir un determinat MOI d'infecció de la manera que s'indica a continuació:

$$\text{n}^{\circ} \text{ pous} \cdot \underbrace{\frac{\text{n}^{\circ} \text{ cèl·lules}}{\text{pou}}}_{\text{Densitat cel·lular}} \cdot \underbrace{\frac{\text{n}^{\circ} \text{ partícules víriques}}{\text{cèl·lula}}}_{\text{MOI}} \cdot \underbrace{\frac{\text{ml}}{\text{n}^{\circ} \text{ partícules víriques}}}_{\text{Titulació vírica}} = \text{Virus (ml)}$$

- En el cas dels miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, estimarem que, des del moment de sembra dels mioblasts fins a arribar a confluència i aconseguir la diferenciació a miotubs, disposarem d'unes 3·10<sup>5</sup> cèl·lules/pou.
- Barrejar, per cada un dels virus, la quantitat desitjada en 300 μl/pou de DMEM + 1% P/S temperat (el volum total vindrà determinat pel número de pous total que es volen infectar amb cada virus), que és el volum mínim per a cobrir la superfície de la monocapa cel·lular i garantir la màxima interacció de l'adenovirus amb els receptors de membrana de la cèl·lula que facilitaran la seva incorporació.
- Retirar el medi de cultiu amb el que han crescut les cèl·lules des de la seva sembra i rentar els pous amb PBS 1x.

## Metodologia

- Afegir la barreja de virus i medi (300  $\mu$ l/pou) i retornar les plaques a l'incubador a 37 °C durant 1 hora, tenint la precaució d'agitar-les horitzontalment de manera periòdica (4-5 vegades/hora).
- Afegir 200  $\mu$ l/pou de DMEM + 1% P/S temperat i retornar les plaques a l'incubador, mantenint l'agitació periòdica, durant 1 hora més.
- Afegir 1.5 ml/pou de DMEM + 1% P/S i 13,3% d'FBS (per a obtenir una concentració final del 10% d'FBS en els 2 ml de medi de cultiu per pou)
- Mantenir les cèl·lules a l'incubador durant el temps que s'estimi oportú per a l'expressió del gen exògen abans de continuar amb el disseny experimental desitjat (en el nostre cas, el temps que s'ha utilitzat normalment ha estat de 48 hores).

### B) Transducció d'adipòcits 3T3-L1:

- Com en el cas anterior, un cop es disposen dels adipòcits 3T3-L1 diferenciats, es calcula la quantitat de virus a utilitzar per a aconseguir el MOI desitjat tenint en compte que es disposen aproximadament de  $4 \cdot 10^5$  adipòcits/pou després de tot el procés de diferenciació.
- Barrejar, per cada un dels virus, la quantitat desitjada en 500  $\mu$ l/pou de DMEM + 1% P/S temperat més 0.5  $\mu$ g/ml de poli-L-Lisina. La poli-L-Lisina és un polipèptid catiònic format per una cadena d'L-Lisines que afavoreix la interacció de la partícula vírica als receptors cel·lulars i que es especialment útil en el cas de la transducció de línies cel·lulars que presenten certa resistència al procés, com són els adipòcits 3T3-L1.
- Retirar el medi de cultiu amb el que han crescut les cèl·lules des de la seva sembra i rentar els pous amb PBS 1x.
- Afegir la barreja de virus i medi (500  $\mu$ l/pou) i retornar les plaques a l'incubador a 37 °C durant 5 hores.
- Afegir 1.5 ml/pou de DMEM + 1% P/S i 13,3% d'FBS i mantenir les cèl·lules a l'incubador el temps oportú per a l'expressió del gen exògen.

## II.2 Adenovirus utilitzats

A) Produïts pel Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG-UAB):

- **Ad-GFP:** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió de la *Green Fluorescent Protein*.
- **Ad-ANT2:** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió de la isoforma 2 humana de l'*Adenine Nucleotide Translocase*.
- **Ad-ANT3:** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió de la isoforma 3 humana de l'*Adenine Nucleotide Translocase*.
- **Ad-PGC-1 $\alpha$ :** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió de la proteïna *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha*.
- **Ad-PPAR- $\alpha$ :** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió de la proteïna *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha*.

B) Produïts pel grup (Dr. Albert Giralt) a partir d'una cessió del Dr. Josep A. Villena del grup de Recerca en Metabolisme i Obesitat de l'Institut de recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebrón:

- **Ad-ERR- $\alpha$ :** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió de la proteïna *Estrogen Related Receptor Alpha*.
- **Ad-siERR- $\alpha$ :** Vector adenovíric portador d'un vector d'expressió d'un *short interference RNA* (siRNA) pel gen de l'ERR- $\alpha$ .

## III. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA

### III.1 Procediment de transfecció

Aquest mètode ha estat utilitzat principalment amb la finalitat d'introduir vectors amb construccions d'shRNA (*short-hairpin RNA*) per al silenciament gènic,



## Metodologia

tot i que excepcionalment també s'ha utilitzat per a l'expressió de gens exògens. Per a la transfecció transitòria de vectors d'expressió nus s'ha utilitzat el sistema *FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent* (Promega).

### *Procediment*

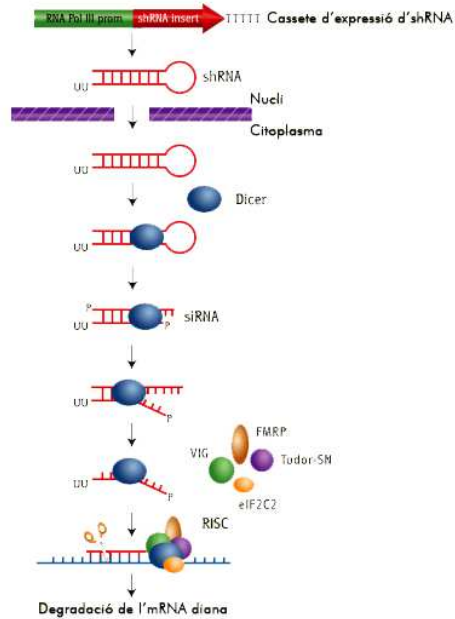
- Previ a la transfecció (normalment 24 hores abans) s'haurà preparat el cultiu sembrant la densitat de cèl·lules adient per al tipus de placa multipou utilitzat, per tal d'aconseguir una confluència del 50-80% al moment de la transfecció.
- Barrejar la quantitat adient de plasmidi/pou en el volum adequat de medi Opti-MEM<sup>®</sup> (Invitrogen - Life Technologies). En el nostre cas, les transfeccions normalment s'han dut a terme en plaques de 6 pous on s'hauran transfectat 2 µg de plasmidi en 100 µl de medi Opti-MEM per pou. Per a altres formats de placa, s'han adequat les quantitats seguint les indicacions del fabricant.
- Afegir la quantitat adient de *FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent* pel volum de barreja DNA-medi preparat a una relació de 5 µl del reactiu per 2 µg de DNA. Barrejar amb intensitat i incubar a temperatura ambient durant uns 20-30 minuts.
- Dispensar el volum adient de la barreja (100 µl/pou en placa de 6 pous) directament sobre el medi de cultiu. Prèviament, s'ha pogut renovar el medi de cultiu en què han estat creixent les cèl·lules fins al moment de realitzar la transfecció.
- Mantenir les cèl·lules a l'incubador durant el temps que s'estimi oportú per a l'expressió del vector abans de continuar amb el disseny experimental desitjat (en el nostre cas, el temps que s'ha utilitzat normalment ha estat de 48 hores).

*Observació:* Sempre i quan no interfereixi en qualsevol procediment posterior a la transfecció, s'afegeix un 5% respecte el total de DNA a transfectar, de vector pcDNA3.1-GFP, el que serveix com a control de l'eficiència de

transfecció mitjançant l'observació de les cèl·lules per microscòpia de fluorescència (punt XII).

### III.2 Silenciament gènic mitjançant shRNA

L'RNA d'interferència (RNAi) és la via que utilitza els siRNA (*short interfering RNA*) o els shRNA (*short hairpin RNA*) per a inactivar l'expressió de gens diana, ja que la presència de RNA de doble cadena o dsRNA (*double strand RNA*) indueix la degradació del RNA missatger complementari (Figura 11). En comparació amb els siRNA, els shRNA presenten avantatges en el temps de silenciament i en la forma d'introducció a les cèl·lules. Un cop dins les cèl·lules, els shRNA són transcrits, a partir del motlle de DNA, com una cadena senzilla d'RNA de 50 a 100 nucleòtids. Les regions complementàries es troben separades per un petit llaç o *loop* i són les responsables del plegament del transcrit sobre ell mateix, formant una petita forqueta (*short hairpin*) anàloga als microRNA naturals (McIntyre and Fanning, 2006). Aquests shRNA són reconeguts i processats a siRNA de doble cadena d'uns 21-23 nucleòtids per l'enzim Dicer, el qual és un membre de la família d'endonucleases específiques de dsRNA (Bernstein et al., 2001; Ketting et al., 2001). Cada un dels siRNA formats és incorporat pel complex enzimàtic RISC, el qual dirigirà el reconeixement de transcrits complementaris endògens per part d'aquests siRNA i la seva posterior degradació (Hammond et al., 2000; Nykanen et al., 2001).



**Figura 11. Mecanisme de funcionament dels shRNA.** Modificat a partir de l'esquema original del recurs online RNA Interference Review d'Invitrogen (Invitrogen – Life Technologies).

### III.2.1 Construcció dels vectors shRNA

Els diferents shRNA que s'han utilitzat durant el present treball s'han dissenyat i obtingut utilitzant el sistema *BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kit* (Invitrogen - Life Technologies). A continuació, es poden observar de forma esquemàtica els principals passos a seguir per a aconseguir un vector d'entrada pENTR™/U6 mitjançant aquest kit (Figura 12).

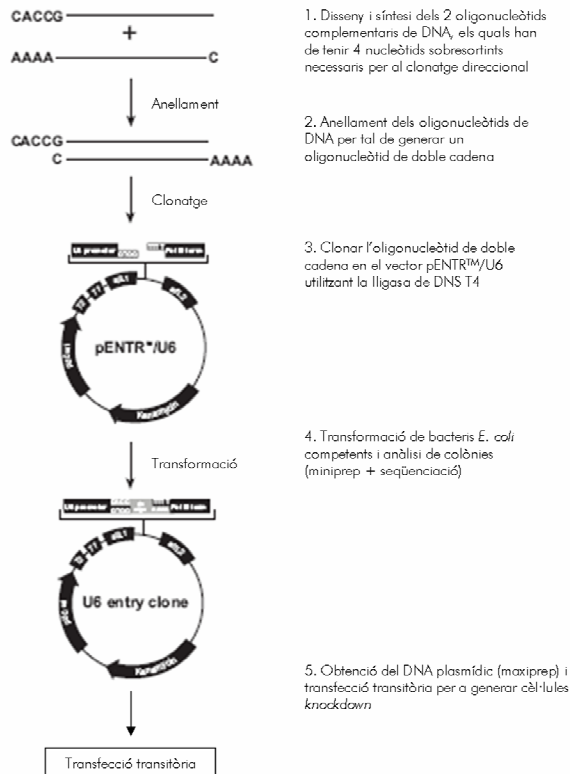


Figura 12. Esquema-resum de la construcció i obtenció dels shRNA. Modificat a partir de l'esquema original del manual *BLOCK-iT<sup>TM</sup> U6 RNAi Entry Vector Kit* d'Invitrogen - Life Technologies.

### III.2.2 shRNA utilitzats

Els shRNA que es detallen a continuació són els que s'han comprovat experimentalment que duen a terme el silenciament màxim del seu gen diana entre els diferents oligonucleòtids dissenyats.

- **shANTm**: És l'shRNA utilitzat com a control negatiu del sistema d'RNAi (*scramble*), ja que està sotmès al mateix processament que la resta d'shRNA però sense reconèixer cap mRNA complementari i, per tant, no produeix el silenciament de cap gen. La seva seqüència és la mateixa

que l'shANT2 humana però amb la variació de 4 nucleòtids  
CGGATCGCTACAATAAG.

- **shhANT1 (Hs)**: shRNA que reconeix la seqüència de l'mRNA de la isoforma 1 humana de l'Adenine Nucleotide Translocase ACAGATCAGTGCTGAGAAG (Le Bras M. et al., 2006).
- **shhANT2 (Hs)**: shRNA que reconeix la seqüència de l'mRNA de la isoforma 2 humana de l'Adenine Nucleotide Translocase CTGTTGCCGGGTTGACTTCC (seqüència pròpia).
- **shhANT3 (Hs)**: shRNA que reconeix la seqüència de l'mRNA de la isoforma 3 humana de l'Adenine Nucleotide Translocase CGCGACCTCCCTCTGCTTCG (seqüència pròpia).
- **shmANT1 (Mm)**: shRNA que reconeix la seqüència de l'mRNA de la isoforma 1 de ratolí de l'Adenine Nucleotide Translocase GGATCTTCCCAGCGAGAATT (seqüència pròpia).
- **shmANT2 (Mm)**: shRNA que reconeix la seqüència de l'mRNA de la isoforma 2 de ratolí de l'Adenine Nucleotide Translocase CAAAGGAACTGATATCATGT (seqüència pròpia).

### III.3 Expressió exògena de gens mitjançant la transfecció transitòria de plasmidis

Una altra forma d'induir l'expressió exògena de gens, diferent a la transducció adenovírica, és la transfecció transitòria de vectors d'expressió nus (o plasmidis). La transfecció transitòria, tal i com s'ha explicat prèviament, s'ha realitzat utilitzant el sistema *FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent* (Promega).

Les construccions que s'han utilitzat han estat:

- **pcDNA3.1**: Vector plasmídic buit (no té cap gen inserit). Actua com a control de transfecció, ja que per a la majoria de construccions s'utilitza aquest vector.
- **PGC-1 $\alpha$** : Vector d'expressió de la proteïna *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha*.
- **HIF-1 $\alpha$** : Vector d'expressió de la proteïna *Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit*.
- **SIRT-3**: Vector d'expressió de la proteïna *NAD-dependent deacetylase sirtuin-3*.
- **SIRT-6**: Vector d'expressió de la proteïna *NAD-dependent deacetylase sirtuin-6*.
- **ANT2**: Vector d'expressió de la isoforma 2 humana de l'*Adenine Nucleotide Translocase*.
- **ANT3**: Vector d'expressió de la isoforma 3 humana de l'*Adenine Nucleotide Translocase*.
- **NF- $\kappa$ B-Luc**: Vector d'expressió de la proteïna luciferasa de *Photinus pyralis* sota el control del promotor del gen que expressa la proteïna *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B). Aquest tipus de construcció és utilitzada per a quantificar, mitjançant l'activitat luciferasa, l'activitat transcripcional del promotor.
- **pRL-CMV-Renilla**: Vector d'expressió de la proteïna luciferasa de *Renilla reniformis*, el qual es co-transfecta amb un vector luciferasa i la seva activitat s'utilitza per a corregir l'activitat del promotor, ja que l'activitat de la luciferasa de *R. Reniformis* és constitucional i, per tant, només dependrà del grau de transfecció.

## IV. TRANSFORMACIÓ DE BACTERIS COMPETENTS, MINIPREP I MAXIPREP

Els experiments de transfecció transitòria de vectors d'expressió (tant els shRNA com els de gens exògens) requereixen una quantitat considerable de DNA plasmídic. Per a obtenir-lo, normalment es realitza una purificació a partir del creixement de bacteris competents transformats.

### IV.1 Transformació de bacteris competents

El mètode es basa en la introducció de DNA plasmídic en bacteris *Escherichia coli* competents, és a dir, capaços d'incorporar DNA exògen, mitjançant xoc tèrmic.

#### *Procediment*

- Descongelar 50  $\mu$ l d' *E. coli* competents per cada transformació, tenint en compte que sempre es realitza un control de transformació, que consisteix en realitzar tot el procediment de transformació sense presència de DNA.
- Afegir 1-10 ng de DNA (en un màxim de 5  $\mu$ l) i agitar intensament sense utilitzar vòrtex ni pipeta.
- Incubar les barreges en gel durant 20 minuts.
- Xoc tèrmic en un bany a 37 °C en agitació durant 5 minuts.
- Incubar les barreges en gel durant 2 minuts.
- Afegir 1 ml de medi LB-Lennox (*Lysogeny Broth-Lennox*; triptona 10 g/l, extracte de llevat 5 g/l, NaCl 5 g/l) suplementat amb MgSO<sub>4</sub> 20 mM.
- Incubar les barreges en un bany a 37 °C en agitació durant 45 minuts.
- Centrifugar a 2000 rpm durant 5 minuts.
- Retirar el sobrenedant i resuspendre el sediment de cèl·lules amb 200  $\mu$ l de medi LB-MgSO<sub>4</sub>.
- Sembrar, per extensió mitjançant nansa, la suspensió de cèl·lules transformades en plaques d' LB suplementat amb l'antibiòtic al qual els plasmidis utilitzats en la transformació porten el gen de resistència.

- Incubar a 37 °C durant la nit.
- A l'endemà (o en pocs dies si es guarden les plaques segellades a 4 °C), es realitza el cultiu d'una colònia aïllada de la placa en 2-3 ml de medi LB suplementat amb l'antibiòtic adient a 37°C en agitació durant unes 8-10 hores. Aquest cultiu servirà per a realitzar els glicerinars bacterians (que consisteix en barrejar, a parts iguals, un volum de creixement amb un volum de medi LB + glicerol (1:1) i congelar a -80 °C) i també, si s'escau, per a realitzar una miniprep per a obtenir DNA plasmídic per a comprovar que les colònies seleccionades han incorporat el plasmidi.

## IV.2 Miniprep i comprovació de la colònia

A partir d'una petita quantitat de creixement bacterià, es procedeix a la purificació de fins a uns 20 µg de DNA plasmídic, suficient per a realitzar una digestió i comprovar que la colònia seleccionada ha estat transformada. Per a la purificació s'ha utilitzat el sistema *QIAGEN® Plasmid Mini kit* (QIAGEN), que es bàsicament consisteix en una lisi alcalina dels bacteris i una unió del DNA plasmídic a una columna de resina d'intercanvi d'anions a baixes concentracions salines, la qual permet rentar aquests plasmidis de totes les impureses (RNA, proteïnes, molècules de baix pes molecular) amb tampons de concentració salina intermèdia i eluir amb un tampó d'alta concentració salina. L'elut es concentra i dessala mitjançant la seva precipitació amb isopropanol.

Per a comprovar que el DNA plasmídic obtingut és portador de l'insert d'interès, es realitza una digestió de 500 ng de DNA amb enzims de restricció (els quals s'escullen d'acord amb el mapa de restricció del plasmidi utilitzat) per tal d'alliberar l'insert i una electroforesi en gel d'agarosa (agarosa al 0.8% en TAE 1x - 85V) de la digestió per tal de separar els diferents fragments i poder visualitzar l'insert.



## Metodologia

En el cas de la preparació dels shRNA, també es va realitzar una seqüenciació del fragment per tal de comprovar que tot el procés ha funcionat correctament. Així, a partir del DNA plasmídic de la miniprep, es duu a terme una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilitzant el sistema *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) per tal de preparar les mostres per a la seva seqüenciació per part de la Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

### IV.3 Maxiprep

Una vegada es té la seguretat de què els glicerinat preparats contenen els bacteris transformats, es pot passar a realitzar una maxiprep per tal d'obtenir una quantitat suficient de plasmidi (fins a 500  $\mu$ g) per a poder realitzar les transfeccions transitòries. Les maxipreps es realitzen utilitzant el sistema *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN). Breument, el mètode consisteix en, a partir del cultiu previ d'una mica del glicerinat corresponent en 250ml de medi LB suplementat amb l'antibiòtic de selecció a 37 °C en agitació, obtenir un lisat bacterià i fer-lo passar per un filtre que retindrà el DNA plasmídic i així poder netejar-lo d'impureses mitjançant rentats, per a finalment eluir-lo i precipitar-lo amb isopropanol, obtenint un sediment de DNA que es reconstitueix en aigua. Un cop determinada la seva concentració utilitzant el *NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) (sistema utilitzat per a la determinació de qualsevol concentració d'àcids nucleics, tant DNA com RNA), aquest preparat ja està llest per a transfectar.

## V. PURIFICACIÓ D'RNA, RETROTRANSCRIPCIÓ I PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL

La utilització de la transfecció transitòria i de la transducció adenovírica com a mètodes de silenciament o d'expressió exògena de gens comporta que cada experiment realitzat impliqui verificar que l'objectiu que es persegueix s'hagi aconseguit i, així, poder validar les observacions obtingudes amb aquest. La quantificació de l'expressió gènica per PCR quantitativa a temps real (*Real-time qPCR*) és una eina molt útil per a realitzar aquestes comprovacions sistemàtiques. A més, també ens permet estudiar el comportament de l'expressió gènica en resposta a les diferents condicions experimentals plantejades.

### V.1 Purificació d'RNA

#### V.1.1 Purificació mitjançant fenol-cloroform

L'extracció mitjançant fenol-cloroform permet obtenir les fases corresponents al DNA, a l'RNA i a la proteïna. Aquest ha estat el mètode d'elecció per a l'extracció de l'RNA i DNA quan el material de partida han estat miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, ja que utilitzant *TriPure Isolation Reagent* (Roche) (amb el qual s'obté una lisi dels miotubs més eficient que amb el sistema de columnes) seguint les indicacions descrites per la casa comercial. El sistema es basa en la lisi cel·lular i desnaturalització de les nucleases endògenes, l'obtenció de les 3 fases per efecte del cloroform i, posterior obtenció del RNA a partir de la fase aquosa superior per precipitació amb isopropanol. Una vegada s'obté el DNA resuspès en aigua, s'elimina la possible contaminació amb DNA genòmic amb el sistema *DNA-free<sup>TM</sup> Kit, DNase Treatment and Removal Reagents* (Ambion<sup>®</sup> - Applied Biosystems) i posteriorment es determina la concentració d'RNA per NanoDrop.

### V.1.2 Purificació mitjançant columnes d'afinitat

Per a la purificació d'RNA a partir de la resta de línies cel·lulars descrites, s'ha optat per a utilitzar el kit *NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II* (Macherey-Nagel) d'acord amb les indicacions del protocol *Total RNA purification from cultured cells and tissue with NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II*. El sistema es basa en la lisi cel·lular mitjançant una solució rica amb agents caotròpics que evita la degradació de l'RNA durant el procés d'aïllament i crea les condicions adequades per a què l'RNA s'uneixi a la membrana de sílica. Un cop l'RNA ha quedat retingut a la membrana, es realitza un tractament amb DNasa *in situ* i diferents rentats per a eliminar els fragments de DNA genòmic i la resta de contaminants i, finalment, eluir l'RNA amb aigua.

### V.2 Retrotranscripció

La quantificació de l'expressió gènica mitjançant *real-time qPCR* es basa en determinar els nivells de DNA presents en la mostra. Per tal d'obtenir DNA proporcional als nivells de transcrits, el total dels RNA missatgers (mRNA), la quantitat específica dels quals serà proporcional a l'activitat transcripcional de cada un dels seus gens en el moment de realitzar la lisi cel·lular i extracció de l'RNA, així com la resta de l'RNA present (majoritàriament ribosòmic) s'ha de retrotranscriure a DNA còpia (cDNA). Aquest procediment consisteix en realitzar una PCR d'un únic cicle d'amplificació, on cada una de les molècules d'RNA serà utilitzada per la transcriptasa inversa com a motlle. Com a encebadors de la reacció, s'utilitzen hexàmers de composició aleatòria.

Per a la reacció de retrotranscripció s'utilitzen 500 ng d'RNA en un volum màxim de 7.7  $\mu$ l i una barreja dels següents elements del kit *MultiScribe<sup>™</sup> Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems) en un volum de 12.3  $\mu$ l:

- TaqMan RT Buffer 1x
- MgCl<sub>2</sub> 5.5 mM

- Barreja de deoxinucleòtids (dNTP) (500  $\mu$ M de cada dNTP)
- Random Hexamers 2.5  $\mu$ M
- Inhibidors d'RNases 0.4 U/ $\mu$ l
- MultiScribe Reverse Transcriptase 1.25 U/ $\mu$ l

*Observació:* Es prepara una barreja comú amb el volum suficient per al total de mostres a retrotranscriure.

Un cop preparada la reacció, es realitza la retrotranscripció amb el termociclador, els paràmetres de la qual són:

- Fase d'incubació: 10 minuts a 25 °C.
- Fase de còpia: 30 minuts a 48 °C.
- Fase d'inactivació de la transcriptasa inversa: 5 minuts a 95 °C.

### V.3 PCR quantitativa a temps real

La *real-time qPCR* és la tècnica amb la qual és pot quantificar a temps real el producte que es genera durant la reacció, gràcies a l'activitat d'un fluoròfor el qual emetrà una quantitat de fluorescència proporcional al producte específic present en cada moment i, que a la seva vegada, dependrà de la quantitat específica de cada un dels cDNA utilitzats com a motlle. Per a dur a terme aquesta PCR és necessari un termociclador proveït de sensors capaços de registrar la fluorescència emesa pel fluoròfor després d'haver estat alliberat del seu *quencher* per acció de la polimerasa *TaqMan*<sup>®</sup>. En el nostre cas utilitzem el *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), que admet realitzar la reacció en plaques de 96 pous.

La barreja de la reacció consta de:

- 10  $\mu$ l de *Platinum*<sup>®</sup> *qPCR Super-Mix-UDG with ROX* (Invitrogen - Life Technologies), que consta de 22 U/ml de la DNA polimerasa recombinant de *Thermus aquaticus* complexada amb l'anticòs

## Metodologia

*Platinum<sup>®</sup>Taq*, Tris-HCl 22 mM (pH 8.4), KCl 55 mM, MgCl<sub>2</sub> 165 mM i 200 μM de cada un dels dNTPs.

- 1 μl de *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays* (Invitrogen - Life Technologies) únic per cada gen que es vol mesurar ja que actuen com a encebadors específics així com a sonda marcada amb el fluoròfor.
- 8 μl aigua lliure d'RNases.

D'aquesta barreja, la qual se'n prepara una de comú per a tots les mostres que necessiten estudiar-se per a cada gen, se'n diposita 19 μl per pou més 1 μl de la reacció de retrotranscripció.

## Sondes *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays* utilitzades:

### *Homo sapiens*

- 18S	(Hs99999901_s1)	- PPARα	(Hs00231882_m1)
- ACADM	(Hs00163494_m1)	- PPARG	(Hs00234592_m1)
- ADIPOQ	(Hs00605917_m1)	- PPARGC1A	(Hs00173304_m1)
- ATP5J	(Hs00365888_m1)	- RB1	(Hs00153108_m1)
- B2M	(Hs99999907_m1)	- RBP4	(Hs00198830_m1)
- CCL2	(Hs00234140_m1)	- RRM2B	(Hs00153085_m1)
- COX4I1	(Hs00266371_m1)	- Sirt1	(Hs01009006_m1)
- FABP4	(Hs00609791_m1)	- SIRT3	(Hs00202030_m1)
- FGF21	(Hs00173927_m1)	- SIRT6	(Hs00213036_m1)
- GSTZ1	(Hs00155313_m1)	- SLC25A31	(Hs00229864_m1)
- HIF1A	(Hs00153153_m1)	- SLC25A4	(Hs00154037_m1)
- HK II	(Hs00606086_m1)	- SLC25A5	(Hs00854499_g1)
- IL-6	(Hs00174131_m1)	- SLC25A6	(Hs00745067_s1)
- IL-8	(Hs00174103_m1)	- SLC2A1	(Hs00892681_m1)
- LEP	(Hs00174877_m1)	- SLC2A4	(Hs00168966_m1)
- MT-CO1	(Hs02596864_g1)	- SOD1	(Hs00533490_m1)
- MT-COII	(SEQCOII_S4)	- SOD2	(Hs00167309_M1)
- MT-CYB	(Hs02596867_s1)	- TFAM	(Hs01082775_m1)
- NRF1	(Hs00192316_m1)	- TFB1M	(Hs00274971_m1)
- NRIP1	(Hs00940782_m1)	- TFB2M	(Hs00254651_m1)
- PDK4	(Hs00176875_m1)	- TNF	(Hs00174128_m1)
- POL2AG	(Hs00172187_m1)	- TP53	(Hs00153349_m1)

### *Mus musculus*

- Acdc	(Mm00456425_m1)	- Ndufb5	(Mm00452592_m1)
- Acadm	(Mm00431611_m1)	- Pck1	(Mm00440636_m1)
- aP2	(Mm00445880_m1)	- Pdk4	(Mm00443325_m1)
- Atp5c1	(Mm00662408_m1)	- Ppara	(Mm00440939_m1)

- Atp5g3	(Mm00558162_m1)	- PPARd	(MPPARDELTA-EXO-3)
- B2m	(Mm00437762_m1)	- Pparg	(Mm00440945_m1)
- COI	(MT-COI-ANY)	- Ppargc1a	(Mm00447183_m1)
- Cox4i1	(Mm00438289_g1)	- Sirt3	(Mm00452129_m1)
- Cox7a1	(Mm00438296_m1)	- SLC25A4	(Mm01207393_m1)
- Cytb	(CYT-bmm001-cj1)	- SLC25A5	(Mm00846873_g1)
- ERRalfa	(Mm00433143_m1)	- Slc2a1	(Mm00441480_m1)
- Fgf21	(Mm00840165_g1)	- Slc2a4	(Mm00436615_m1)
- Gapdh	(Mm99999915_g1)	- Sod1	(Mm01344231_g1)
- IL-6	(Mm00446191_m1)	- Sod2	(Mm00449726_m1)
- Lep	(Mm00434759_m1)	- Tnf	(Mm00443258_m1)
- Lipe	(Mm00495359_m1)	- Trp53	(Mm00441964_g1)
- MCP1	(Mm00441242_m1)	- Ucp1	(Mm00494069_m1)

*Observació:* La sonda 18S, la qual reconeix i permet l'amplificació de la subunitat 18S ribosomal, s'utilitza com a control endògen, ja que al ser la forma d'RNA majoritària en la cèl·lula i la quantitat del qual és teòricament invariable, ens serveix per a corregir possibles errors de càrrega a l'hora d'haver realitzat la retrotranscripció. A més, tot i ser la sonda humana, també és capaç de reconèixer el 18S de ratolí, pel que ens serveix per a la correcció de l'expressió tant de gens humans com de ratolí.

Una vegada realitzada la mesura, el software que registra les mesures a temps real genera una corba, la qual obeeix una funció logarítmica on l'eix Y correspon al logaritme de la concentració de DNA i l'eix X al número de cicles d'amplificació, i hi determina un llindar comú que intersecciona totes les corbes (una per cada mostra) en la seva fase exponencial. Aquest valor informa de quants cicles d'amplificació han estat necessaris per a assolir una determinada concentració de DNA, on un número més baix de cicle significa que s'ha assolit aquest llindar en menys temps i, per tant, que el número de cDNA que han actuat de motlle en la PCR era més gran, ja que és el factor limitant de la reacció. Per a obtenir un valor proporcional a la quantitat de cDNA, o el que és el mateix, de l'mRNA de cada gen estudiat present en les nostres mostres, el valor de cicles ( $C_T$ ) es corregeix amb la funció  $2^{(-CT)}$ . Els valors finals es corregeixen dividint-los amb els valors corresponents al 18S (control endogen o *housekeeping*).

## VI. PURIFICACIÓ DE DNA I QUANTIFICACIÓ DEL DNA MITOCONDRIAL

La mesura del DNA mitocondrial (mtDNA) és un paràmetre molt útil per a informar-nos de l'estat fisiològic dels mitocondris així com de la cèl·lula en tot el seu conjunt, ja que el seu manteniment és molt sensible a les alteracions d'aquest estat (potencial de membrana, producció d'espècies reactives, transcripció mitocondrial, etc).

### VI.1 Purificació de DNA

La purificació del DNA s'ha realitzat a partir dels lisats per a l'extracció de l'RNA mitjançant el kit *NucleoSpin® RNA II* (Macherey-Nagel), tot i que també es pot realitzar si el lisat s'ha obtingut utilitzant *TriPure Isolation Reagent* (Roche), seguint les indicacions de la casa comercial.

#### *Procediment*

- Al primer eluït de la columneta d'afinitat d'RNA, afegir-hi 1 volum de la fase inferior de la barreja fenol/cloroform/alcohol isoamílic (50%/48%/2%). Aquest tampó d'extracció s'ha d'haver preparat amb antelació i mantingut a 4 °C per tal de què s'hagin separat les fases.
- Agitar en orbital durant 10 minuts.
- Centrifugar a 16.000 xg (o a la màxima velocitat permesa per l'aparell) durant 15 minuts.
- Recuperar el sobrenedant (fase aquosa superior) en un tub nou i afegir-hi un volum d'isopropanol.
- Agitar per inversió fins a visualitzar el precipitat (cabdell blanquinós), tot i que no sempre és visible.
- Centrifugar a 16.000 xg durant 15 minuts.
- Descartar el sobrenedant i rentar el sediment amb 200 µl d'etanol al 70%, pipetejant-lo amb força varies vegades.
- Centrifugar a 16.000 xg durant 5 minuts.

- Retirar el sobrenedant i deixar evaporar les traces d'etanol.
- Resuspndre el sediment de DNA amb 50-150  $\mu\text{l}$  (depenent de la grandària del sediment) d'aigua bidestil·lada temperada a 50 °C.
- Determinar la concentració de DNA amb el *NanoDrop*<sup>®</sup>.

## VI.2 Quantificació del DNA mitocondrial

Per a quantificar el DNA mitocondrial es realitza una PCR quantitativa a temps real on es determina l'expressió d'un gen mitocondrial de còpia única, el citocrom b (Cytb) i es corregeix pel valor d'un altre gen de còpia única, però aquest cas nuclear, el CEBP $\alpha$ , obtenint la relació mtDNA/nDNA. Les condicions d'aquesta reacció són:

- 10  $\mu\text{l}$  de *Platinum*<sup>®</sup> *qPCR Super-Mix-UDG with ROX* per pou.
- 1  $\mu\text{l}$  de sonda *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Assays* per pou.  
(Preparar una barreja comú amb el volum total necessari per a totes les mostres a quantificar per cada gen).
- 100 ng DNA/pou en un volum de 9  $\mu\text{l}$  d'aigua (realitzar prèviament les dilucions corresponents per a tenir les mostres a aquesta concentració).

## VII. WESTERN BLOT

La immunodetecció de proteïnes és una tècnica robusta que permet estudiar l'expressió gènica a nivell del seu producte final, les proteïnes, així com canvis post-traduccionals d'aquestes (degradació, fosforilació o desfosforilació, acetilació o desacetilació, etc), en un moment determinat i en resposta a les determinades condicions que són objecte d'estudi. El mètode es basa en detectar mitjançant l'ús d'anticossos, generats contra un epítop concret de la proteïna d'interès, l'esmentada proteïna del conjunt total de proteïnes present en el lisat de les cèl·lules, les quals han estat separades pel seu pes molecular mitjançant una



## Metodologia

electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida/SDS i transferides a una matriu sòlida de PVDF.

### VII.1 Obtenció d'extractes proteics a partir de cultius cel·lulars

En el present treball s'han utilitzat dos procediments diferents per obtenir els extractes proteics en funció si només és necessari un homogenat total de la mostra o si s'ha de disposar de les fraccions citosòliques i mitocondrials.

#### A) Homogenització total

##### *Procediment*

- Després de retirar el medi de cultiu i rentar les cèl·lules amb PBS 1x, afegir 100  $\mu$ l de tampó d'homogenització per pou de placa de 6 pous (Na-Hepes 20 mM (pH 7.4); NaCl 2.5 mM; EDTA 1 mM;  $\beta$ -glicerofosfat 40 mM;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM; NP-40 1%; PMSF 0.5  $\mu$ M; DTT 1 mM; cocktail d'inhibidors de proteases 1x), rascar el pou mitjançant un *scraper* i recuperar el lisat en un tub de microcentrifuga.
- Incubar en agitació (orbital) a 4 °C durant 45-60 minuts.
- Centrifugar a 12.000 xg a 4 °C durant 5 minuts per tal d'eliminar fraccions grans de membranes.
- Recuperar el sobrenedant i determinar la concentració de proteïna de les mostres.

#### B) Fraccionament subcel·lular

Les línies cel·lulars estables, al tractar-se en la majoria de casos de línies provinents de tumors o cultius primaris immortalitzats, es caracteritzen per tenir un contingut mitocondrial baix en comparació al que es pot trobar en mostres provinents de teixits, sobretot en el cas de línies com HeLa, HIB-1B o HepG<sub>2</sub> (tot i que en menor mesura). Aquest fet obliga a què per tal

d'obtenir un bon rendiment en el fraccionament subcel·lular, la quantitat de material de partida hagi de ser més gran que quan es realitza una homogeneïtzació total. En el nostre cas, normalment hem partit, com a mínim, del total de 6 pous d'una placa multipou. Per tant, s'ha de tenir en compte en el disseny experimental, que si es vol realitzar una immunodetecció a partir d'extractes fraccionats, aquest serà el número mínim de pous per a cada condició.

### *Procediment*

- Tripsinització del total de pous de cada condició, agrupar i centrifugar a 1200 rpm durant 4 minuts.
- Resuspendre el sediment cel·lular amb 1ml de tampó d'homogeneïtzació (Sacarosa 250 mM; Na-Hepes 20 mM (pH 7.4); KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; β-glicerofosfat 40 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM; PMSF 1 mM; DTT 1 mM; cocktail d'inhibidors de proteases 1x). Aquest tampó té la característica de ser isotònic respecte les cèl·lules, pel que la lisi cel·lular és únicament mecànica i preservarà, el màxim possible, l'estructura dels orgànuls subcel·lulars.
- Dispensar la suspensió en un homogeneïtzador de vidre i realitzar uns 50 moviments mantenint l'homogeneïtzador en gel.
- Retirar uns 100 µl, corresponents a la fracció *Homogenat Total*, i guardar a -20 °C.
- Centrifugar la resta d'homogenat a 1500 xg a 4 °C durant 5 minuts per tal d'eliminar les cèl·lules no lisades. Recuperar el sobrenedant i resuspendre el sediment resultant amb 200 µl de tampó i tornar a centrifugar. Ajuntar el nou sobrenedant als recollits en la primera centrifugació. El sediment restant es pot resuspendre i guardar com a fracció corresponent a *Cèl·lules Senceres*.
- Centrifugar els sobrenedants a màxima velocitat a 4 °C durant 20 minuts.

## Metodologia

- Retirar el sobrenedant i resuspendre el sediment amb un volum petit de tampó d'homogeneïtzació. Aquesta és la fracció enriquida en *Mitocondris*.
- El sobrenedant anterior s'ultracentrifuga a 100.000 xg a 4 °C durant 1 hora per tal d'obtenir la fracció del *Citosol*.

## VII.2 Valoració de la concentració proteica mitjançant Bradford

La quantificació de la concentració proteica d'un extracte o lisat cel·lular es realitza mitjançant la tinció amb blau brillant de Coomassie G-250, també conegut com Assaig de Bradford.

### *Procediment*

- Elaborar un banc de dilucions dispensant la quantitat necessària de BSA 2 mg/ml en una cubeta d'espectrofotometria per tal d'obtenir les següents concentracions: 0, 1, 2, 4, 10, 15 i 20 mg/ml una vegada afegim el reactiu (1 ml/cubeta). Aquest banc servirà per a obtenir la recta patró.
- Dispensar 2  $\mu$ l de mostra per cubeta.
- Preparar el volum de reactiu necessari a partir de l'estoc concentrat de *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories GmbH), sabent que es necessita 1 ml per cubeta, diluint 1/5 en aigua bidestil·lada.
- Afegir 1 ml de reactiu diluït per cubeta i agitar per inversió tapant l'obertura amb *Parafilm* (Pechiney Plastic Packaging).
- Fer la lectura amb un espectrofotòmetre de l'absorbància a la longitud d'ona de 595 nm i interpolar els valors d'absorbància de les mostres a la recta patró per tal d'obtenir la concentració de les mostres, tenint en compte que el valor s'ha de corregir dividint-lo per 2 ja que en la cubeta s'han valorat 2  $\mu$ l.

### VII.3 Electroforesi PAGE, transferència i immunodetecció

De manera esquemàtica, el mètode de transferència Western consisteix en:

- Preparació d'un gel de poliacrilamida al percentatge adient pel pes molecular de les proteïnes a estudiar, consistent en una barreja de:
  - o Tris, 375 mM - pH 8.8 per a la fase separadora i 63 mM - pH 6.8, per la concentradora.
  - o La quantitat d'acrilamida 40% - bisacrilamida 0.5% per a aconseguir el percentatge final desitjat. Normalment entre el 7%,
  - o per a separar proteïnes d'elevat pes molecular (per sobre de 100 kDa) i el 15% per a petites (inferiors a 40 kDa).
  - o SDS 1%.
  - o TEMED 0.426 M.
  - o Persulfat amònic 0.1%.
- Preparació de les mostres, afegint al volum de mostra necessari per a una quantitat de proteïna determinada (i comú a totes les mostres) 1/5 parts de Tampó de Ruptura (Tris-HCl 100 mM, pH 6.8; glicerol 20%; mercaptoetanol 2%; SDS 2%; blau de bromofenol 0.1%), i escalfar-les a 95 °C durant 5 minuts.
- Realitzar l'electroforesi de les mostres carregades al gel d'acrilamida en una cubeta amb tampó de correguda (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0.1%) a un voltatge constant de 100-110 V durant unes 3 hores.
- Transferència de les proteïnes separades en el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF, mitjançant un muntatge tipus sandvitx, en una cubeta refrigerada amb tampó de transferència (Tris base 50 mM; glicina 386 mM; metanol 20%; SDS 0.1%) a un amperatge constant de 400 mA durant 1 hora.
- Bloqueig de la membrana amb PBS 1x més Tween20 0.1-1% i llet en pols al 5% durant 1 hora.
- Incubació amb la dilució corresponent d'anticòs primari en PBS 1x - Tween20 0.1% - llet 3%, durant tota la nit a 4 °C en agitació.

## Metodologia

- Rentats amb PBS 1x - Tween20 1%.
- Incubació amb la dilució d'anticòs secundari contra IgG específica de l'anticòs primari i conjugat amb l'enzim de la peroxidasa, en PBS 1x - Tween20 0.1% - llet 3%, durant 1 hora a temperatura ambient en agitació.
- Revelat, utilitzant el substrat de la luciferasa *Immobilon™ Western* (Millipore Corporation) o *ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (Amersham™ – GE Healthcare UK Limited) que emetrà un producte quimioluminiscent, per exposició sobre un film fotosensible o utilitzant l'aparell *LAS 3000 Imager* (Fujifilm).

En cas de voler reutilitzar la membrana per a detectar una altra proteïna que coincideixi aproximadament amb el pes molecular d'una altra detectada anteriorment, es pot realitzar una deshibridació o **Stripping** de la membrana mitjançant la incubació d'aquesta en un bany en agitació a 55 °C durant 30 minuts amb solució d'*stripping* (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8; SDS 2%; β-mercaptoetanol 14.3 mM). Finalitzada la deshibridació, rentar amb PBS 1x - Tween20 1% i continuar des del punt de bloqueig de la membrana.

## VII.4 Anticossos utilitzats amb més freqüència

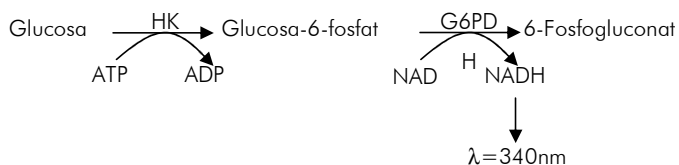
<u>Proteïna diana</u>	<u>Font</u>	<u>Dilució de treball</u>	<u>Casa comercial</u>
<i>Anticossos Primaris</i>			
Acetil-CoA Carboxilasa	Conill	1/1000	Cell Signaling
Acetil-CoA Carboxilasa fosforilada	Conill	1/1000	Cell Signaling
Akt	Conill	1/1000	Cell Signaling
Akt fosforilada	Conill	1/1000	Cell Signaling
AMPK- $\alpha$	Conill	1/1000	Cell Signaling
AMPK- $\alpha$ fosforilada	Conill	1/1000	Cell Signaling
AMPK- $\beta$	Conill	1/1000	Cell Signaling
AMPK- $\beta$ fosforilada	Conill	1/1000	Cell Signaling
ANT (N19)	Cabra	1/500	Santa Cruz
ANT (Q18)	Cabra	1/500	Santa Cruz
Bax (N-20)	Conill	1/500	Santa Cruz
Caspasa 9 (Asp 330)	Conill	1/1000	Cell Signaling
Caveolina-3	Ratolí	1/1000	BD Biosciences
Citocrom C	Ratolí	1/500	BD Pharmingen
Citocrom C Oxidasa (Complex IV), Subunitat II	Ratolí	1/1000	Molecular Probes
Citocrom C Oxidasa (Complex IV), Subunitat IV	Ratolí	1/1000	Molecular Probes
F1-ATPasa	Cabra	1/1000	Santa Cruz
Hexoquinasa II	Conill	1/1000	Santa Cruz
PARP	Ratolí	1/1000	BD Pharmingen
PCNA (F2)	Ratolí	1/5000	Santa Cruz
PGC-1 $\alpha$ (K15)	Cabra	1/500	Santa Cruz
TNF- $\alpha$	Cabra	2 $\mu$ g/ml	R&D Systems
VDAC	Ratolí	1/2000	Calbiochem
$\alpha$ -Tubulina	Ratolí	1/10000	Sigma
$\beta$ -Actina	Ratolí	1/10000	Sigma
<i>Anticossos Secundaris</i>			
Ig de cabra	Ratolí	1/3000	Santa Cruz
Ig de conill	Cabra	1/3000	Santa Cruz
Ig de ratolí	Cabra	1/3000	Bio-Rad

## VIII. VALORACIÓ DE L'ESTAT METABÒLIC CEL·LULAR

Una de les maneres de saber l'estat metabòlic d'una cèl·lula o, més pròpiament dit, d'un cultiu cel·lular, en unes determinades condicions experimentals (efecte d'un shRNA específic, hipòxia, tractaments) és estudiar l'ús i producció de diferents metabòlits que ens donin informació al voltant de l'activitat d'una determinada via metabòlica.

### VIII.1 Quantificació de la glucosa en el medi de cultiu

El mètode consisteix en quantificar la glucosa present en el medi de cultiu (del qual se n'haurà recollit un petit volum a diferents temps per tal de poder calcular la taxa de consum) mitjançant l'ús d'un reactiu comercial, *Glucose Assay Reagent* (Sigma-Aldrich Co.). Aquest assaig enzimàtic es basa en quantificar espectrofotomètricament la producció de NADH a partir de glucosa per l'activitat acoblada de l'hexoquinasa i la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (HK-G6PDH).



#### Procediment

- Preparar un banc de dilucions de glucosa (Sigma-Aldrich Co.) amb les següents concentracions: 0, 0.56, 1.125, 2.25, 4.5, 9, 18 i 36 mM, per tal d'obtenir la recta patró, sabent que es necessiten 2  $\mu\text{l}$ /pou de cada punt i per duplicat (la valoració es realitza en una placa de 96 pous).
- Es distribueixen 2  $\mu\text{l}$  tant de la recta patró com de les mostres a cada pou.
- S'afegeixen 200  $\mu\text{l}$  del reactiu *Glucose Assay Reagent* (Sigma-Aldrich Co.).
- Incubar a 37 °C durant 3 minuts.
- Lectura de l'absorbància a la longitud d'ona de 340 nm utilitzant *Microplate Reader (ELISA)* (Bio-Rad).
- Interpol·lar els valors d'absorbància de les mostres a la recta patró per tal d'obtenir la concentració de les mostres.

### VIII.2 Quantificació del lactat en el medi de cultiu

La mesura de la producció de lactat present en el medi de cultiu proporciona informació al respecte de l'activitat de la via glucolítica. La seva quantificació es basa en l'activitat enzimàtica de la lactat deshidrogenasa, enzim

responsable de catalitzar el pas de lactat a piruvat amb la generació del coproducte NADH que és el que es determina per espectrofotometria. Degut a que aquesta reacció, en situacions normals, es troba desplaçada en sentit contrari, en l'assaig s'ha d'afegir hidrazina (Sigma-Aldrich Co.) per tal de complexar el piruvat i que aquest ja no pugui ser utilitzat per l'enzim, aconseguint revertir la reacció cap a la formació d'aquest.

#### *Procediment*

- Preparar un banc de dilucions de lactat (Sigma-Aldrich Co.) amb les següents concentracions: 0, 0.120, 0.225, 0.375, 0.6, 0.8, 1.2, 1.5, 1.8 i 2 mM, per tal d'obtenir la recta patró, sabent que es necessiten 18.5  $\mu\text{l}$ /pou de cada punt i per duplicat (la valoració es realitza en una placa de 96 pous).
- Diluir les mostres 1/20 per tal de què la mesura d'absorbància entra dins la recta patró.
- Dispensar 11.5  $\mu\text{l}$ /pou d'aigua bidestil·lada, 18.5  $\mu\text{l}$ /pou de mostra o patró i 185  $\mu\text{l}$ /pou d'una barreja 10:1 de tampó Hidrazina 0.5 M - EDTA 12 mM (pH 10) (Sigma-Aldrich Co.) amb  $\text{NAD}^+$  30.15 nM (Sigma-Aldrich Co.).
- Afegir 5.25  $\mu\text{l}$ /pou de lactat deshidrogenasa (Roche) diluïda  $\frac{1}{4}$  amb  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.2 M (pH 6.5) i incubar a 37 °C durant 3 hores.
- Lectura de l'absorbància a la longitud d'ona de 340 nm utilitzant *Microplate Reader (ELISA)* (Bio-Rad).
- Interpolar els valors d'absorbància de les mostres a la recta patró per tal d'obtenir la concentració de les mostres.

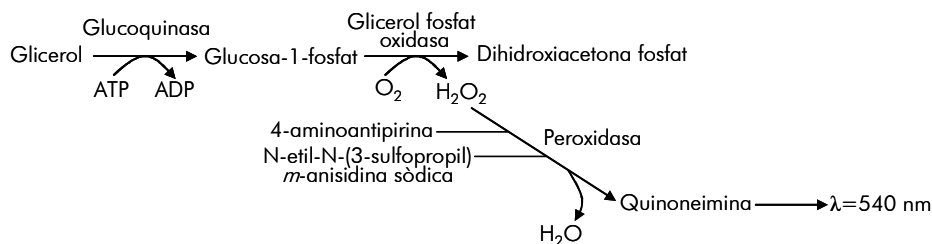
### **VIII.3 Quantificació del glicerol en el medi de cultiu**

La mesura del glicerol lliure present en el medi ens permet conèixer l'activitat lipolítica del cultiu. Per a realitzar la seva quantificació s'utilitza el *Free*



## Metodologia

*Glycerol Reagent* (Sigma-Aldrich Co.), assaig que es basa en un seguit de reaccions enzimàtiques acoblades que generaran un producte final colorimètric:



## Procediment

- Reconstituir el *Free Glycerol Reagent* amb 40 ml d'aigua bidestil·lada i temperar a 37 °C.
- Dispensar 2  $\mu\text{l}$ /pou de mostra, aigua bidestil·lada (blanc) o de *Glycerol Standard Solution* (Sigma-Aldrich Co.), la concentració del qual és de 0.26 mg/ml.
- Afegir 200  $\mu\text{l}$ /pou de *Free Glycerol Reagent* i incubar a 37 °C durant 5 minuts.
- Lectura de l'absorbància a la longitud d'ona de 540 nm utilitzant *Microplate Reader (ELISA)* (Bio-Rad).
- Calcular la concentració de glicerol de les mostres en funció de l'absorbància del patró:

$$[(A_{\lambda} \text{ mostra} - A_{\lambda} \text{ blanc}) / (A_{\lambda} \text{ patró} - A_{\lambda} \text{ blanc})] \times 0.26 \text{ mg/ml}$$

## VIII.4 Quantificació de l'ATP intracel·lular

La concentració d'ATP intracel·lular és una informació valuosa per a conèixer l'estat energètic d'una cèl·lula. Per a determinar-la utilitzem l'*ATP Bioluminescence Assay Kit HS II* (Roche) que es basa en l'activitat de l'enzim luciferasa de *Photinus pyralis*, el qual, a partir de l'ATP i D-luciferina i en presència d' $\text{O}_2$ , produeix AMP, fosfat inorgànic,  $\text{CO}_2$  i oxiluciferina. L'oxiluciferina emet llum amb un pic màxim d'emissió a  $\lambda = 562 \text{ nm}$ , quantificable amb un luminòmetre.

*Procediment*

- Preparar un banc de dilucions d'ATP (inclòs en el kit) des de  $10^{-12}$  a  $10^{-5}$ , incloent un blanc d'aigua bidestil·lada, per tal d'obtenir la recta patró, sabent que es necessiten 25  $\mu\text{l}$ /pou de cada punt i per duplicat (la valoració es realitza en una placa de 96 pous).
- Després de retirar el medi de cultiu i rentar les cèl·lules amb PBS 1x, recollir les cèl·lules utilitzant un *scraper* amb 100  $\mu\text{l}$  de *Dilution Buffer* (kit) per pou de la placa de 6 pous. Separar 5  $\mu\text{l}$  de cada mostra per a valorar-ne la concentració de proteïna per Bradford.
- Afegir als punts de la patró o a les mostres un volum de *Cell Lysis Buffer* (kit) i transferir 50  $\mu\text{l}$  d'aquesta barreja a una placa opaca de color blanc.
- Realitzar la lectura de luminiscència mitjançant un luminòmetre amb injectors (*GloMax* de Promega) amb els següents paràmetres:
  - o Addició automatitzada de 50  $\mu\text{l}$ /pou de *Luciferase Reagent* (kit).
  - o Interval d'un segon entre l'addició del *Luciferase Reagent* i l'inici de la lectura.
  - o Lectura integrada de 10 segons.
- Interpolar els valors d'absorbància de les mostres a la recta patró, representada en forma log-log, per tal d'obtenir la concentració de les mostres.

**VIII.5 Quantificació del consum d'oxigen**

Entre les diferents activitats en les que l'oxigen està involucrat en una cèl·lula, una de les més importants és el seu ús per a dur a terme l'oxidació de substrats, com la glucosa o els àcids grassos, fenòmens que tenen lloc en els mitocondris i en els peroxisomes. Per tant, la mesura del seu consum ens aporta informació de l'activitat d'aquestes vies. El mètode utilitzat és l'*Oxygen Biosensor System* (OBS) de BD Biosciences, basat en la monitorització en temps real de la concentració d'oxigen dissolt en el medi d'assaig d'una placa de 96 pous amb un

## Metodologia

substrat fluorogènic. En concret, l'oxigen atmosfèric difon dins del medi del pou on hi ha les cèl·lules vives, les quals, segons el seu estat oxidatiu, utilitzaran una quantitat determinada de l'oxigen dissolt. L'oxigen no utilitzat segresta la molècula fluoròfora de la matriu del fons del pou, evitant la seva activitat. Per tant, a més consum d'oxigen hi ha més fluoròfor lliure i, en conseqüència, més emissió de fluorescència.

### *Procediment*

- Recollir per tripsinització totes les cèl·lules d'una mateixa condició. S'ha de tenir en compte que per a realitzar aquest tipus d'assaig és necessari un elevat número de cèl·lules degut a que les línies cel·lulars utilitzades es caracteritzen per tenir un baix número de mitocondris. Per tant, a l'hora de dissenyar l'experiment s'ha de preparar un número de pous per a cada condició suficient per a recollir  $0.5-1 \cdot 10^6$  cèl·lules/pou, sabent que per a cada condició es realitzaran les mesures en condicions basals, en condicions d'inhibició de la cadena respiratòria per tal de mesurar el consum d'oxigen extramitocondrial i en condicions de desacoblament per a obtenir el consum màxim, i que és altament recomanable realitzar aquestes mesures per triplicat. Normalment, s'han utilitzat de 8 a 12 pous de placa de 6 per a obtenir aquest número de cèl·lules.
- Quantificació automatitzada de la concentració cel·lular (explicat en el punt 1.2.3) i centrifugació del volum que contingui el volum necessari de cèl·lules per a realitzar les diferents mesures, a més d'un punt extra que s'utilitzarà per a quantificar la proteïna per Bradford. Com a mínim s'ha de comptar amb 10 pous ( $5 \cdot 10^6$  cèl·lules).
- Resuspendre el sediment cel·lular amb el volum necessari de medi DMEM (sense P/S ni FBS) per a poder dispensar posteriorment el número adient de cèl·lules en  $200 \mu\text{l}$ /pou.
- Dispensar les cèl·lules i realitzar els tractaments amb oligomicina  $10 \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich Co.), que és un inhibidor del complex V (ATP-sintetasa) del sistema OXPHOS, o FCCP  $10 \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich Co.), que és un

protonòfor que li permetrà al sistema OXPPOS assolir la seva màxima capacitat oxidativa, ja que es perd la limitació pel gradient de  $H^+$ .

- Mesura cinètica de la variació de l'oxigen dissolt en el medi mitjançant el fluorímetre de placa *FLUOstar OPTIMA* (BMG Labtechnologies), tenint en compte que el pic d'excitació màxim del fluoròfor és de 485 nm i el d'emissió és de 630 nm.
- Un cop es disposa de la cinètica, es calcula el pendent de la part lineal de la corba i es corregeix per la concentració de proteïna del pou. Aquest càlcul ens informa de la taxa màxima de consum d'oxigen en cada condició.

## VIII.6 Quantificació de l'oxidació de substrats

La mesura del consum d'oxigen ens proporciona informació de la quantitat d'oxigen utilitzat en les diferents vies metabòliques que en depenen, però no permet distingir-ne la proporció de cada una d'elles. Amb la finalitat d'esbrinar l'ús d'oxigen propi de cada una de les vies, es pot fer una quantificació de l'activitat específica de cada una d'elles, principalment la de l'oxidació de glucosa i la dels àcids grassos.

### VIII.6.1 Quantificació de l'oxidació de glucosa

Aquest assaig consisteix en quantificar el  $^{14}CO_2$  alliberat al medi de cultiu, com a coproducte de l'oxidació de la D-[U- $^{14}C$ ]-glucosa afegida al medi.

#### *Procediment*

- Retirar el medi de creixement i incubar amb 2 ml/pou (plaques multipou de 6) d'una barreja de DMEM sense glucosa (GIBCO®, Invitrogen - Life Technologies) suplementat amb glucosa 3 mM i 1.5  $\mu C$ /ml de D-[U- $^{14}C$ ]-

## Metodologia

glucosa (Amersham<sup>TM</sup> - GE Healthcare UK Limited o Hartmann Analytic) durant 3 hores.

- Captació del  $^{14}\text{CO}_2$  mitjançant trampa amb paper *Whatman*<sup>®</sup> (Schleicher & Schuell):
  - o Retallar, amb antelació, un rectangle de paper *Whatman*<sup>®</sup> que encaixi sobre la superfície de la placa de 6 pous i dibuixar els límits dels pous que estaran a sota.
  - o Al finalitzar el temps d'incubació, acidificar el medi afegint 500  $\mu\text{l}$ /pou d'àcid perclòric ( $\text{HClO}_4$ ) 3 M al mateix temps que es disposen 100  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -feniletilmanina (Sigma-Aldrich Co.) per cada àrea equivalent a un pou delimitada en el paper *Whatman*<sup>®</sup> (si és possible, coordinar al màxim el temps entre l'acidificació i l'adició de la  $\beta$ -feniletilmanina al paper). Col·locar el paper sobre els pous acompanyat d'altres rectangles de paper recoberts de paper d'alumini, per tal d'ocupar l'espai entre la placa i la tapa, i tancar la placa, segellar-la amb parafilm i col·locar-hi un pes al damunt durant 45-60 minuts. Aquest sistema permet que a l'acidificar el medi, el  $^{14}\text{CO}_2$  s'alliberi i quedi retingut al paper *Whatman*<sup>®</sup> impregnat amb  $\beta$ -feniletilmanina.
  - o Passat el temps, retirar la plantilla de paper *Whatman*<sup>®</sup>, retallar els requadres corresponents a cada pou i disposar-los en un vial de comptatge (Perkin-Elmer) on s'afegiran 10 ml de líquid d'escintil·lació *Ecocint*<sup>TM</sup> H (National Diagnostics). Mantenir els vials protegits de la llum durant 1 dia i realitzar el comptatge de les desintegracions per minut (dpm) de les mostres utilitzant el comptador de partícules  $\beta$  *Packard 2100TR TriCarb Liquid Scintillation Counter* (Packard Instrument Company Inc.) amb el protocol  $^{14}\text{C}$  - 3 minuts.

### VIII.6.2 Quantificació de l'oxidació d'àcid palmític

L'assaig consisteix en quantificar l' $^3\text{H}_2\text{O}$  alliberada al medi de cultiu després de l'oxidació del 9,10- $^3\text{H}$  palmitat afegit al medi.

#### *Procediment*

- Preparació del medi d'incubació i incubació de les cèl·lules:
  - o Dissoldre l'àcid palmític fred (Sigma-Aldrich Co.) en aigua destil·lada amb 1.3 equivalents de NaOH, per tal de formar la sal sòdica, a una concentració de 25 mM. Escalfar la barreja a 65 °C fins a la completa dissolució i filtrar-la amb un filtre de 0.2  $\mu\text{M}$ .
  - o Preparar una barreja de DMEM sense glucosa suplementat amb glucosa 3 mM més BSA lliure d'àcids grassos (Sigma-Aldrich Co.) en una relació molar de 5:1 respecte l'àcid gras que s'afegirà posteriorment, L-carnitina (Sigma-Aldrich Co.) 0.25 mM, el palmitat sòdic per a una concentració final de 120  $\mu\text{M}$  i 12  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  de 9,10- $^3\text{H}$  palmitat (Amersham<sup>TM</sup> – GE Healthcare UK Limited). Incubar la barreja a 37 °C durant 1 hora en agitació.
  - o Retirar el medi de creixement de les cèl·lules i afegir 1 ml/pou de la barreja d'incubació. Incubar durant 3 hores i recollir el medi en un tub de 15 ml. Si s'escau, els medis es poden congelar fins a la purificació.
- Purificació de l' $^3\text{H}_2\text{O}$ :
  - o Afegir al mil·lilitre de medi recollit, 100  $\mu\text{l}$  de BSA 20% i incubar durant 2 minuts en l'orbital. Afegir 1 ml de TCA 10% (Panreac) i incubar durant 5 minuts a l'orbital. Aquest pas es realitza per tal de precipitar la BSA conjugada amb el 9,10- $^3\text{H}$  palmitat no metabolitzat.
  - o Centrifugar a 3000 xg durant 5 minuts.
  - o Recuperar el sobrenedant i tornar a repetir el procés d'incubació amb BSA 20% i TCA 10%. Centrifugar a 3000 xg durant 5 minuts.

## Metodologia

- o Recuperar 0.5 ml de sobrenedant en un tub de vidre amb tap de rosca (Pyrex®) i afegir-hi 2.5 ml de metanol-cloroform (2:1) i 1 ml de KCl-HCl 2 M (1:1 v/v). Incubar durant 5 minuts a l'orbital.
- o Centrifugar a 3000 xg durant 5 minuts.
- o Recuperar 1 ml de la fase aquosa superior en un nou tub de vidre i repetir la incubació amb metanol-cloroform i KCl-HCl 2 M.
- o Centrifugar a 3000 xg durant 5 minuts.
- o Recollir 0.5 ml de la fase aquosa en un vial de comptatge (Perkin-Elmer) on s'afegiran 4 ml de líquid d'escintil·lació *Ecoscint<sup>TM</sup> H* (National Diagnostics). Mantenir els vials protegits de la llum durant 1 dia i realitzar el comptatge de les desintegracions per minut (dpm) de les mostres utilitzant el comptador de partícules  $\beta$  *Packard 2100TR TriCarb Liquid Scintillation Counter* (Packard Instrument Company Inc.) amb el protocol  $^3\text{H}$  - 3 minuts.

### VIII.7 Quantificació de proteïna total (correcció mesures i proliferació cel·lular)

En la majoria dels assaigs que es duen a terme en aquest treball, com les quantificacions dels diferents metabòlits en medis, les mesures d'oxidació de glucosa i d'àcids grassos o mesures mitjançant l'ús de citometria, requereixen la seva correcció amb els valors de proteïna de cada pou, per tal de què les diferències que es puguin detectar derivin dels efectes de cada condició experimental (shRNA, tractament, etc) i no pel fet de què hi hagi un número diferent de cèl·lules.

Per altra banda, la quantificació de proteïna també es pot utilitzar per a analitzar la proliferació cel·lular, la qual pot servir per ella mateixa com a paràmetre dels efectes de les diferents condicions. Una altra manera de quantificar la proliferació cel·lular és mitjançant el comptatge cel·lular automatitzat després d'haver tripsinitzat les cèl·lules (procediment explicat en el punt 1.2.3). En els casos on s'ha

requerit calcular el temps de duplicació de la població cel·lular, s'ha utilitzat la fórmula  $T_d = (t_2 - t_1) [\log(2) / \log(q_2 - q_1)]$ , assumint una taxa de creixement constant.

La quantificació de la proteïna total de cèl·lules en cultiu es basa en un mètode colorimètric mitjançant la tinció amb sulforodamina B de les cèl·lules fixades amb TCA. S'ha de tenir en compte que en la majoria dels casos que es quantifiqui la proteïna a mode de factor de correcció, s'ha de realitzar paral·lelament l'experiment concret en plaques destinades a la tinció amb sulforodamina B.

### *Procediment*

- Retirar el medi dels pous a quantificar, rentar amb PBS 1x i afegir 1 ml/pou de TCA 10% (Panreac). Mantenir la placa a 4 °C durant 1 hora.
- Rentar els pous amb aigua destil·lada (3 a 5 vegades) i deixem assecar les plaques.
- Tenyir els pous afegint 1 ml/pou de sulforodamina B (Sigma-Aldrich Co.) al 0.4% en àcid acètic a l'1% durant 20 minuts a temperatura ambient.
- Rentar els pous amb àcid acètic a l'1% (3 a 5 vegades) per a eliminar l'excés de colorant i deixar assecar.
- Solubilitzar el colorant unit a la proteïna fixada amb 1ml de Tris-base 10 mM. Diluir, si s'escau, amb més Tris-base 10 mM per a no saturar la mesura colorimètrica.
- Lectura de l'absorbància a la longitud d'ona de 550 nm utilitzant *Microplate Reader (ELISA)* (Bio-Rad). En aquest assaig no s'elabora una recta patró, pel que els valors obtinguts corresponen a unitats d'absorbància, i només es poden utilitzar per a corregir les mesures de les diferents condicions d'un mateix experiment.

## **IX. CITOMETRIA DE FLUX**

La citometria de flux és una tecnologia que permet l'estudi de molts paràmetres cel·lulars, normalment associats a un estat físic o químic determinat i



## Metodologia

que es basa en l'ús de colorants que són detectats òpticament. Per a realitzar la mesura, és necessari disposar de cèl·lules, vives o mortes, en suspensió, ja que el citòmetre analitza, gràcies a un sistema de làsers que detecten, segons la dispersió de la llum causada per cada una de les partícules suspeses que passen per aquest conducte, la tinció positiva o negativa de les partícules a una determinada longitud d'ona (en funció del colorant utilitzat), a més de la forma i la mida. Els anàlisis de citometria es realitzen al Servei de Citometria dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona o amb el citòmetre de flux *Cell Lab Quanta™ SC Flow Cytometer* (Beckman Coulter) (del grup de Regulació de Sistemes de Transport del departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona).

### IX.1 Mesura de ROS

Les espècies reactives de l'oxigen (ROS) es generen com a producte secundari de les activitats enzimàtiques que utilitzen oxigen, especialment pel sistema OXPHOS en els mitocondris. Degut a què l'acumulació de ROS té un paper actiu en l'estrès oxidatiu, la seva quantificació ens informa de l'estat d'aquest procés en una situació determinada. El fonament de la tècnica es basa en l'ús del marcador fluorescent dihidrotetidi (DHE) o hidroetidina, el qual es incorpora per la cèl·lula al citosol, on mostra una fluorescència a la franja del blau (estat reduït), fins que és oxidat a etidi per efecte de l'anió superòxid, estat en el que és capaç d'intercalar-se al DNA i emetre fluorescència vermella, mesurable citometria de flux. Per tant, la quantitat de fluorescència emesa és proporcional a la quantitat de superòxid present en la cèl·lula responsable de l'oxidació del DHE.

#### *Procediment*

- Tractament dels pous corresponents als controls positius de producció de ROS afegint Antimicina A (Sigma-Aldrich Co.) a una concentració final de 10  $\mu$ M en els 2 ml de medi de cultiu durant 1 hora.

- Retirar els medis, rentar amb PBS 1x i afegir 1 ml/pou de DMEM més dihidroetidi (DHE) (Molecular Probes™ – Invitrogen – Life Technologies) 10  $\mu$ M durant 40 minuts a 37 °C.
- Retirar el medi de marcatge i rentar amb PBS 1x.
- Aixecar les cèl·lules afegint 200  $\mu$ l/pou de tripsina i resuspendre-les amb 2 ml/pou de PBS 1x.
- Anàlisi mitjançant citòmetre, amb longitud d'ona d'excitació de 488 nm i longitud d'ona d'emissió de 585 nm.

## **IX.2 Mesura del Potencial de Membrana**

La funció mitocondrial necessita de la càrrega negativa de la part interna de la MMI, càrrega que és mantinguda per la distribució asimètrica de  $H^+$  a través de la membrana, donant lloc a la diferència de potencial i al gradient químic de pH. El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) és la diferència de potencial entre el citoplasma i la matriu mitocondrial i ve determinat, principalment, per l'activitat de la cadena respiratòria. Per tant, la mesura del  $\Delta\Psi_m$  ens pot informar de possibles alteracions en l'activitat OXPHOS, com per exemple la formació del Porus de Transició de la Permeabilitat Mitocondrial (mPTP), procés que acompanya normalment la pèrdua en el  $\Delta\Psi_m$ . Els tints Dil són una família de sondes fluorescents, de naturalesa lipofílica, capaç de marcar membranes i altres estructures hidrofòbiques. La carbocianina DiIC<sub>1</sub>(5) és una molècula catiònica d'aquesta família que s'utilitza per a mesurar el potencial de la membrana mitocondrial en cèl·lules apoptòtiques, gràcies a la seva capacitat de travessar la MMI i localitzar a la cara interna d'aquesta d'una forma dependent de la distribució dels  $H^+$ . La caiguda del  $\Delta\Psi_m$  es detectarà per una baixada del senyal de fluorescència derivada de la pèrdua del marcador en la matriu mitocondrial. A més, per tal de definir el potencial de membrana de les cèl·lules apoptòtiques, es realitza un doble marcatge amb iodur de propidi (IP), el qual és una molècula fluorescent que actua com a agent intercalant del DNA. El iodur de propidi no és

## Metodologia

incorporat per cèl·lules viables, ja que aquestes li són impermeables, mentre que les cèl·lules necròtiques o apoptòtiques, al tenir la membrana plasmàtica fragmentada, permeten el seu pas i la posterior tinció del DNA.

### *Procediment*

- Retirar el medi de creixement, rentar amb PBS 1x, aixecar les cèl·lules amb 200  $\mu$ l/pou de tripsina i resuspendre-les amb 2 ml de DMEM.
- Centrifugar a 1200 rpm durant 4 minuts.
- Retirar el sobrenedant i resuspendre el sediment de cèl·lules amb 1.5 ml de DMEM fresc.
- Incubar en un bany a 37 °C en agitació lenta durant 30 minuts.
- Afegir 0.6  $\mu$ l/mostra de DiIC<sub>1</sub>(5) (Enzo Life Sciences, Inc.) i protegir les mostres de la llum.
- Incubar en un bany a 37 °C en agitació lenta durant 20 minuts.
- Centrifugar a 1200 rpm durant 4 minuts.
- Retirar el sobrenedant i resuspendre amb 1 ml de DMEM fresc.
- Centrifugar a 1200 rpm durant 4 minuts.
- Retirar el sobrenedant i resuspendre el sediment amb 0.5 ml de DMEM més 5  $\mu$ g/ml de iodur de propidi (Sigma-Aldrich Co.).
- Anàlisi mitjançant citòmetre, amb longitud d'ona d'excitació de 638 nm i longitud d'ona d'emissió de 658 nm.

### **IX.3 Mesura de l'apoptosi**

L'apoptosi és una forma de mort cel·lular programada. Per tant, determinar si unes determinades condicions experimentals desemboquen en la mort de la cèl·lula pot resultar de cert interès. El mètode que utilitzem és el de *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Pharmingen™), el qual es basa en la doble tinció amb iodur de propidi i annexina V-FITC. El programa apoptòtic comporta una

sèrie de canvis morfològics. Un dels primers canvis que tenen lloc és la pèrdua de l'asimetria de la membrana plasmàtica caracteritzada per la translocació del fosfolípid fosfatidilserina (PS) de la capa interna a l'externa, quedant exposat al medi extracel·lular. L'annexina V és una proteïna d'unió a fosfatidils dependent de  $Ca^{2+}$ , de manera que quan els PS siguin translocats, l'annexina s'uneix a ells i gràcies a la seva conjugació amb la molècula fluorescent FITC, se'n pot detectar el seu senyal per citometria. Per la seva banda, el IP (tal i com s'explica en el punt IX.2) només es detecta quan la membrana plasmàtica es troba fragmentada (procés que té lloc en l'etapa final de l'apoptosi o en cèl·lules necròtiques), sent un indicador de mort cel·lular sense distingir els dos mecanismes de mort cel·lular. Per tant, el sistema permet distingir les cèl·lules viables (doble negatives), les apoptòtiques (annexina V positives – IP negatives) i les necròtiques (doble positives).

#### *Procediment*

- Recollir el medi de cultiu (on hi trobem les cèl·lules flotants).
- Afegir 1 ml/pou de PBS 1x i recuperar-lo en el mateix tub on hem recollit el medi.
- Aixecar les cèl·lules amb 200  $\mu$ l/pou de tripsina i resuspendre-les amb 2 ml de PBS 1x que també s'unirà a les recol·leccions anteriors.
- Realitzar una mesura automatitzada (punt I.2.3) per a conèixer el número de cèl·lules de cada mostra.
- Centrifugar a 1200 rpm durant 4 minuts.
- Fer un rentat amb 1 ml de PBS 1x.
- Centrifugar el volum necessari d'aquesta suspensió per a disposar de  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules a 1200 rpm durant 4 minuts.
- Resuspendre el sediment de cèl·lules amb 1 ml de *Binding Buffer* 1x (Kit).
- Incubar 100  $\mu$ l de la suspensió cel·lular amb 5  $\mu$ l de iodur de propidi i 5  $\mu$ l d'annexina V (Kit).
- Incubar durant 15 minuts a temperatura ambient protegit de la llum.
- Afegir 400  $\mu$ l/mostra de *Binding Buffer* 1x per tal d'aturar el marcatge.
- Anàlisi mitjançant citòmetre (en menys d'una hora des del marcatge).

## IX.4 Mesura del cicle cel·lular

Així com en determinades condicions experimentals es pot promoure l'apoptosi, en altres pot haver-hi una estimulació o inhibició de la divisió cel·lular. Una de les maneres de mesurar-ho és quantificant l'augment de la població cel·lular (comptatge, tinció de la proteïna total), però no sempre ha d'haver-hi un increment net del número de cèl·lules ja que, tot i haver-hi l'estímul proliferatiu, el cicle cel·lular pot quedar aturat en algun dels *checkpoints*. Per a determinar canvis en les diferents fases del cicle cel·lular (Sub-G<sub>1</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>) es realitza una tinció amb iodur de propidi, el qual és una molècula fluorescent que penetra dins les cèl·lules fixades amb etanol (membrana permeable) i s'intercala al DNA, el que ens permet quantificar el número de cèl·lules que es troba en cada fase d'acord amb la quantitat de DNA/cèl·lula.

### *Procediment*

- Recollir el medi de cultiu (on hi trobem les cèl·lules flotants).
- Afegir 1 ml/pou de PBS 1x i recuperar-lo en el mateix tub on hem recollit el medi.
- Aixecar les cèl·lules amb 200 µl/pou de tripsina i resuspendre-les amb 2 ml de PBS 1x que també s'unirà a les recol·leccions anteriors.
- Realitzar una mesura automatitzada (punt 1.2.3) per a conèixer el número de cèl·lules de cada mostra.
- Centrifugar a 1200 rpm durant 4 minuts.
- Resuspendre el sediment cel·lular amb el volum de PBS 1x adequat per a obtenir una concentració de  $1-5 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml.
- Afegir 10 ml d'etanol al 70% fred durant un mínim de 2 hores a 4 °C.
- Centrifugar les cèl·lules fixades amb l'etanol a 1200 rpm durant 10 minuts.
- Resuspendre el sediment amb 500 µl de tampó d'extracció de DNA (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M – Àcid cítric 0.1 M (96:4 v/v), pH 7.8) i incubar a 37 °C en agitació durant 30 minuts.
- Centrifugar a 1500 xg durant 10 minuts.

- Resuspendre el sediment amb 500  $\mu$ l de solució de iodur de propidi (20  $\mu$ g/ml de iodur de propidi, 200  $\mu$ g/ml d'RNasa A (Roche) i 0.1% Tritó X-100 en PBS 1x).
- Incubar a temperatura ambient durant 30 minuts protegit de la llum.
- Anàlisi mitjançant citòmetre.

## X. MESURA DE ROS PER FLUORIMETRIA

Un altre sistema utilitzat en el present treball per a mesurar la producció de ROS intracel·lular diferent a la citometria de flux (detallat en el punt IX.1), és el que utilitza el *OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Green Fluorescence)* (Cell Biolabs, Inc.), el qual es basa en la capacitat fluorogènica de la molècula 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH) quan és oxidada per ROS. Breument, la 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetat (DCFH-DA), penetra la membrana plasmàtica i és desacetil·lada per estereses cel·lulars, donant lloc a la molècula reduïda, no fluorescent, de la 2',7'-diclorodihidrofluorescina (DCFH), la qual és oxidada per ROS, donant lloc a la forma fluorescent de la DCF. La intensitat de fluorescència és proporcional als nivells de ROS citosòlics.

### *Procediment*

- Preparar els diferents medis i reactius a utilitzar durant l'assaig:
  - o Diluir la sonda DCFH-DA 20x al 0.1x en DMEM, sabent que es necessiten 1 ml/pou.
  - o Preparar un banc de dilucions de DCF (inclòs en el kit) des de 0.01 nM fins a 10  $\mu$ M (incloent un blanc) en DMEM, per tal d'obtenir la recta patró, sabent que es necessiten 75  $\mu$ l/pou de cada punt i per duplicat.
  - o Preparar una dilució de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM (kit) en medi DMEM, per a realitzar els tractaments dels controls positius, sabent que es necessiten 1 ml/pou.

## Metodologia

- o Diluir a 1x el *Cell Lysis Buffer 2x* en DMEM, sabent que es necessiten 250  $\mu\text{l}$ /pou per a la lisi de les mostres i 75  $\mu\text{l}$ /pou, i per duplicat, per a diluir els punts de la recta patró.
- Retirar el medi de creixement de les cèl·lules i rentar amb PBS 1x (2-3 vegades).
- Afegir 1 ml/pou de DCFH-DA 0.1x i incubar a les fosques durant 1 hora.
- Retirar el medi de marcatge i rentar amb PBS 1x (2-3 vegades).
- Realitzar el tractament dels pous dels controls positius amb 1 ml/pou de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM. A la resta de pous que no s'han de tractar, afegir 1 ml/pou de DMEM. Incubar durant 20 minuts.
- Retirar els medis i rentar amb PBS 1x.
- Lisar les cèl·lules afegint 250  $\mu\text{l}$ /pou de *Cell Lysis Buffer* 1x i agitant les plaques horitzontalment durant 5 minuts.
- Dispensar 75  $\mu\text{l}$ /pou, en una placa de 96 pous opaca de color negre amb fons transparent, de cada una de les dilucions de la recta patró (duplicat) i afegir 75  $\mu\text{l}$ /pou de *Cell Lysis Buffer* 1x.
- Dispensar 150  $\mu\text{l}$ /pou de mostra i guardar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  el volum restant per a posteriorment quantificar la concentració de proteïna (correcció mesures ROS).
- Mesura de la fluorescència de les mostres i patró mitjançant el fluorímetre de placa *FLUOstar OPTIMA* (BMG Labtechnologies), tenint en compte que el pic d'excitació màxim del DCF és de 485 nm i el d'emissió és de 538 nm.
- Interpolar els valors d'absorbància de les mostres a la recta patró, corregint les concentracions dels seus punts degut a què en cada pou s'ha diluït el patró a la meitat i representada en forma log-log, per tal d'obtenir la concentració de les mostres.

## XI. MEDIS CONDICIONATS

Determinades condicions experimentals poden comportar l'activació de certes vies de senyalització que acabin en la inducció i producció de factors que són secretats al medi, com poden ser les interleucines. Per a comprovar que la inducció gènica d'aquests factors es tradueix en el seu alliberament al medi, en aquells casos en què la concentració d'aquestes interleucines és massa baixa per a ser detectada per ELISA, s'ha optat per l'ús de medis condicionats. Aquest mètode es basa en incubar cèl·lules control amb els medis provinents de les cèl·lules tractades. En el nostre cas, s'ha treballat amb dos dissenys experimentals diferents:

A) Incubació amb medis provinents de cèl·lules transfectades amb els shRNA i anàlisi de l'expressió gènica de les cèl·lules incubades

### *Procediment*

- Transfecció de la línia cel·lular corresponent amb els shRNA (segons el mètode explicat en el punt III.1) durant el temps determinat.
- Recol·lecció del medi de cada un dels pous de cada condició, creant un únic *pool* per cada shRNA i lisat de les cèl·lules per a l'anàlisi de l'expressió gènica (segons el procediment detallat en el punt V). No és necessari destinar tots els punts a comprovar l'èxit de l'shRNA (suficient amb duplicat o triplicat per shRNA).
- Si s'escau, divisió del medi en diferents condicions i addició dels tractaments adients (per exemple, anticòs anti-TNF- $\alpha$ ) i incubació de cèl·lules sembrades 24 hores abans durant el temps pertinent.
- Lisat de les cèl·lules per a l'anàlisi de l'expressió gènica (segons el procediment detallat en el punt V).

B) Incubació amb medis provinents de cèl·lules transfectades amb els shRNA i anàlisi de l'activitat luciferasa regulada pel promotor d'NF- $\kappa$ B, el qual conté llocs de regulació per TNF- $\alpha$ .



## Metodologia

### Procediment

- Transfecció de la línia cel·lular corresponent amb els shRNA (segons el mètode explicat en el punt III.1) durant el temps determinat.
- Recol·lecció del medi de cada un dels pous de cada condició, creant un únic *pool* per cada shRNA i lisat de les cèl·lules per a l'anàlisi de l'expressió gènica (segons el procediment detallat en el punt V). No és necessari destinar tots els punts a comprovar l'èxit de l'shRNA (suficient amb duplicat o triplicat per shRNA).
- Si s'escau, divisió del medi en diferents condicions i addició dels tractaments adients (per exemple, anticòs anti-TNF- $\alpha$ ) i incubació de cèl·lules transfectades, 24 hores abans, amb els vectors d'expressió d'NF- $\kappa$ B-Luc i pRL-CMV-Renilla (control de transfecció) durant el temps pertinent.
- Mesura de les activitats luciferasa de les cèl·lules incubades utilitzant el sistema *Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay* (Promega Co.), que breument consisteix en:
  - o Retirar els medis i rentar amb PBS 1x (congelar les plaques si es vol posposar la lectura).
  - o Afegir 500  $\mu$ l/pou de *Passive Lysis Buffer* 1x (kit) i agitar les plaques horitzontalment durant 15 minuts.
  - o Dispensar 20  $\mu$ l/pou dels lisats en una placa blanca opaca.
  - o Realitzar la lectura de luminiscència mitjançant un luminòmetre amb doble injector (*GloMax* de Promega) amb els següents paràmetres:
    - Addició automatitzada, mitjançant el primer injector, de 25  $\mu$ l/pou de *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) (kit).
    - Interval de 2 segons entre l'addició del LAR II i l'inici de la lectura.
    - Lectura integrada de 10 segons de l'activitat de la luciferasa de la *Photinus pyralis*.
    - Addició automatitzada, mitjançant el segon injector, de 25  $\mu$ l/pou de *Stop & Glow<sup>®</sup> Reagent* (kit).
    - Interval de 2 segons entre l'addició del LAR II i l'inici de la lectura.

- Lectura integrada de 10 segons de l'activitat de la luciferasa de la *Renilla reniforme*.
- o Corregir els valors de la luciferasa de *P. pyralis* amb els de *R. reniforme*.

## XII. QUANTIFICACIÓ DE CITOQUINES EN MEDIS

Per a la quantificació de citoquines en medis de cultiu es va utilitzar el kit de MILLIPLEX® MAP, basat en el sistema de Luminex® xMAP® de Linco Research/Millipore (Billerica, MA), que consisteix en el reconeixement de les diferents citoquines dels medis (25 µl) per anticossos units a *beads* marcades amb un tint fluorescent específic per a cada citoquina. Aquesta combinació de colors permet la detecció de diferents citoquines en una mateixa mostra, mitjançant la detecció de la fluorescència emesa per les microesferes després de la seva excitació per un làser amb l'equip Luminex100ISv2.

## XIII. MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

En els experiments de transfecció i transducció, es pot comprovar, d'una manera qualitativa, l'èxit del mètode a través de l'observació per microscòpia de fluorescència les cèl·lules, sempre i quan s'hagin cotransfectat amb el vector d'expressió de GFP o els vectors adenovírics produeixin una proteïna de fusió amb GFP. En el cas de la cotransfecció transitòria, s'ha de tenir en compte que la quantitat de plasmidi és un 5% respecte el DNA total i, per tant, s'ha de tenir en compte a l'hora d'avaluar el grau d'eficiència.

El microscopi utilitzat és el model *Leica DM IRB* (Leica Microsystems Ltd.) acoblat a una font de fluorescència (bombeta de mercuri) *ebq100 isolated*. En el

## Metodologia

cas de necessitar l'obtenció de fotografies, la captació de les imatges s'ha realitzat amb l'aplicació informàtica associada al microscopi *Leica Application Suite*.

## XIV. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Per a realitzar l'anàlisi estadístic dels diferents resultats, s'ha utilitzat el paquet estadístic *Prism 5* (GraphPad). Per a les comparacions entre 2 grups de mostres s'ha aplicat un test t-Student i per a les comparacions entre més de 2 grups mostrals s'ha utilitzat un test *ANOVA one-way* amb el post-test de Tuckey (anàlisi entre tots els grups. Per a les comparacions on intervenen 2 variables s'ha optat per a aplicar un test *ANOVA two-way* amb el post-test de Bonferroni, que permet la comparació, un per un, dels diferents grups.

A més, sempre s'ha aplicat el Test de Grubbs (mètode ESD) per a els trobar valors atípics (*outliers*) de cada grup i poder-los descartar, abans d'aplicar cap test estadístic.

Al representar els nivells de significació, el número de símbols utilitzat en cada cas, 1, 2 o 3, indica  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  o  $P < 0.001$ , respectivament.





## RESULTATS



## I. ESTUDI DELS CANVIS EN L'EXPRESSION GÈNICA DE LES ISOFORMES DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA DEPENDENTS DEL METABOLISME I DE L'ESTAT DE PROLIFERACIÓ EN LÍNIES CEL·LULARS HUMANES I DE RATOLÍ.

En el present treball s'han utilitzat diverses línies cel·lulars, tant d'origen humà (HeLa, HepG<sub>2</sub>, SGBS) com de ratolí (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, HIB-1B, 3T3-L1), amb l'objectiu d'estudiar si existeix una relació específica de l'expressió de les isoformes d'ANT amb el metabolisme energètic i la capacitat proliferativa de les cèl·lules. En aquest sentit, les isoformes estudiades han estat les ANT1, ANT2 i ANT3 humanes i les ANT1 i ANT2 de ratolí. En ambdós casos no s'ha realitzat cap estudi al voltant de la isoforma 4 de cada espècie, degut a què la seva expressió es troba limitada a cèl·lules germinals. En aquesta primera part, s'han caracteritzat els canvis en l'expressió gènica de les diferents isoformes associats a l'estat de proliferació i a canvis en el metabolisme oxidatiu-glucolític.

Per tal de diferenciar les diferents isoformes, d'ara endavant identificarem les isoformes humanes com hANT1, hANT2 i hANT3 (d'*Homo sapiens*) i les isoformes de ratolí com mANT1 i mANT2 (de *Mus musculus*).

### I.1 HeLa

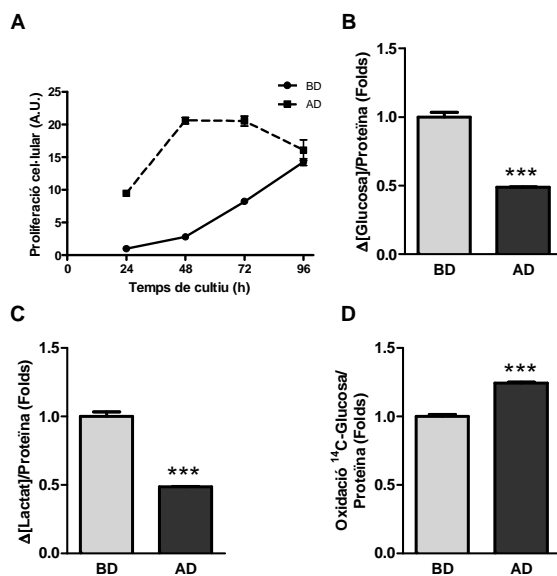
Les cèl·lules HeLa són cèl·lules epitel·lials humanes provinents de carcinoma de cèrvix, les quals, com la majoria de línies tumorals, presenten una expressió alta d'ANT2 (Chevrollier et al., 2011). En el nostre cas, s'han estudiat els canvis en el patró d'expressió gènica de les isoformes hANT1, hANT2 i hANT3 en funció de si les cèl·lules es troben en proliferació o confluència i si existeix una associació amb l'estat metabòlic concret de cada situació (glucolític o oxidatiu).



## Resultats

Es van sembrar cèl·lules HeLa a baixa (50.000 cèl·lules/pou) o alta (500.000 cèl·lules/pou) densitat en plaques de 6 pous. Aquestes dues densitats ens van permetre treballar amb cèl·lules capaces de mantenir una elevada taxa de proliferació (baixa densitat) i cèl·lules que assoleixen ràpidament un estat de confluència i, per tant, amb baixa capacitat proliferativa (alta densitat). Primer de tot, es va determinar la velocitat de creixement cel·lular mitjançant la tinció amb sulfurodamina B de les cèl·lules fixades en la placa de cultiu cada 24 hores (Figura 13A). Així, s'observa com les cèl·lules sembrades a baixa densitat (BD) mantenen una taxa de divisió elevada durant les 96 hores de cultiu. En canvi, les cèl·lules sembrades a alta densitat (AD) arriben a confluència a les 24 hores de cultiu, aturant el seu creixement durant les 72 hores restants de l'experiment. Una vegada determinada la taxa de proliferació de cada cultiu, es va caracteritzar el perfil metabòlic associat a cada una. Les cèl·lules sembrades a alta densitat presenten aproximadament un 50% de consum de glucosa (Figura 13B) i de producció de lactat (Figura 13C) inferior a les cèl·lules sembrades a baixa densitat. A més, la capacitat per a oxidar glucosa de les cèl·lules sembrades a alta densitat és un 25% superior (Figura 13D).

Per tant, les cèl·lules HeLa sembrades a alta densitat (AD) tenen una baixa taxa de creixement i una marcada reducció del metabolisme glucolític en comparació a les cèl·lules sembrades a baixa densitat (BD), les quals mantenen la seva capacitat proliferativa.

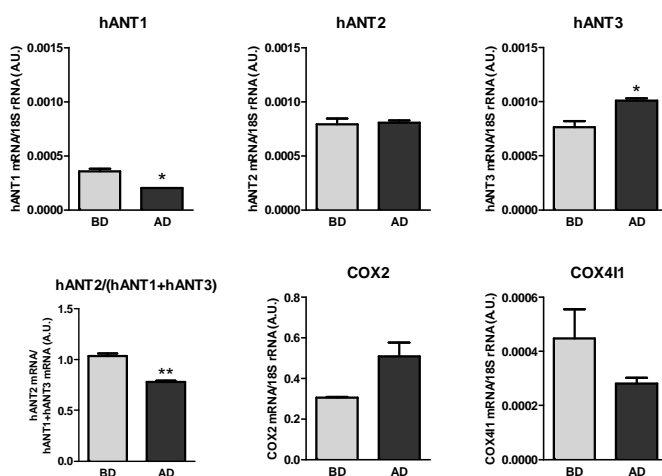


**Figura 13. Caracterització de l'estat metabòlic de les cèl·lules HeLa sembrades a baixa (BD) o alta (AD) densitat.** (A) Quantificació de la proliferació cel·lular mitjançant tinció amb sulfurodamina B entre les 24 i 96 hores de cultiu; (B) del consum de glucosa i (C) de la producció de lactat durant 48 hores de cultiu. (D) Quantificació de l'oxidació de la glucosa marcada amb <sup>14</sup>C a les 48 hores de cultiu. \* representa diferències significatives entre BD i AD.

Amb l'objectiu de relacionar la taxa proliferativa de les cèl·lules amb una regulació específica de l'expressió gènica de les isoformes d'ANT, es van quantificar, mitjançant *real-time PCR*, els nivells de transcrit d'hANT1, hANT2 i hANT3 en cèl·lules HeLa a les 48 hores de ser sembrades a baixa o alta densitat (Figura 14). Primer de tot, podem observar com els nivells d'expressió d'hANT1 en cèl·lules HeLa són la meitat dels d'hANT2 i hANT3, i que els nivells entre aquestes dues isoformes són molt similars. Les cèl·lules HeLa sembrades a alta densitat, respecte a les sembrades a baixa densitat, tenen uns nivells d'hANT1 un 44% inferiors, uns nivells d'hANT2 similars i un augment del 32% en els d'hANT3. En funció d'aquests valors, la relació hANT2/[hANT1+hANT3] resultant és un 25% inferior en les cèl·lules sembrades a alta densitat que en les sembrades a baixa densitat. Aquesta relació hANT2/(hANT1+hANT3) és una mesura que fa referència a la proporció entre l'mRNA de la isoforma pròpia de les cèl·lules

## Resultats

tumorals i, per tant, de cèl·lules predominantment glucolítiques (hANT2), i la suma dels mRNA de les isoformes pròpies de cèl·lules oxidatives (hANT1 i hANT3). Per tant, aquesta relació la podem definir com a quocient glucolític, ja que informa de la capacitat glucolítica de les cèl·lules. No obstant, també podem constatar que aquesta relació d'isoformes correlaciona amb la capacitat proliferativa de les cèl·lules, perquè aquest índex també es podria denominar quocient proliferatiu.



**Figura 14. Patró d'expressió de les isoformes d'ANT i de COX2 i COX411 de cèl·lules HeLa sembrades a baixa (BD) o alta (AD) densitat.** Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes hANT1, hANT2, hANT3 i de la relació hANT2/(hANT1+hANT3); i de les subunitats de la citocrom c oxidasa COX2 i COX411 en cèl·lules HeLa sembrades a baixa (BD) i alta (AD) densitat a les 48 hores de cultiu. \* representa diferències significatives entre BD i AD.

A més, per tal d'esbrinar si aquests canvis transcripcionals són específics de la proteïna ANT o són part d'un programa mitocondrial que regula l'expressió de les proteïnes OXPHOS de manera generalitzada, es van determinar els nivells d'expressió de les subunitats de la citocrom c oxidasa: COX2 (codificada pel genoma mitocondrial) i COX412 (codificació nuclear). El patró d'expressió d'aquestes dues proteïnes és diferent entre elles, ja que en les cèl·lules sembrades a alta densitat COX2 té tendència a augmentar mentre que COX411 disminueix. Per tant, no podem concloure si l'expressió d'altres proteïnes mitocondrials que no

són ANT es regula d'una forma específica en funció de la capacitat proliferativa i del tipus de metabolisme energètic que presentin les cèl·lules.

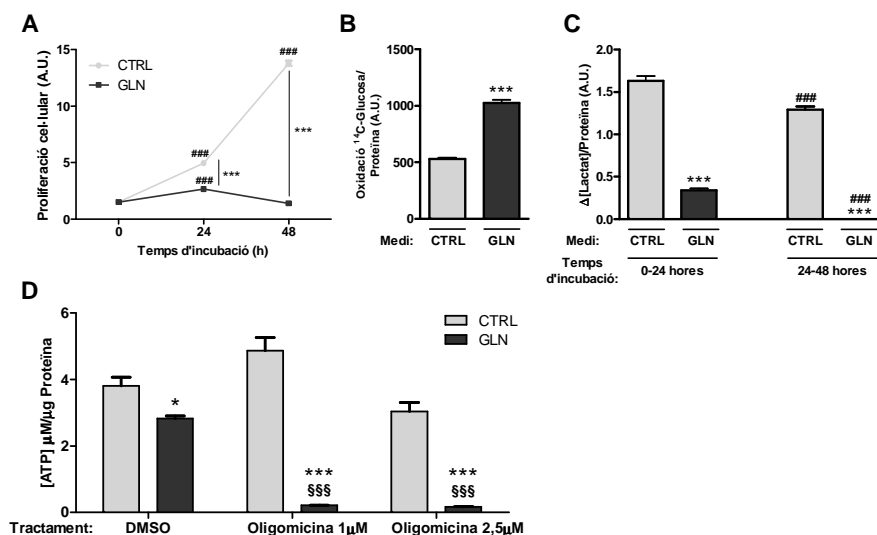
Així, les cèl·lules HeLa amb baixa capacitat proliferativa i un metabolisme oxidatiu augmentat (AD) també tenen una disminució del quocient glucolític en comparació a les cèl·lules proliferants (BD).

Havent realitzat aquesta primera aproximació, es va voler aprofundir en la regulació transcripcional de les isoformes d'ANT associada a un determinat estat de proliferació. Amb aquest objectiu, es van dissenyar dues condicions de cultiu que permetessin modificar la capacitat proliferativa de les cèl·lules.

El primer disseny experimental va consistir en estudiar l'efecte del manteniment de les cèl·lules amb diferents medis de cultiu que condicionessin, a través del substrat a utilitzar, la via metabòlica d'obtenció d'energia. Es van incubar cèl·lules HeLa durant 48 hores amb medi DMEM complet (CTRL) o amb medi DMEM sense glucosa però amb glutamina 4 mM (GLN). Mitjançant la tinció amb sulforodamina B dels cultius a les 0, 24 i 48 hores d'incubació, es va determinar la proliferació cel·lular (Figura 15A). Mentre les cèl·lules CTRL proliferen a un temps de duplicació mig d'unes 15 hores, el creixement de les cèl·lules GLN com a únic substrat energètic s'estanca. Així mateix, les cèl·lules GLN, a les 48 hores de cultiu, tenen una major capacitat oxidativa de la glucosa, propera al doble de les cèl·lules CTRL (Figura 15B), i una menor producció de lactat, la qual arriba a ser nul·la a les 24-48 hores, ja que no disposen de substrat per a realitzar la glucòlisi (Figura 15C). Per tant, les cèl·lules HeLa, quan tenen total disponibilitat de glucosa en el medi, el seu metabolisme és majoritàriament glucolític, com es demostra amb la quantificació de l'ATP intracel·lular de cèl·lules CTRL o GLN incubades amb dues concentracions d'oligomicina (1 i 2.5  $\mu$ M) durant 2 hores (Figura 15D). Així, es pot observar com la presència de glucosa (cèl·lules CTRL), la inhibició de l'ATP-sintasa per efecte de l'oligomicina no afecta a l'obtenció d'ATP i, per tant, el metabolisme mitocondrial oxidatiu no és important en l'obtenció d'energia. Contràriament, en absència de glucosa

## Resultats

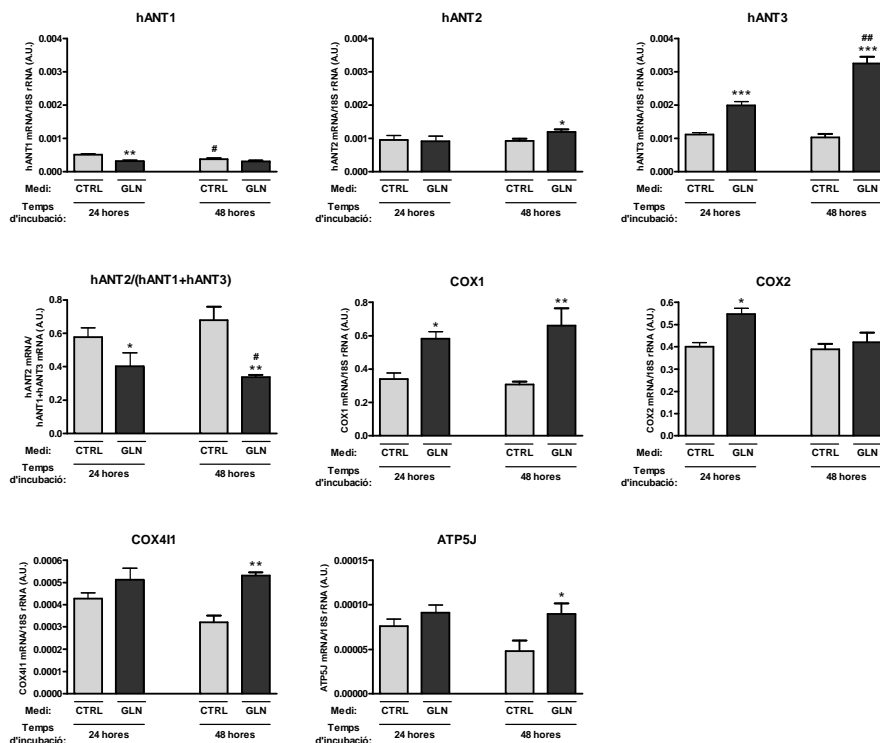
(cèl·lules GLN), hi ha una clara disminució dels nivells d'ATP, ja que aquestes cèl·lules passen a ser dependents del metabolisme oxidatiu, ja que la glutamina és l'únic substrat oxidable del que disposen.



**Figura 15. Caracterització de l'estat metabòlic de les cèl·lules HeLa incubades amb medi DMEM complet o amb només glutamina.** (A) Quantificació de la proliferació cel·lular mitjançant tinció amb sulfurodamina B a les 24 i 48 hores de cultiu; (B) de l'oxidació de la glucosa a les 48 hores de cultiu i (C) de la producció de lactat a intervals de 24 hores durant 48 hores de cultiu de cèl·lules HeLa incubades amb medi DMEM complet (CTRL) o medi sense glucosa i amb glutamina 4 mM (GLN). (D) Determinació de l'ATP intracel·lular de cèl·lules HeLa incubades amb medi CTRL o GLN i tractades amb DMSO o oligomicina (1 o 2.5 µM) durant 2 hores. \* representa diferències significatives per efecte del medi d'incubació, # entre els diferents temps d'incubació amb el mateix medi i § per efecte de l'oligomicina.

Mitjançant *real-time PCR* es va quantificar l'expressió gènica de les diferents isoformes d'ANT i d'altres proteïnes mitocondrials associada a aquestes condicions de cultiu a les 24 i 48 hores (Figura 16). L'expressió d'hANT1 disminueix lleugerament amb el temps de cultiu i també per efecte de la manca de glucosa en el medi (GLN). L'expressió d'hANT2 no varia en funció del temps de cultiu, però sí que hi ha un petit augment a les 48 hores en les cèl·lules GLN respecte les CTRL. Però el canvi més rellevant és el de l'expressió d'hANT3, la qual augmenta el doble a les 24 hores i el triple a les 48 hores quan les cèl·lules són

incubades amb el medi amb només glutamina respecte les condicions control. El quocient glucolític disminueix en la situació de dependència per la glutamina (0.70x a les 24 hores i 0.50x a les 48 hores), d'acord amb el metabolisme oxidatiu i l'aturada del creixement cel·lular que observem en aquestes condicions.



**Figura 16.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i altres proteïnes mitocondrials i reguladors metabòlics en cèl·lules HeLa incubades amb medis DMEM complet o amb només glutamina. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes hANT1, hANT2 i hANT3, així com de la relació hANT2/(hANT1+hANT3), i de les subunitats de la citocrom c oxidasa COX1, COX2 i COX41, i de la subunitat de l'ATP-sintasa ATP5J en cèl·lules HeLa incubades amb medi DMEM complet (CTRL) o amb medi sense glucosa i amb glutamina 4 mM sense glucosa (GLN) durant 48 hores. \* representa diferències significatives per efecte del medi d'incubació i # entre els diferents temps d'incubació amb el mateix medi.

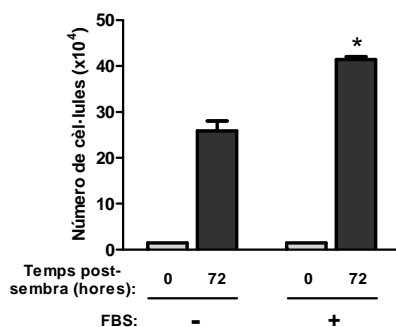
Analizant els nivells transcripcionals d'altres proteïnes mitocondrials, podem observar com les subunitats de diferents complexos del sistema OXPHOS, com són la COX1, la COX2, la COX41 i l'ATP5J, també presenten un patró

## Resultats

similar al d'hANT3. Així, la incubació amb el medi sense glucosa però amb glutamina fa que les cèl·lules HeLa tinguin uns nivells d'expressió de COX1, COX2, COX41 i ATP5J superiors a les cèl·lules control, indicant que es tracta d'un programa general d'increment de la funció OXPHOS mitocondrial sota aquestes condicions de cultiu. D'aquesta manera, podem dir que hANT3 és la isoforma que està directament lligada amb el metabolisme oxidatiu i la funció OXPHOS en cèl·lules HeLa.

Resumint, es torna a confirmar que una disminució de la proliferació en cèl·lules HeLa va associada a un augment de la capacitat oxidativa i a una disminució del quocient glucolític, principalment per l'augment de la transcripció d'hANT3.

L'altre experiment basat en la regulació de la proliferació cel·lular va consistir en incubar cèl·lules HeLa amb o sense sèrum, per tal d'esbrinar el paper que juguen els estímuls proliferatius dels factors de creixement en la regulació de les isoformes d'ANT. Així, es van sembrar 15.000 cèl·lules/pou de placa de 6-pous i es van incubar durant 72 hores amb medi complementat, o no, amb un 10% de FBS. Primer de tot es va quantificar la proliferació cel·lular de cada condició a les 72 hores de cultiu mitjançant comptatge cel·lular (Figura 17). Les cèl·lules mantingudes amb un medi deplecionat de sèrum, les quals no aturen el seu creixement i continuen proliferant, presenten un temps de duplicació de 17.52 hores, mentre que les cèl·lules incubades amb FBS al 10% el tenen de 15 hores, traduint-se en un augment del 60% de la població cel·lular a les 72 hores respecte a les cèl·lules incubades sense FBS. És important ressaltar que aquestes cèl·lules, si bé són sensibles als factors de creixement, n'han perdut la seva dependència i continuen creixent, encara que a una menor taxa, en absència de sèrum fetal.

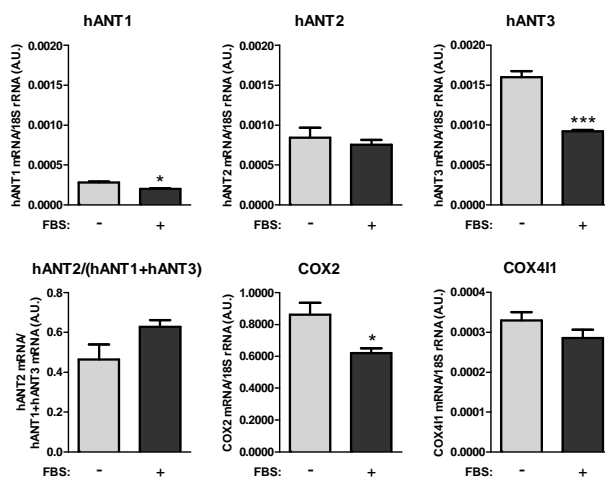


**Figura 17. Proliferació cel·lular de cèl·lules HeLa incubades amb medi DMEM complementat, o no, amb FBS.** Comptatge cel·lular a les 72 hores d'incubació de cèl·lules HeLa amb medi DMEM complementat (+ FBS), o no (- FBS), amb sèrum fetal boví al 10%. \* representa diferències significatives entre les condicions de + FBS i - FBS.

A continuació es va determinar l'expressió gènica de les isoformes d'ANT i d'altres proteïnes mitocondrials en cèl·lules HeLa mantingudes durant 72 hores amb medi complementat, o no, amb FBS 10% (Figura 18). En la condició on hi ha FBS en el medi, les cèl·lules tenen uns nivells d'hANT1 i hANT3 un 29% i un 43%, respectivament, inferiors a la situació amb manca de FBS, mentre que l'expressió d'hANT2 no es modifica. El quocient glucolític en les cèl·lules mantingudes amb FBS és un 36% superior a les incubades sense. Per últim, tant COX2 com COX411 tenen uns nivells d'expressió inferiors en les cèl·lules incubades amb FBS respecte a les que no, tot i que les diferències només són estadísticament significatives per a COX2.



## Resultats

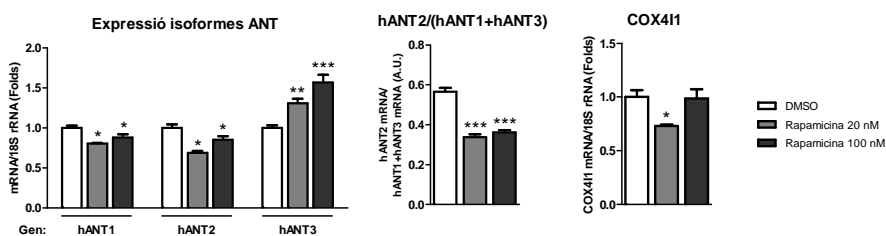


**Figura 18. Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i altres proteïnes mitocondrials en cèl·lules HeLa incubades amb medi DMEM complementat, o no, amb FBS.** Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes hANT1, hANT2, hANT3 i de la relació hANT2/(hANT1+hANT3), i de les subunitats de la citocrom c oxidasa COX2 i COX411 a les 72 hores d'incubació de cèl·lules HeLa amb medi DMEM complementat (+ FBS), o no (- FBS), amb sèrum fetal boví al 10%. \* representa diferències significatives entre les condicions de + FBS i - FBS.

En vista de què existeix una regulació de les isoformes d'ANT, especialment hANT3, per efecte dels estímuls proliferatius del FBS, es va estudiar com afecta la supressió d'una de les vies d'integració de senyals induïts pels factors de creixement, com és mTOR. Així, es van incubar cèl·lules HeLa durant 24 hores amb DMSO (vehicle) o dues concentracions diferents de rapamicina (20 o 100 nM), i es va quantificar l'expressió de les tres isoformes d'ANT i de la subunitat de la cadena respiratòria COX411 (Figura 19). La rapamicina és un inhibidor específic d'mTOR, el qual és un component del complex mTORC, clau en la integració de múltiples vies de senyalització que regulen el creixement cel·lular i la supervivència (Pallet et al., 2005). En el casos d'hANT1 i hANT2, les dues concentracions de rapamicina utilitzades disminueixen lleugerament la seva expressió, tot i que la concentració de 20 nM té un efecte més clar que la concentració de 100 nM. En canvi, el tractament amb rapamicina produeix un augment important de l'expressió d'hANT3, l'efecte de la qual és dependent de la concentració. Per tant, la inhibició d'mTOR produeix una disminució del quocient

glucolític. Pel que respecta a l'altra proteïna mitocondrial analitzada, la COX411, el tractament amb rapamicina 20 nM en disminueix la seva expressió, mentre que la concentració de 100 nM no produeix cap canvi, tenint un comportament similar a hANT1 i hANT2. La regulació d'hANT3 en cèl·lules HeLa sembla, doncs, que és específica de l'activitat d'mTOR, i que no forma part d'una resposta general de les proteïnes mitocondrials.

Per tant, quan s'eliminen els estímuls proliferatius, tant via la depleció de l'FBS en el medi de cultiu o la inhibició d'mTOR mitjançant la rapamicina, com via l'eliminació de la glucosa com a substrat energètic, les cèl·lules presenten una disminució del quocient glucolític, principalment degut a l'augment de la transcripció d'hANT3, el qual, en alguns casos va acompanyat d'un augment de la capacitat oxidativa d'aquestes cèl·lules, mentre que en altres no s'associa amb un increment d'altres proteïnes mitocondrials.



**Figura 19. Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i la COX411 en cèl·lules HeLa incubades amb DMSO o rapamicina.** Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes hANT1, hANT2, hANT3 i de la relació hANT2/(hANT1+hANT3), i de la subunitat de la citocrom c oxidasa COX411 a les 24 hores d'incubació de cèl·lules HeLa amb DMSO (vehicle) o rapamicina 20 o 100 nM. \* representa diferències significatives entre les condicions de + FBS i - FBS.

## 1.2 HepG<sub>2</sub>

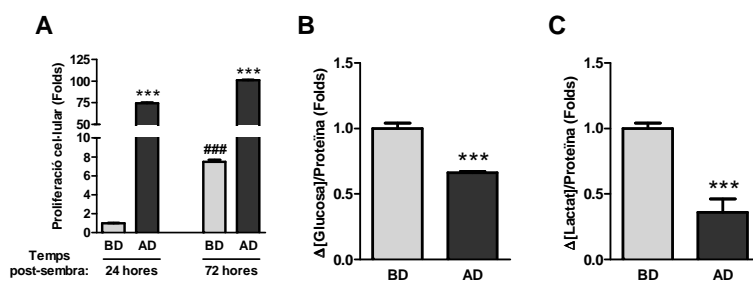
Els hepatòcits HepG<sub>2</sub> són una línia cel·lular derivada de carcinoma hepatocel·lular humà. Aquestes cèl·lules, tot i la seva procedència tumoral, en comparació a les cèl·lules HeLa presenten una major contribució de la fosforilació

## Resultats

oxidativa en la producció total d'ATP (Jose et al., 2011), proporcionant un context metabòlic diferent al de les anteriors en l'estudi del perfil transcriptòmic de les isoformes d'ANT associat a la proliferació cel·lular.

Es van sembrar cèl·lules HepG<sub>2</sub> a baixa (BD) i alta densitat (AD) seguint el mateix disseny experimental utilitzat amb les cèl·lules HeLa. Primerament es va determinar per colorimetria la capacitat proliferativa de les cèl·lules, mitjançant la tinció amb sulforodamina B a les 24 i 72 hores de cultiu (Figura 20A). Les cèl·lules HepG<sub>2</sub> sembrades a baixa densitat són capaces d'incrementar el seu nombre unes 7.5 vegades en 72 hores, pràcticament doblant la seva població cada 24 hores, mentre que les sembrades a alta densitat incrementen molt poc la seva població durant el mateix període de temps.

També es va quantificar el consum de glucosa (Figura 20B) i la producció de lactat (Figura 20C) d'aquestes cèl·lules a les 48 hores de cultiu. Les cèl·lules sembrades a alta densitat tenen un consum de glucosa un 44% inferior a les cèl·lules sembrades a baixa densitat, així com la producció de lactat, que és un 64% inferior. Clarament, les cèl·lules HepG<sub>2</sub> sembrades a alta densitat proliferen menys i són més oxidatives que les sembrades a baixa densitat.



**Figura 20. Caracterització de l'estat metabòlic de cèl·lules HepG<sub>2</sub> sembrades a baixa (BD) o alta (AD) densitat.** (A) Quantificació de la proliferació cel·lular mitjançant tinció amb sulforodamina B a les 24 i 72 hores de cultiu. (B) Quantificació del consum de glucosa i (C) de la producció de lactat durant 48 hores de cultiu. \* representa diferències significatives entre BD i AD, i # per efecte del temps de cultiu.

Mitjançant *real-time PCR* s'han analitzat els perfils d'expressió de les 3 isoformes d'ANT en les cèl·lules sembrades a baixa i alta densitat (Figura 21). Les cèl·lules HepG<sub>2</sub> tenen uns nivells basals d'hANT3 superiors als d'hANT2, tal i com demostra el valor de 0.5 del quocient glucolític, el que encaixaria amb el fenotip més oxidatiu d'aquestes cèl·lules en comparació amb les cèl·lules HeLa, les qual tenen un quocient glucolític aproximadament d'1 (Figura 14). Les cèl·lules HepG<sub>2</sub> sembrades a alta densitat presenten uns nivells d'hANT1 lleugerament inferiors i uns nivells d'hANT2 molt similars a les cèl·lules sembrades a baixa densitat, però sobretot presenten un important augment de la transcripció d'hANT3, arribant a ser més d'un 80% superior. En conseqüència, el quocient glucolític de les cèl·lules sembrades a alta densitat és un 33% inferior al de les cèl·lules HepG<sub>2</sub> sembrades a baixa densitat.

A més, també s'han quantificat els nivells d'expressió de COX1, COX4I1, ATP5J i GLUT1. Curiosament, tot i la disminució de la glucòlisi, les cèl·lules sembrades a alta densitat presenten una disminució de l'expressió de les proteïnes del sistema OXPHOS. No obstant, cal tenir present que aquestes proteïnes presenten una important regulació posttranscripcional, pel que aquests canvis a nivell transcripcional poden no ser de fàcil interpretació. Pel que fa a l'expressió del transportador de la glucosa GLUT1, aquesta també disminueix, però aquest cas sí coincidiria amb una menor demanda de glucosa per part de les cèl·lules sembrades a alta densitat.

Per tant, de forma molt similar al que passa amb les cèl·lules HeLa, una disminució de la proliferació en les cèl·lules HepG<sub>2</sub> va acompanyada d'una disminució de la glucòlisi, canvi metabòlic que queda reflectit en la disminució del quocient glucolític.

## Resultats

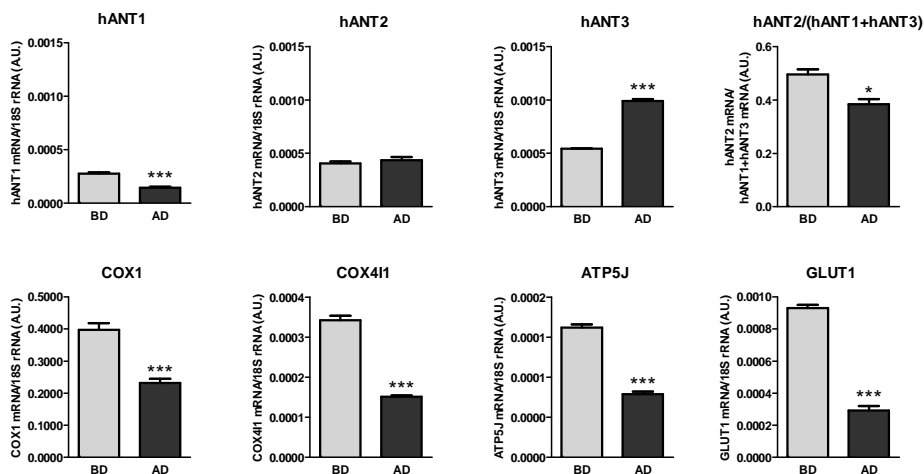


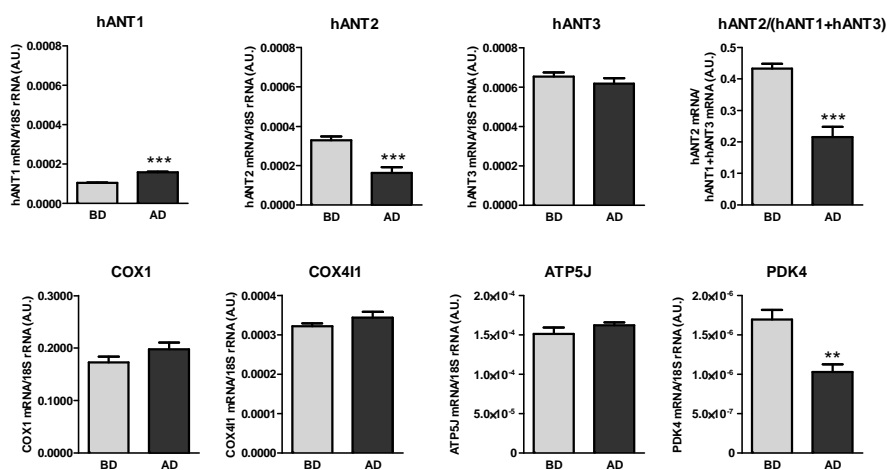
Figura 21. Patró d'expressió de les isoformes d'ANT i de COX1, COX411, ATP5J i GLUT1 de cèl·lules HepG<sub>2</sub> sembrades a baixa (BD) o alta (AD) densitat. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes hANT1, hANT2, hANT3 i de la relació hANT2/(hANT1+hANT3); i de les subunitats de la citocrom c oxidasa COX1 i COX411, de la subunitat de l'ATP-sintasa ATP5J i del transportador de la glucosa GLUT1 en cèl·lules HepG<sub>2</sub> sembrades a baixa (BD) i alta (AD) densitat a les 48 hores de cultiu. \* representa diferències significatives entre BD i AD.

### I.3 SGBS

Amb el mateix objectiu amb què s'han utilitzat les cèl·lules HepG<sub>2</sub>, també s'ha estudiat el perfil d'expressió de les diferents isoformes d'ANT en els preadipòcits SGBS, que és una línia cel·lular d'origen fibroblàstic derivada d'un afectat per la síndrome de Simpson-Golabi-Behmel. Aquesta línia cel·lular presenta característiques similars a un cultiu primari d'adipòcits.

Seguint el mateix disseny experimental, es van cultivar cèl·lules SGBS sembrades a baixa (BD) i alta densitat (AD) durant 48 hores. Mitjançant *real-time PCR* es va quantificar l'expressió gènica de les diferents isoformes d'ANT així com d'altres proteïnes mitocondrials (Figura 22). En comparació amb les cèl·lules HeLa, les cèl·lules SGBS tenen uns nivells d'expressió d'hANT3 molt superiors als d'hANT2 i hANT1, d'una manera similar al que s'observa en les cèl·lules HepG<sub>2</sub>,

tot i que també són més alts que els d'aquestes. Això fa que el quocient glucolític de les cèl·lules SGBS es situï a prop del 0.4, el que correlacionaria amb un metabolisme més oxidatiu que el de les cèl·lules HeLa i HepG<sub>2</sub>. Els preadipòcits SGBS sembrats a alta densitat augmenten l'expressió d'hANT1 en un 52% i disminueixen la d'hANT2 en un 51%, mentre que l'expressió d'hANT3 pràcticament no varia. El resultat final torna a ser la disminució del quocient glucolític (50% inferior) en les cèl·lules SGBS sembrades a alta densitat respecte les sembrades a baixa densitat.



**Figura 22.** Patró d'expressió de les isoformes d'ANT i de COX1, COX411, ATP5J i PDK4 de cèl·lules SGBS sembrades a baixa (BD) o alta (AD) densitat. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes hANT1, hANT2, hANT3 i de la relació hANT2/(hANT1+hANT3); i de les subunitats de la citocrom c oxidasa COX1 i COX411, de la subunitat de l'ATP-sintasa ATP5J i de la PDK4 en cèl·lules SGBS sembrades a baixa (BD) i alta (AD) densitat a les 48 hores de cultiu. \* representa diferències significatives entre BD i AD.

Paral·lelament, també s'han analitzat els nivells d'expressió d'altres gens corresponents a proteïnes mitocondrials involucrades en la fosforilació oxidativa i en la regulació del metabolisme glucolític. Les subunitats de la citocrom c oxidasa COX1 i COX411, i la subunitat ATP5J de l'ATP-sintasa no veuen alterada la seva expressió. Emperò, sí s'observa una important disminució de l'expressió de la PDK4 en les cèl·lules sembrades a alta densitat respecte les sembrades a baixa. La

## Resultats

PDK4 actua com a inhibidor de la piruvat deshidrogena (PDH), la qual catalitza el pas del piruvat a acetil-coA i la seva posterior entrada a cicle de Krebs. Per tant, la seva disminució podria indicar un augment de la via oxidativa de la glucosa (Sugden and Holness, 2003).

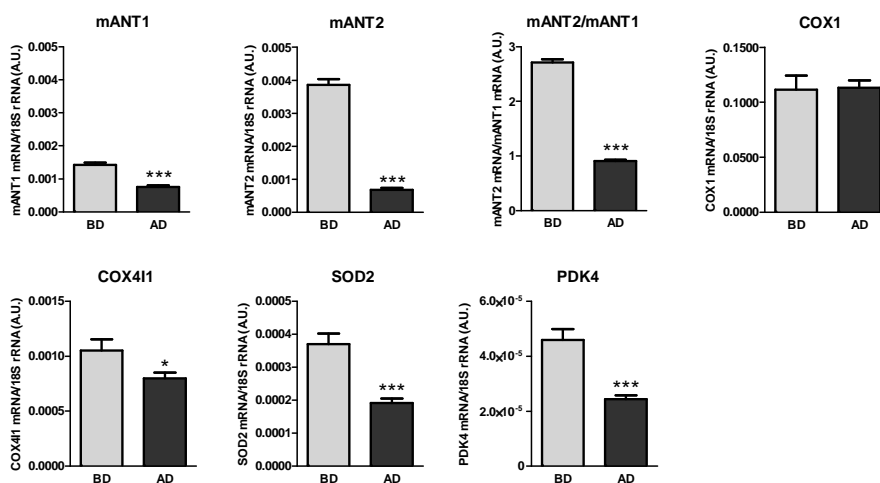
### I.4 HIB-1B

De la mateixa manera que s'ha estudiat el perfil d'expressió de les isoformes d'ANT en diferents línies cel·lulars humanes, també s'ha dut a terme aquesta caracterització en diverses línies cel·lulars de ratolí. En aquest punt, cal remarcar que en ratolins només s'han descrit 3 isoformes d'ANT (a diferència de les 4 humanes): mANT1, mANT2 i mANT4. En aquest sentit, s'ha de tenir en compte que la relació mANT2/mANT1 no té el mateix sentit metabòlic que la relació hANT2/(hANT1+hANT3), la qual és utilitzada com un indicador glucolític en humans, ja que mANT1 és la isoforma pròpia de múscul i cervell (cèl·lules altament oxidatives) i mANT2 és la isoforma ubiqua que s'expressa tant en cèl·lules proliferatives (glucolítiques) com en les altament oxidatives. Per tant, en ratolí, no existeix una isoforma exclusiva de cèl·lules oxidatives i una de cèl·lules glucolítiques i, en conseqüència, la relació mANT2/mANT1 només serveix com a indicador de la quantitat relativa de cada isoforma.

Les cèl·lules HIB-1B són preadipòcits de ratolí amb capacitat per diferenciar-se i expressar la proteïna desacobladora UCP1, específica de teixit adipós marró. En la seva forma fibroblàstica, presenten una alta capacitat proliferativa. És per això que també s'ha estudiat el perfil d'expressió de les isoformes ANT, i altres proteïnes mitocondrials, en aquest tipus cel·lular, el qual és diferent a altres línies cel·lulars amb capacitat de diferenciar-se, com els adipòcits 3T3-L1 o els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

Es van sembrar cèl·lules HIB-1B a baixa (BD) i alta densitat (AD) (50.000 o 500.000 cèl·lules/pou, respectivament) i es van mantenir durant 48 hores (Figura

23). Primer de tot, destacar que aquestes cèl·lules tenen uns nivells basals d'expressió d'mANT2 unes 3 vegades superiors als d'mANT1, el que lligaria amb l'elevat potencial proliferatiu d'aquestes cèl·lules. Les cèl·lules sembrades a alta densitat tenen uns nivells d'expressió d'mANT1 un 47% i d'mANT2 un 82% inferiors als de les cèl·lules sembrades a baixa densitat. Degut a que la baixada d'ANT2 és quantitativament molt superior a la d'mANT1, la relació mANT2/mANT1 en les cèl·lules AD és 2.99 vegades més baixa que en BD. Per altra banda, les proteïnes mitocondrials COX411, SOD2 i PDK4 disminueixen la seva expressió en les cèl·lules sembrades a alta densitat, mentre que COX1 no varia. En aquesta situació, una disminució de PDK4 suposaria un augment del metabolisme oxidatiu, el que correlacionaria amb l'aturada de la proliferació. Tanmateix, aquest suposat augment de l'activitat OXPPOS no va acompanyat d'un augment transcripcional d'altres proteïnes mitocondrials.



**Figura 23. Patró d'expressió de les isoformes d'ANT i de COX1, COX411, SOD2 i PDK4 de cèl·lules HIB-1B sembrades a baixa (BD) o alta (AD) densitat.** Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes mANT1, mANT2, i de la relació mANT2/mANT1; i de les subunitats de la citocrom c oxidasa COX1 i COX411, de la SOD2 i de la PDK4 en cèl·lules HIB-1B sembrades a baixa (BD) i alta (AD) densitat a les 48 hores de cultiu. \* representa diferències significatives entre BD i AD.

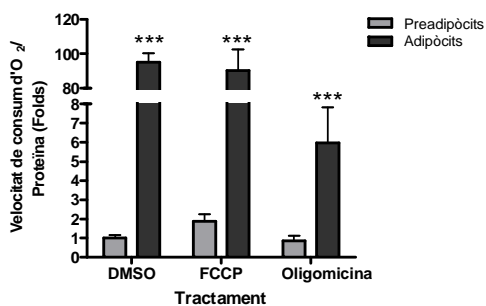


## Resultats

Per tant, una disminució de la proliferació va acompanyada d'una important disminució de la relació mANT2/mANT1, sobretot pel descens de l'expressió d'mANT2.

### I.5 3T3-L1

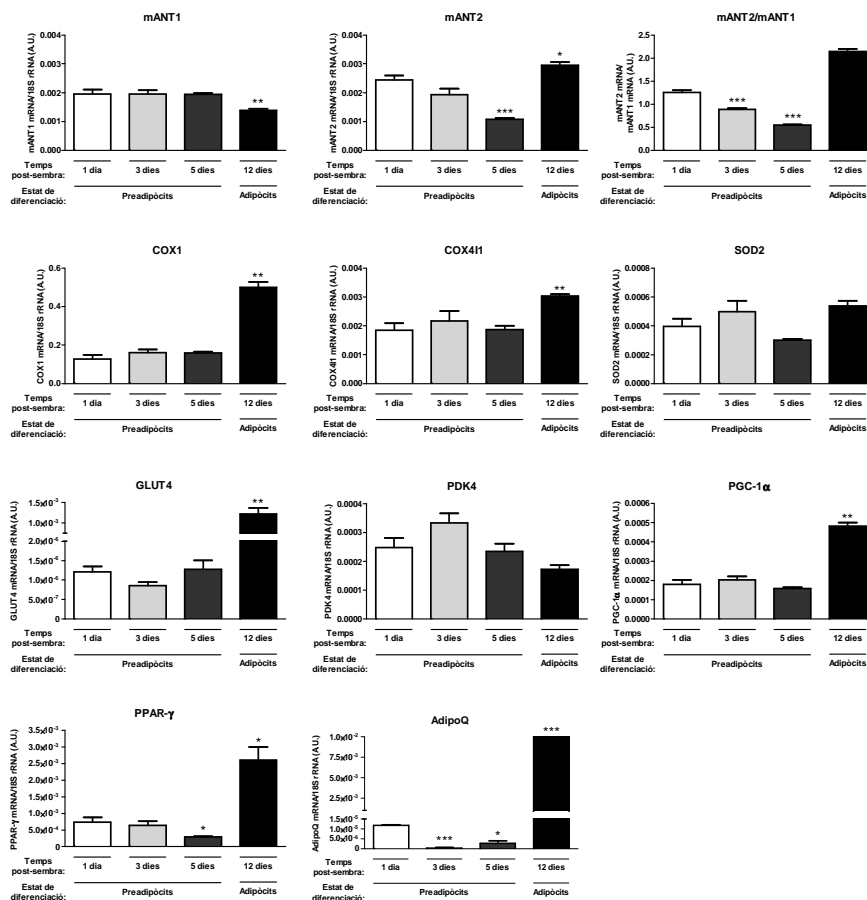
Les cèl·lules 3T3-L1 són una línia cel·lular provinent de teixit adipós blanc de ratolí, amb capacitat per a diferenciar-se a adipòcit madur i acumular vacuoles lipídiques. Es van dur a terme simultàniament un cultiu de preadipòcits i un d'adipòcits 3T3-L1 i es va quantificar la velocitat de consum d'oxigen (Figura 24). Els adipòcits presenten una velocitat de consum basal (DMSO) 95 vegades superior a la dels preadipòcits. Cal destacar, que aquesta velocitat de consum d'oxigen és la màxima que poden assolir aquestes cèl·lules, ja que és igual a la velocitat de consum d'oxigen que es pot observar quan els adipòcits són tractats amb el desacoblant de la cadena FCCP. En aquesta situació de desacoblament (FCCP), els preadipòcits només presenten un lleuger augment de la velocitat de consum, el que demostra que l'activitat mitocondrial d'aquestes cèl·lules és molt baixa. Quan la mesura del consum d'oxigen es realitza en presència d'oligomicina (10  $\mu$ M), que permet conèixer l'estat d'acoblament dels mitocondris, els preadipòcits tenen un consum d'oxigen més de 6 vegades inferior al basal, mentre que en els adipòcits és més de 15 vegades inferior al seu consum basal. Malgrat aquesta elevada inhibició del consum d'oxigen per part de l'oligomicina, els adipòcits continuen tenint una velocitat de consum 7 vegades superior a la dels preadipòcits.



**Figura 24. Quantificació de la velocitat de consum d'oxigen en preadipòcits i adipòcits 3T3-L1.** Quantificació de la velocitat del consum d'oxigen de preadipòcits i adipòcits, corregida per proteïna en condicions basals (DMSO), de desacoblament de la cadena respiratòria (FCCP 10  $\mu$ M) o d'inhibició de la mateixa (Oligomicina 10  $\mu$ M). \* representa diferències entre preadipòcits i adipòcits.

Per a l'anàlisi transcripcional, es va realitzar un cultiu de cèl·lules 3T3-L1 durant 12 dies de cultiu, disposant de mostres dels dies 1, 3, 5 i 12. Els tres primers temps corresponen a cèl·lules en estat preadipocitari, mentre que el cultiu de 12 dies està format per adipòcits madurs (Figura 25). A nivell basal, els nivells d'expressió d'mANT1 i mANT2 són molt similars en els preadipòcits, mentre que en els adipòcits madurs, l'expressió d'mANT2 és el doble de la d'mANT1. Això es deu a que l'expressió d'mANT1 es manté constant en els preadipòcits i disminueix lleugerament en els adipòcits, mentre que l'expressió d'mANT2 en els preadipòcits disminueix amb el temps, però augmenta en els adipòcits un 21% respecte els nivells inicials. Per tant, la relació mANT2/mANT1 en els preadipòcits disminueix constantment a mida que els preadipòcits arriben a la confluència, però augmenta amb la diferenciació dels adipòcits.

## Resultats



**Figura 25.** Patró d'expressió de les isoformes d'ANT i de COX1, COX411, SOD2, GLUT4, PDK4, PGC-1α, PPAR-γ i AdipoQ de preadipòcits i adipòcits 3T3-L1 a diferents temps de cultiu. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes mANT1, mANT2 i de la relació mANT2/mANT1; i de les subunitats de la citocrom c oxidasa COX1 i COX411, de la SOD2, de la GLUT4, de la PDK4, del PGC-1α, de la PPAR-γ i de l'AdipoQ en preadipòcits i adipòcits 3T3-L1 a 1, 3, 5 i 12 dies de cultiu. \* representa diferències significatives entre preadipòcits (1 dia) i la resta de temps de cultiu.

Les subunitats de la citocrom c oxidasa COX1 i COX411 mostren una tendència a augmentar la seva expressió en els preadipòcits amb els dies de cultiu, però la inducció remarcable es produeix en els adipòcits, amb nivells 2.44 i 1.97 vegades superiors als inicials, respectivament. La SOD2 té un perfil d'expressió pràcticament constant. L'expressió de la PDK4, té tendència a disminuir amb el temps de cultiu fins a un 60% de l'expressió inicial. PGC-1α té

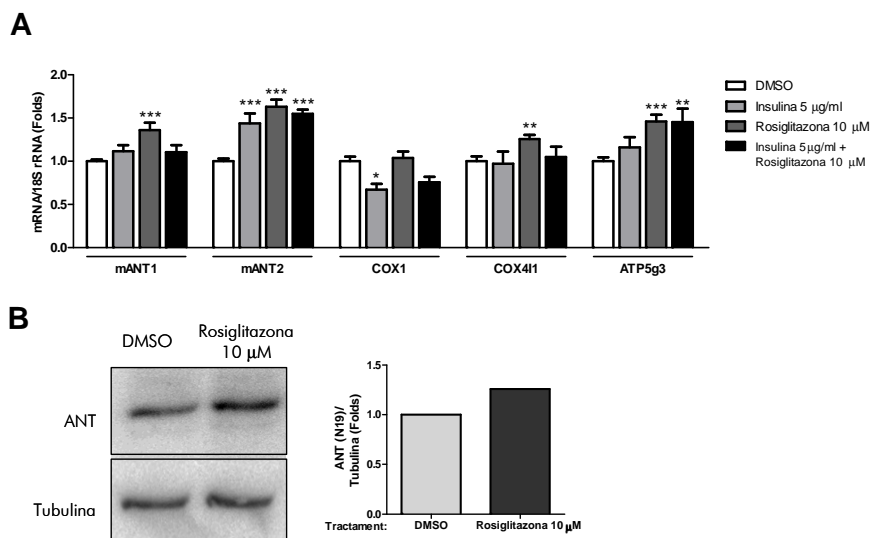
un patró similar a les proteïnes mitocondrials analitzades, augmentant aproximadament el doble en els adipòcits. Per últim, tant el GLUT4 com el PPAR- $\gamma$  i l'adiponectina (adipoQ) presenten una clara inducció als 12 dies de cultiu, arribant en els adipòcits a nivells de 4 (PPAR- $\gamma$ ) i de més de 1800 vegades (GLUT4 i adipoQ) els nivells de transcripció dels preadipòcits.

Havent observat com les isoformes d'ANT es modifiquen en funció de la diferenciació adipocitària, es va estudiar la possible regulació d'aquestes per diferents factors adipogènics, com la rosiglitazona (l·ligand agonista del PPAR- $\gamma$ ) (Tontonoz et al., 1994) o la insulina (Spiegelman et al., 1993). Així, es van incubar adipòcits 3T3-L1 madurs en presència de rosiglitazona 10  $\mu$ M, insulina 5  $\mu$ g/ml o la combinació d'ambdues durant 48 hores i es va determinar l'expressió gènica per *real-time PCR* de les isoformes ANT i altres proteïnes mitocondrials (Figura 26A). Sobre la regulació d'mANT1, la insulina pràcticament no té cap efecte, mentre que la rosiglitazona augmenta un 36% la seva expressió. El tractament combinat no produeix cap efecte destacable, tal i com passa amb la insulina sola. Respecte a mANT2, tant la insulina com la rosiglitazona o la combinació d'elles indueixen la seva expressió un 44%, un 63% i un 55%, respectivament. Pel que fa a altres proteïnes mitocondrials, el tractament amb insulina disminueix l'expressió de la COX1, mentre que la rosiglitazona no hi exerceix cap efecte. El doble tractament també té tendència a disminuir la seva expressió. En el cas de la COX411, tant la insulina com el doble tractament no tenen cap efecte en la seva regulació, mentre que la rosiglitazona l'augmenta. Per últim, la presència de rosiglitazona (sola o amb insulina) en el medi de cultiu indueix l'expressió de l'ATP5g3 gairebé un 50%, mentre que la insulina per si sola no té efecte. Per tant, es pot intuir l'existència d'una regulació força generalitzable de les proteïnes mitocondrials per part de la rosiglitazona en adipòcits 3T3-L1.

Finalment, es va comprovar a nivell de proteïna la inducció d'ANT per part de la rosiglitazona (Figura 26B). Mitjançant la immunodetecció d'ANT en extractes totals d'adipòcits 3T3-L1 incubats amb DMSO o rosiglitazona 10  $\mu$ M, es pot

## Resultats

observar l'efecte inductor dels nivells de proteïna d'ANT a través de l'activació de PPAR- $\gamma$  per part de la rosiglitazona.



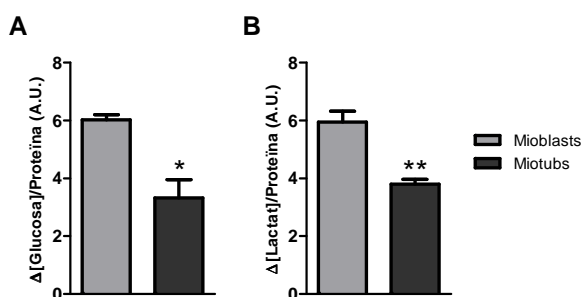
**Figura 26. Patró d'expressió de les isoformes d'ANT, diferents components del sistema OXPHOS i marcadors adipogènics d'adipòcits 3T3-L1 incubats amb rosiglitazona, insulina i/o T0070907. (A)** Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes mANT1 i mANT2, i de les subunitats COX1, COX411 i ATP5g3 en adipòcits 3T3-L1 incubats amb DMSO, insulina 5 µg/ml i/o rosiglitazona 10 µM durant 48 hores. **(B)** Immunodetecció d'ANT (N19) en 30 µg d'extracte total d'adipòcits 3T3-L1 incubats amb DMSO o rosiglitazona 10 µM durant 48 hores. Immunodetecció de tubulina com a control de càrrega. \* representa diferències significatives per efecte dels tractaments.

En resum, la presència d'un factor adipogènica en el cultiu d'adipòcits 3T3-L1 madurs, com la insulina o la rosiglitazona, induïx de forma específica l'expressió de l'mANT2, tal i com passa durant la diferenciació adipocitària.

## 1.6 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>

Les cèl·lules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> són una línia derivada de múscul esquelètic de ratolí amb capacitat de diferenciar-se i formar miotubs contràctils. Amb el mateix objectiu que fins ara, es va realitzar una primera aproximació a descriure el

metabolisme glucolític associat a l'estat proliferatiu d'aquestes cèl·lules. Així, es va quantificar el consum de glucosa (Figura 27A) i la producció de lactat (Figura 27B) durant 24 hores en mioblasts (cèl·lules proliferants) i miotubs (cèl·lules quiescents). Els miotubs  $C_2C_{12}$  tenen un consum de glucosa un 54% inferior al que presenten els mioblasts. A més, la producció de lactat també és un 64% inferior. Per tant, les cèl·lules  $C_2C_{12}$  en proliferació (mioblasts) tenen un metabolisme clarament més glucolític que les cèl·lules quiescents o diferenciades (miotubs).

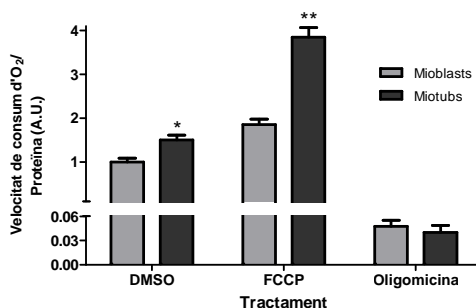


**Figura 27. Caracterització del metabolisme glucolític de mioblasts i miotubs  $C_2C_{12}$ .** (A) Quantificació del consum de glucosa i (B) de la producció de lactat durant 24 hores en mioblasts i miotubs  $C_2C_{12}$ . \* representa diferències significatives entre mioblasts i miotubs.

Així mateix, també es va quantificar la capacitat de consum d'oxigen associat a un estat proliferatiu determinat. Tal i com es va fer amb les cèl·lules 3T3-L1, es van realitzar dos cultius de mioblasts  $C_2C_{12}$  en paral·lel, un dels quals a subconfluència, mantenint la capacitat de proliferació, i un altre en el que es va induir la diferenciació a miotubs. En aquestes condicions, es va quantificar la velocitat de consum d'oxigen dels mioblasts i miotubs (Figura 28). Els miotubs presenten una velocitat de consum d'oxigen basal (DMSO) un 50% superior a la dels mioblasts. La capacitat total d'utilització d'oxigen per part de la cadena respiratòria, que es pot calcular mitjançant el tractament amb el desacoblant FCCP, és de 1.86 vegades la basal en mioblasts, i de 2.56x en miotubs. Així, els miotubs tenen una capacitat total de consum d'oxigen 2.07x superior a la dels mioblasts. El grau d'acoblament de la cadena respiratòria, determinada pel consum d'oxigen en presència de l'inhibidor de l'ATP-sintasa oligomicina, és molt

## Resultats

similar en els dos casos, situant-se a uns nivells més de 20 vegades inferiors als del consum basal.



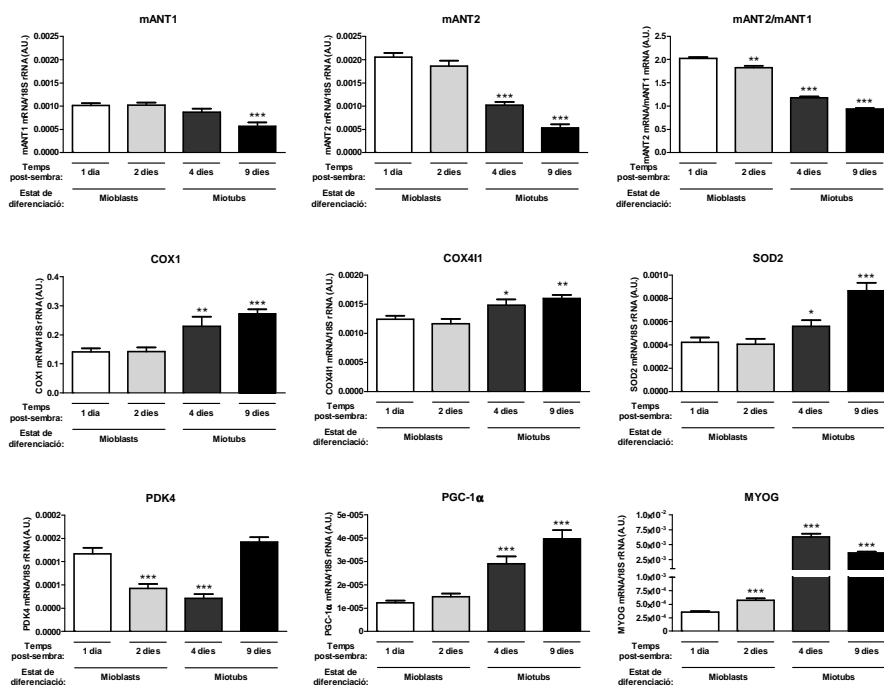
**Figura 28. Determinació del consum d'oxigen de mioblasts i miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.** Quantificació de la velocitat de consum d'oxigen en mioblasts i miotubs, corregida per proteïna, en condicions basals (DMSO), de desacoblament de la cadena respiratòria (FCCP 10 µM) o d'inhibició de la mateixa (Oligomicina 10 µM). \* representa diferències significatives entre mioblasts i miotubs.

Per a l'anàlisi dels nivells de transcripció gènica de les isoformes d'ANT i d'altres proteïnes mitocondrials i de marcadors de la diferenciació cel·lular, es van determinar mitjançant *real-time PCR* els transcrits de cèl·lules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> a 1, 2, 4 i 9 dies de cultiu. Els dos primers temps de cultiu corresponen a cèl·lules en estat de mioblasts, mentre que els dies 4 i 9 corresponen a un cultiu format per miotubs (Figura 29). En l'estat de mioblast, quan les cèl·lules es troben en proliferació, els nivells d'expressió d'mANT2 són el doble dels d'mANT1, el que indicaria que mANT2 en ratolins també es comporta com un marcador de proliferació. En canvi, durant el procés de diferenciació, tot i que l'expressió d'mANT1 disminueix lleugerament, l'expressió d'mANT2 en els miotubs disminueix de forma important, arribant a ser un 50% (4 dies) i un 74% (9 dies) inferior a la dels mioblasts. En aquest cas, doncs, no trobem cap isoforma que estigui directament relacionada amb l'increment del metabolisme oxidatiu que té lloc amb la diferenciació dels mioblasts a miotubs.

En referència als altres gens analitzats, s'observa un augment de l'expressió gènica de les proteïnes mitocondrials COX1, COX411 i SOD2. L'expressió de

PGC-1 $\alpha$  és clarament superior en els miotubs que en els mioblasts, tal i com passa amb el factor de transcripció específic de desenvolupament muscular, la miogenina (MYOG), que també s'indueix amb el temps de cultiu. Finalment, l'expressió de la PDK4 disminueix en paral·lel amb el temps de cultiu als 2 i 4 dies (augment de l'oxidació mitocondrial de la glucosa), tot i que a temps llargs de diferenciació (9 dies), sembla recuperar els nivells inicials.

Per tant, quan les cèl·lules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> deixen de proliferar i es diferencien a miotubs, es produeix una clara disminució de l'expressió d'mANT2, pel que mANT2 en aquestes cèl·lules actuaria com a marcador de la proliferació.



**Figura 29.** Patró d'expressió de les isoformes d'ANT i de COX1, COX4I1, SOD2, PDK4, PGC-1 $\alpha$  i MYOG de mioblasts i miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> a diferents temps de cultiu. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de les isoformes mANT1, mANT2 i de la relació mANT2/mANT1; i de les subunitats de la citocrom c oxidasa COX1 i COX4I1, de la SOD2, de la PDK4, del PGC-1 $\alpha$  i de la MYOG en mioblasts i miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> a 1, 2, 4 i 9 dies de cultiu. \* representa diferències significatives entre mioblasts (1 dia) i la resta de temps de cultiu.





## II. EFECTES DEL SILENCIAMENT GÈNIC MITJANÇANT shRNA DE LES ISOFORMES DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA HUMANES I DE RATOLÍ.

Després d'haver analitzat els perfils d'expressió de les isoformes d'ANT en funció de l'estat de proliferació en línies cel·lulars humanes i de ratolí, vam decidir analitzar els efectes metabòlics que implicava el silenciament gènic d'aquestes isoformes, mitjançant la utilització d'un sistema d'interferència de l'RNA, amb l'objectiu d'estudiar possibles funcions específiques de cada una de les isoformes. Per tal d'aconseguir aquest silenciament, es van dissenyar diferents *short-hairpin* RNA amb els quals es van transfectar de forma transitòria les diferents línies cel·lulars estudiades. En el cas de les isoformes humanes, es van estudiar les conseqüències metabòliques del silenciament gènic o *knockdown* d'hANT2 i hANT3, i en el cas de les de ratolí, les isoformes mANT1 i mANT2.

### II.1 Silenciament gènic de les isoformes humanes 2 i 3 de l'adenina nucleòtid translocasa.

Una vegada es van obtenir els diferents shRNA, es va comprovar el grau d'eficiència del silenciament. En el cas de les isoformes humanes es van dissenyar shRNAs per a les isoformes hANT2 i hANT3, les quals són les isoformes majoritàries en línies cel·lulars d'origen tumoral, com les cèl·lules HeLa. Els efectes del silenciament d'hANT1 no s'han estudiat perquè és la isoforma pròpia de múscul i cervell i la seva rellevància en cèl·lules HeLa és poc important en comparació amb hANT2 i hANT3. Després de transfectar transitòriament cèl·lules HeLa proliferants amb els plasmidis portadors de l'shANTm (control negatiu del sistema de silenciament), shhANT2 i shhANT3, es va determinar l'expressió gènica de les isoformes humanes d'ANT i del quocient glucolític ( $\text{hANT2}/[\text{hANT1} + \text{hANT3}]$ ) a 24 hores (Figura 30A), 48 hores (Figura 30B) i 72 hores (Figura 30C) posttransfecció. Respecte shANTm, shhANT2 produeix una disminució de l'expressió d'hANT2 del 60% a les 24 hores mentre que l'efecte de

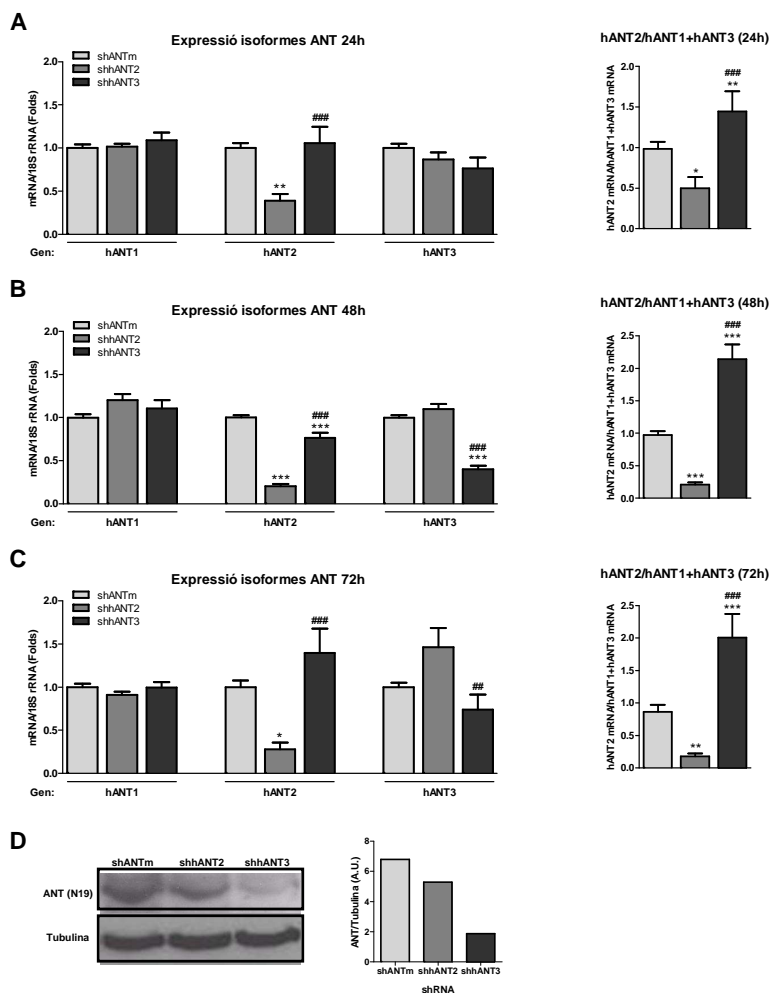
## Resultats

silenciament produït per shhANT3 en l'expressió d'hANT3 a aquest temps és molt petit. A les 48 hores de transfecció, shhANT2 redueix l'expressió d'hANT2 un 80%, i shhANT3 silencia hANT3 en un 60%. Per últim, a les 72 hores, l'shhANT2 continua mantenint una alta eficiència de silenciament (70%), mentre que shhANT3 ja ha perdut pràcticament la seva capacitat. A més, també es va comprovar que el silenciament d'hANT2 no modifica l'expressió d'hANT3, i viceversa. En el cas d'hANT1, la seva expressió no es modifica per efecte d'shhANT2 o d'shhANT3. Per tant, el temps òptim de transfecció en el qual s'obté el màxim silenciament de les dues isoformes és a les 48 hores.

Quan les cèl·lules són transfectades amb l'shhANT2, el quocient glucolític és de 0.45, 0.20 i 0.25 a les 24, 48 i 72 hores, respectivament. Per altra banda, l'shhANT3 estableix aquest quocient al 1.89, 2.26 i 2.12. Per tant, mitjançant la interferència gènica d'hANT2 i hANT3 podem modificar el quocient glucolític més de 10 vegades entre les cèl·lules transfectades amb shhANT2 i les transfectades amb shhANT3 (Figura 30B).

Paral·lelament es va comprovar que el silenciament gènic produït pels shRNA, visible transcripcionalment, també es tradueix en una disminució dels nivells de la proteïna ANT. Mitjançant *western blot*, a partir d'extracte proteic total de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores, es va immunodetectar la proteïna ANT i la tubulina (control de càrrega) (Figura 30D). Tant l'shhANT2 com l'shhANT3 produeixen una disminució dels nivells de proteïna ANT, sent més clar en la situació de silenciament d'hANT3. En el nostre cas, l'anticòs utilitzat reconeix amb major eficiència hANT1 i hANT3 que hANT2, fet que podria explicar perquè, tot i la supressió del 80% de l'expressió d'hANT2 mitjançant la transfecció amb l'shhANT2, l'anticòs continua immunodetectant l'hANT3 restant, pel que s'emascara el silenciament específic de la isoforma. En canvi, quan es silencia hANT3 per shhANT3, la pèrdua de senyal d'ANT és clara, ja que la immunodetecció de l'hANT2 restant és molt dèbil. El fet que en cèl·lules HeLa no detectem cap senyal corresponent a hANT1, tot i l'especificitat de l'anticòs cap a aquesta isoforma, confirma que la quantitat de

proteïna hANT1 en aquestes cèl·lules és molt baixa (malgrat que els seus nivells d'mRNA no són molt inferiors als d'hANT2 i hANT3), el que justifica que no s'hagin estudiat els efectes del silenciament d'hANT1 en cèl·lules HeLa.



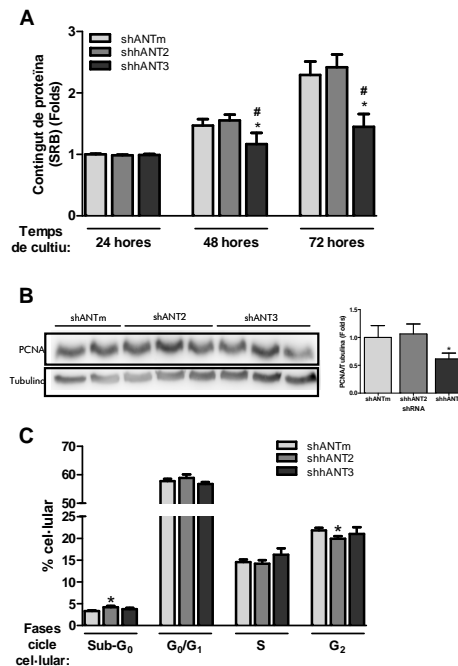
**Figura 30. Caracterització de l'eficiència de silenciament gènic dels shRNA de les isoformes 2 i 3 d'ANT en cèl·lules HeLa.** (A) Determinació de l'expressió gènica de les isoformes hANT1, hANT2 i hANT3 humanes mitjançant *real-time* PCR i càlcul de la relació hANT2/(hANT1+hANT3), després de la transfecció de cèl·lules HeLa amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 24, (B) 48 o (C) 72 hores. (D) Immunodetecció i quantificació de l'ANT (N19) en 40 µg d'extracte total de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores. Detecció de la tubulina com a control de càrrega. \* representa diferències significatives entre shANTm i shhANT2 o shhANT3, i # entre shhANT2 i shhANT3.

## Resultats

Una vegada determinat el correcte funcionament dels shRNA, vam estudiar les conseqüències cel·lulars que suposava el silenciament gènic de les isoformes d'ANT en cèl·lules HeLa. Primer de tot vam estudiar si el silenciament de les isoformes d'ANT repercutia en la capacitat proliferativa de les cèl·lules. Es van transfectar cèl·lules HeLa durant 72 hores amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 i es va quantificar el contingut de proteïna total cada 24 hores mitjançant la tinció amb sulforodamina B de les cèl·lules prèviament fixades a la placa amb TCA 10% (Figura 31A). El silenciament d'hANT2 no produeix alteracions apreciables en la proliferació de les cèl·lules HeLa, mentre que el silenciament d'hANT3 limita clarament la capacitat proliferativa de les cèl·lules, suposant una reducció del 21% a partir de les 48 hores de la transfecció i del 37% a les 72 hores. Emperò, cal destacar que per necessitats metodològiques, per a poder realitzar la transfecció amb els shRNA, les cèl·lules han de trobar-se a un elevat percentatge de confluència (60-80%), pel que la seva capacitat de proliferació és inferior a quan les cèl·lules es troben a baixa densitat (Figura 13A o 15A). Per tant, les condicions de la transfecció transitòria potser no permeten posar de manifest les possibles repercussions del silenciament d'hANT2 en la capacitat proliferativa de les cèl·lules HeLa. També es van analitzar per *western blot* els nivells proteics de l'antigen nuclear de cèl·lules en proliferació (PCNA), el qual s'utilitza com un marcador de la proliferació cel·lular (Maga and Hubscher, 2003). A partir d'extracte total de cèl·lules HeLa transfectades durant 48 hores amb els shRNA, es va immunodetectar el PCNA i la tubulina (control de càrrega) (Figura 31B). El silenciament d'hANT3, a diferència del d'hANT2, produeix una disminució del senyal de PCNA.

A més, es va analitzar el cicle cel·lular corresponent a l'efecte de cada shRNA mitjançant el marcatge de les cèl·lules transfectades amb els shRNA durant 48 hores amb iodur de propidi i la quantificació del percentatge de cèl·lules que es troben en cada una de les fases del cicle d'acord amb el seu contingut de DNA (Figura 31C). A trets generals, no s'aprecien grans diferències en la progressió del cicle cel·lular entre els diferents shRNA, tot i que es pot apreciar un petit augment del percentatge de cèl·lules que es troben en la fase de sub-G<sub>0</sub> quan es silencia

l'expressió d'hANT2, acompanyat d'una disminució en el número de cèl·lules que es troben en  $G_2$ . La fase sub- $G_0$  es caracteritza per representar la subpoblació de cèl·lules que es troben en procés apoptòtic. Cal fer menció de què, en general, totes les condicions presenten uns nivells molt baixos d'apoptosi, inferiors al 5% del total de cèl·lules. Respecte a les cèl·lules transfectades amb l'shhANT3, el perfil del seu cicle cel·lular no difereix en absolut del que presenten les cèl·lules control (shANTm), pel que la disminució de la seva capacitat proliferativa no vindria determinada per canvis concrets en alguna de les etapes del cicle cel·lular. Per tant, el silenciament d'hANT3 en cèl·lules HeLa disminueix la capacitat de creixement de les cèl·lules sense que hi hagi un augment de l'apoptosi.



**Figura 31. Anàlisi de la proliferació i del cicle cel·lular en cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA d'hANT2 i hANT3.** (A) Determinació del contingut de proteïna total mitjançant tinció amb sulfurodamina B cada 24 hores de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 i shhANT3 durant 72 hores. (B) Immunodetecció i quantificació del PCNA i la tubulina (control de càrrega) en 40 µg d'extracte total de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores. (C) Determinació del cicle cel·lular en cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 i shhANT3 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shhANT2 o shhANT3, i # entre shhANT2 i shhANT3.

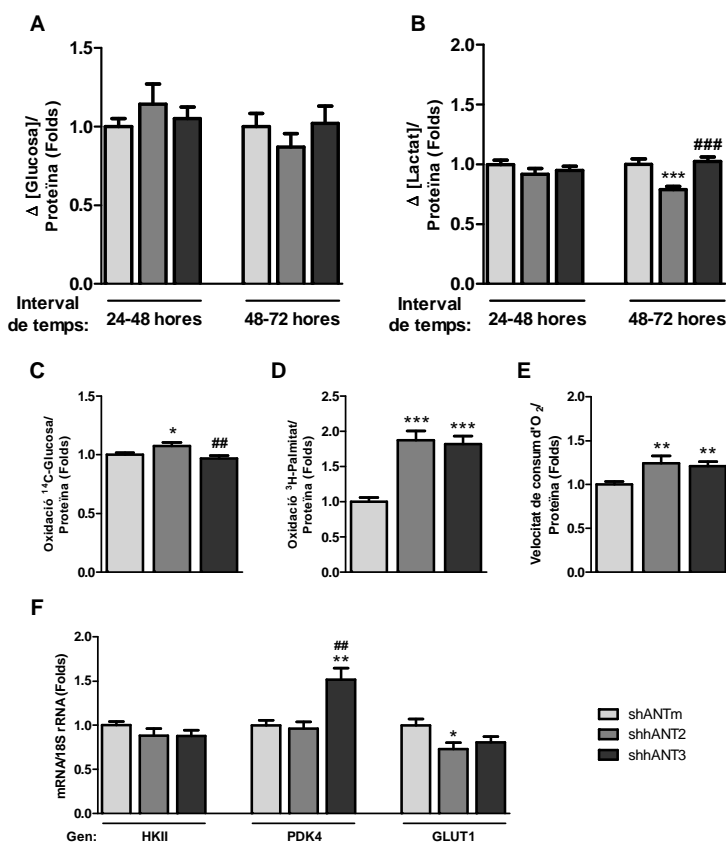
## Resultats

Havent relacionat el silenciament gènic d'hANT2 i d'hANT3 amb una reducció de la capacitat proliferativa de les cèl·lules HeLa, es passà a estudiar quines altres conseqüències metabòliques se'n deriven del silenciament. Així, després de transfectar cèl·lules HeLa amb l'shANTm, shhANT2 o shhANT3, es van recollir alíquotes de medi a les 24, 48 i 72 hores. A partir d'aquestes alíquotes, es determinà la concentració de glucosa i lactat a cada temps i les diferències entre els diferents temps, per a obtenir les dades de consum de glucosa (Figura 32A) i de producció de lactat (Figura 32B). El silenciament gènic d'hANT2 mitjançant shhANT2 presenta una disminució del consum de glucosa entre les 48 i 72 hores (tot i que no significativa), així com en la producció de lactat respecte a les cèl·lules transfectades amb shANTm o shhANT3. Per altra banda, el silenciament d'hANT3, en comparació a shANTm, no modifica ni el consum de glucosa ni la producció de lactat.

A més, també es va quantificar la capacitat de les cèl·lules d'oxidar la glucosa o els àcids grassos, mitjançant la determinació del  $^{14}\text{CO}_2$  o de l' $^3\text{H}_2\text{O}$  alliberats a partir de l'oxidació de la glucosa marcada amb  $^{14}\text{C}$  o d'àcid palmític marcat amb  $^3\text{H}$ , respectivament, en cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores. L'shhANT2 produeix un augment en la capacitat d'utilització de la glucosa com a substrat oxidable en comparació a les cèl·lules HeLa transfectades amb l'shANTm o l'shhANT3 (Figura 32C). Per altra banda, tant el silenciament d'hANT2 com el d'hANT3 generen un augment de més del 80% en la capacitat de les cèl·lules per a oxidar els àcids grassos (Figura 32D).

Un altre paràmetre metabòlic que també s'ha estudiat és la velocitat del consum d'oxigen, per tal d'esbrinar si el silenciament d'hANT2 o d'hANT3 comporta canvis en aquest (Figura 32E). Després de 48 hores de transfecció de les cèl·lules HeLa amb els shRNA, tant shhANT2 com shhANT3 generen un augment, superior al 20%, en la taxa de consum d'oxigen basal.

Així, el silenciament d'hANT2 i la consegüent disminució del quocient glucolític en cèl·lules HeLa produeixen un augment de la capacitat de les cèl·lules d'oxidar la glucosa, mentre que el silenciament d'hANT3 i l'augment del quocient no arriba a produir canvis apreciables en el metabolisme energètic de les cèl·lules HeLa.



**Figura 32. Caracterització del perfil metabòlic de les cèl·lules HeLa transfectedes amb els shRNA d'hANT2 i hANT3.** Determinació del (A) consum de glucosa i (B) de la producció de lactat cada 24 hores en cèl·lules HeLa transfectedes amb shANTm, shhANT2 i shhANT3 durant 72 hores. Determinació de (C) l'oxidació de  $^{14}\text{C}$ -glucosa, (D) de l'oxidació de  $^3\text{H}$ -palmitat sòdic, (E) de la velocitat de consum d'oxigen i (F) determinació de l'expressió gènica de l'hexoquinasa II, PDK4 i GLUT1 mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HeLa transfectedes amb shANTm, shhANT2 i shhANT3 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shhANT2 o shhANT3 i # entre shhANT2 i shhANT3.

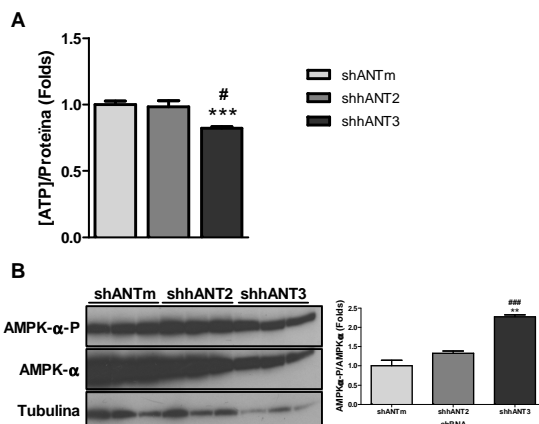


## Resultats

Per últim, es va analitzar l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* de diferents proteïnes relacionades amb les vies d'utilització de la glucosa en cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA durant 48 hores (Figura 32F). El silenciament de cap de les isoformes d'ANT modifica l'expressió de l'hexoquinasa 2 (HKII), enzim responsable de la fosforilació de les hexoses, permetent la seva incorporació a la via glucolítica. En canvi, el silenciament d'hANT3 produeix un augment de l'expressió de la PDK4 respecte les cèl·lules transfectades amb shANTm i shhANT2. Per altra banda, el silenciament d'hANT2 disminueix la transcripció de GLUT1, el que estaria d'acord amb un increment del metabolisme oxidatiu que té lloc en aquestes condicions.

Degut a què el silenciament gènic d'hANT3 produeix una limitació de la proliferació, es va estudiar si aquestes conseqüències metabòliques van acompanyades de canvis en l'estat energètic en les cèl·lules. Amb aquesta finalitat, es va quantificar el contingut d'ATP total en cèl·lules transfectades amb els shRNA durant 48 hores (Figura 33A). Mentre que el silenciament d'hANT2 no produeix cap canvi en el *pool* d'ATP, el silenciament d'hANT3 disminueix un 20% els nivells d'ATP respecte shANTm o shhANT2.

Per tal de confirmar si aquesta disminució dels nivells d'ATP suposa un compromís energètic per a les cèl·lules, es va analitzar per *western blot* l'activació de l'AMPK- $\alpha$  a través de la immunodetecció de la seva forma fosforilada en extractes totals de proteïna de cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA durant 48 hores (Figura 33B). A més, també es van immunodetectar la forma total i la tubulina com a control de càrrega. El silenciament d'hANT3, que desencadena una disminució dels nivells d'ATP, també produeix un augment de la forma fosforilada de l'AMPK- $\alpha$  en comparació al senyal de l'AMPK- $\alpha$  total, la qual disminueix respecte a la que presenten les cèl·lules transfectades amb l'shANTm i l'shhANT2.



**Figura 33. Quantificació de l'ATP cel·lular i anàlisi per *western blot* de l'activació de l'AMPK- $\alpha$  en cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA d'hANT2 i hANT3. (A)** Determinació de l'ATP intracel·lular i **(B)** immunodetecció i quantificació de l'AMPK- $\alpha$  fosforilada (AMPK- $\alpha$ -P), de l'AMPK- $\alpha$  total (AMPK- $\alpha$ ) i la tubulina (control de càrrega) en 40  $\mu$ g d'extracte total de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shhANT2 o shhANT3 i # entre shhANT2 i shhANT3.

A continuació es va analitzar si, a part d'aquestes conseqüències metabòliques, el silenciament d'hANT2 o hANT3 produeix canvis d'expressió en altres proteïnes mitocondrials. A partir de cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA durant 48 hores es va determinar, primer per *real-time PCR*, l'expressió gènica de la COX2, la COX411, el citocrom b (Cytb) i el TFAM (Figura 34A), i segonament mitjançant *western blot*, els nivells de proteïna de la COX2 i la COX4 (Figura 34B). El silenciament d'hANT2 no produeix canvis en l'expressió de COX2, però sí una disminució en COX411, Cytb i TFAM. Pel que fa al silenciament d'hANT3, la tendència és a disminuir l'expressió de COX411 i Cytb, però no produeix canvis en COX2 o TFAM. Tot i aquest patró d'expressió transcripcional, a nivell de proteïna, el silenciament d'hANT3 produeix una clara disminució de la immunodetecció de la COX2 i de la COX4.

Degut a que el silenciament gènec d'hANT3 es tradueix en una disminució d'altres proteïnes mitocondrials, es va voler esbrinar si aquest fet va associat a una

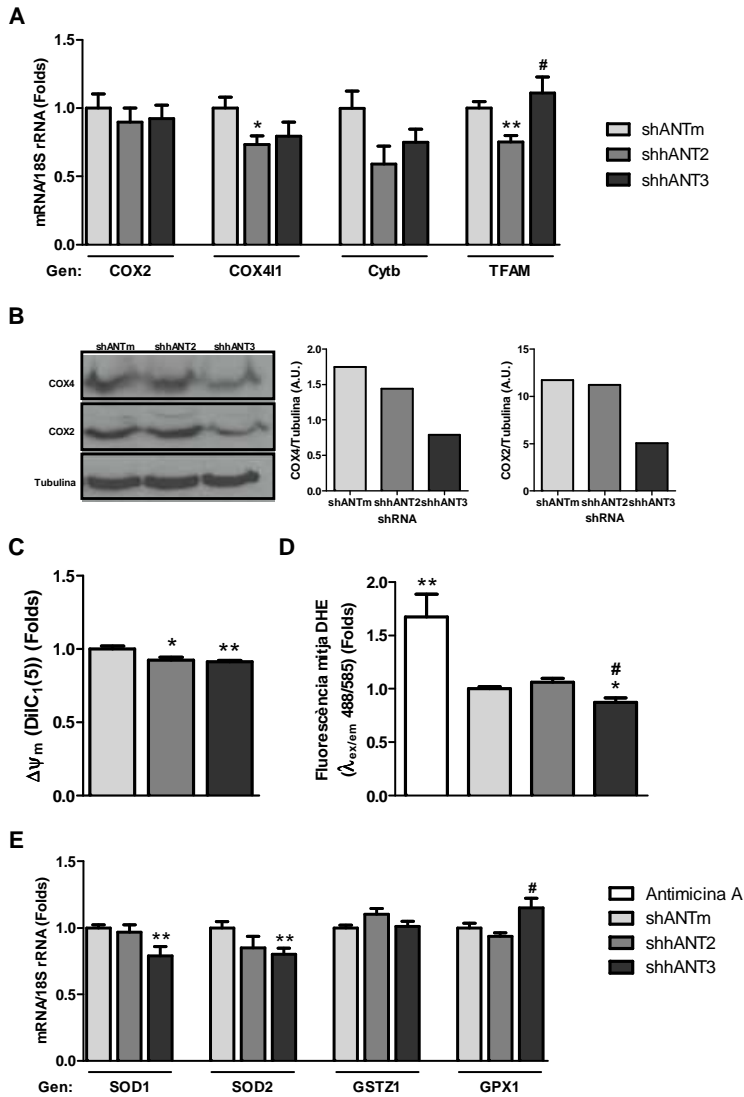
## Resultats

alteració en la funcionalitat del mitocondri. Amb aquest objectiu es va mesurar el potencial de membrana mitjançant el marcatge amb DiI<sub>C<sub>1</sub></sub>(5) de cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA durant 48 hores (Figura 34C). Tant el silenciament d'hANT2 com el d'hANT3 produeixen una disminució aproximada del 10% del potencial de membrana mitocondrial.

Per últim, també es va mesurar la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) associada al silenciament gènic en cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA durant 48 hores (Figura 34D). El tractament amb antimicina A 10 µM durant 1 hora s'utilitza com a control positiu de producció de ROS, gràcies a la seva capacitat per a inhibir la cadena de transport d'electrons (Balaban et al., 2005). Les cèl·lules transfectades amb l'shhANT2 no mostren cap diferència en la producció de ROS en comparació a la situació control (shANTm), mentre que el silenciament d'hANT3 comporta una disminució superior al 15% en els nivells de ROS respecte les cèl·lules control (shANTm) i a les transfectades amb l'shhANT2 .

Així mateix, es va analitzar l'expressió gènica, mitjançant *real-time PCR*, de diferents enzims implicats en els processos d'eliminació de ROS en les cèl·lules silenciades per hANT2 o hANT3 durant 48 hores (Figura 34E). El silenciament d'hANT3 disminueix aproximadament en un 20% l'expressió de les superòxid dismutases, tant la citosòlica (SOD1) com la mitocondrial (SOD2), mentre que el silenciament d'hANT2 no varia el patró transcripcional d'aquests gens. En el cas de la glutatió-transferasa (GSZT1), cap dels 2 shRNA modifica la seva expressió, mentre que el silenciament d'hANT3 sí produeix un augment de l'expressió de la glutatió-peroxidasa (GPX1), tot i que només es significatiu respecte a les cèl·lules transfectades amb l'shhANT2.

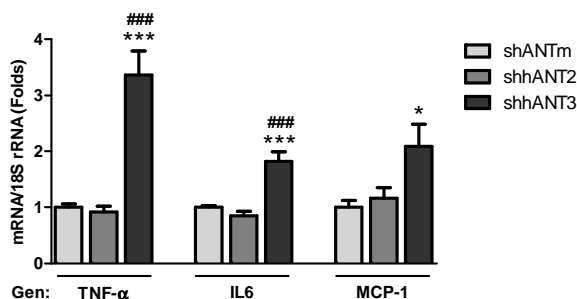
Per tant, el silenciament d'hANT3 no provoca un augment de la producció de ROS.



**Figura 34. Anàlisi de la funció mitocondrial en cèl·lules HeLa transfectedes amb els shRNA d'hANT2 i hANT3.** (A) Determinació de l'expressió gènica de COX2, COX4I1, Citocrom b (Cytb) i TFAM mitjançant *real-time* PCR; (B) immunodetecció i quantificació de la COX4, la COX2 i la tubulina (control de càrrega); (C) quantificació del potencial de membrana i (D) de la producció de ROS; i (E) determinació de l'expressió gènica de SOD1, SOD2, GSTZ1 i GPX1 mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HeLa transfectedes amb shANTm, shhANT2 i shhANT3 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shhANT2 o shhANT3 i # entre shhANT2 i shhANT3.

## Resultats

A més a més, es va analitzar si les modificacions metabòliques derivades del silenciament de les isoformes d'ANT suposaven una situació d'estrès cel·lular. Una possible aproximació és l'anàlisi transcripcional de diferents marcadors inflamatoris (Figura 35). Així, el silenciament d'hANT3 comporta una important inducció de TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1 respecte shANTm. Per altra banda, el silenciament d'hANT2 no suposa canvis en cap d'aquestes citoquines. Per tant, el silenciament d'hANT3 desencadena una resposta inflamatòria.



**Figura 35. Anàlisi transcripcional de diversos marcadors inflamatoris en cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA d'hANT2 i hANT3.** Determinació de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1 mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 i shhANT3 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shhANT2 o shhANT3 i # entre shhANT2 i shhANT3.

## II.2 Silenciament gènic de les isoformes de ratolí 1 i 2 de l'adenina nucleòtid translocasa.

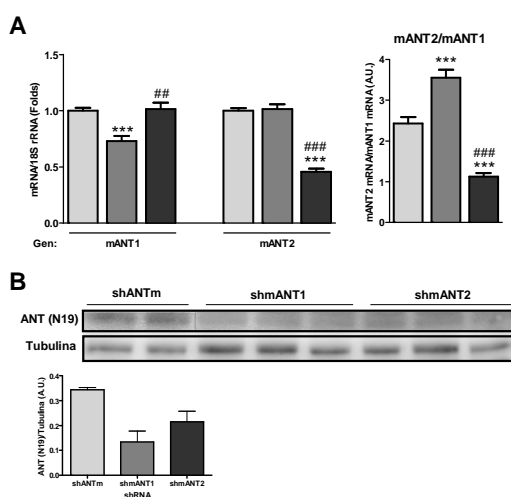
Paral·lelament als experiments de silenciament d'hANT2 i hANT3 humanes en cèl·lules HeLa, també es van desenvolupar shRNA específics per a les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí. Tant la metodologia com els paràmetres metabòlics i altres conseqüències funcionals derivades de l'efecte del silenciament gènic que s'han estudiat són similars a les emprades en el cas de les isoformes humanes. En aquest cas, les cèl·lules utilitzades han estat principalment HIB-1B, que al tractar-se d'una línia fibroblàstica amb alta capacitat proliferativa, ens han aportat una alta eficiència de transfecció i funcionament dels shRNA amb una reproductibilitat força constant. Tanmateix, també s'han utilitzat puntualment preadipòcits 3T3-L1 per a algunes mesures metabòliques concretes que els fibroblasts HIB-1B no ens han permès fer.

Primerament es va comprovar que els shRNA dissenyats per al silenciament de les isoformes de ratolí funcionaven correctament. Es van transfectar transitòriament fibroblasts HIB-1B amb shANTm (control de transfecció, d'expressió del vector i síntesi de l'shRNA però sense diana d'acció), shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores (Figura 36A). shmANT1 es capaç de produir més d'un 25% de reducció de l'expressió d'mANT1, sense afectar l'expressió d'mANT2. Per altra banda, l'shmANT2 aconsegueix silenciar l'expressió d'mANT2 a menys de la meitat (0.46x) dels nivells de les cèl·lules control (shANTm). D'aquesta manera, la relació mANT2/mANT1 resultant és 3.56 en les cèl·lules transfectades amb l'shmANT1, respecte el 2.43 de les cèl·lules control, i 1.12 en les cèl·lules transfectades amb l'shmANT2, pel que mitjançant els shRNA es poden crear dues situacions amb unes 3.5 vegades de diferència en la relació mANT2/mANT1.

En aquest mateix sentit, es va comprovar que el silenciament a nivell transcripcional també es produïa a nivell proteic. La immunodetecció d'ANT per *western blot* a partir d'extractes totals de proteïna de cèl·lules HIB-1B transfectades durant 48 hores amb els diferents shRNA ens mostra com el silenciament gènic

## Resultats

d'mANT1 i mANT2 disminueixen la quantitat de proteïna ANT (Figura 36B). Tal i com passa amb la immunodetecció de les isoformes humanes, l'anticòs no és específic de cap isoforma concreta, tot i que presenta una major afinitat per mANT1, pel que sempre es detectarà una petita quantitat de proteïna corresponent a la isoforma no silenciada, sobretot en el cas d'mANT2, que sempre és més difícil de detectar amb aquest anticòs. Curiosament, tot i la petita disminució a nivell d'mRNA d'mANT1 per efecte de l'shRNA, els nivells de proteïna baixen molt.



**Figura 36. Caracterització de l'eficiència de silenciament gènic dels shRNA de les isoformes 1 i 2 d'ANT en cèl·lules HIB-1B. (A)** Determinació de l'expressió gènica de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí mitjançant *real-time* PCR i càlcul de la relació mANT1/mANT2, després de la transfecció de cèl·lules HIB-1B amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores. **(B)** Immunodetecció i quantificació de l'ANT (N19) i la tubulina (control de càrrega) en 40 µg d'extracte total de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2, i # entre shmANT1 i shmANT2.

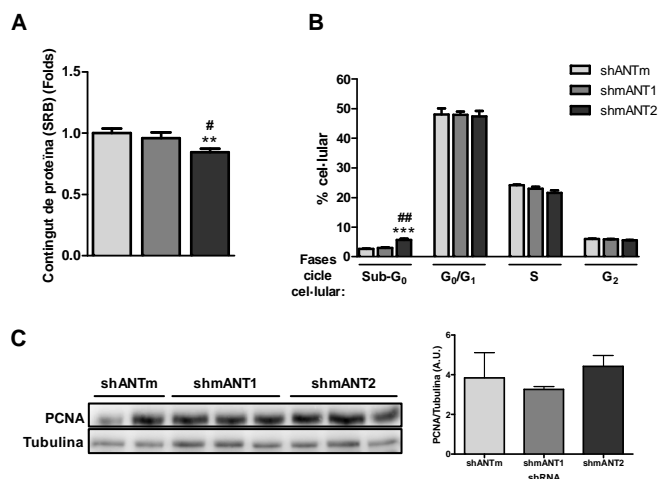
Havent comprovat el funcionament dels shRNA, es va procedir a caracteritzar les conseqüències metabòliques derivades del silenciament. Primerament es van estudiar les repercussions en la capacitat proliferativa. Es van transfectar cèl·lules HIB-1B amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 i es va

quantificar el contingut de proteïna total a les 48 hores de transfecció mitjançant la tinció amb sulforodamina B de les cèl·lules prèviament fixades a la placa amb TCA 10% (Figura 37A). El silenciament d'mANT1 no suposa cap canvi en el creixement, mentre que el silenciament d'mANT2 comporta una lleugera limitació de la capacitat de creixement de les cèl·lules HIB-1B, suposant una reducció superior al 15%. Emperò, la immunodetecció per *western blot* dels nivells proteics del PCNA a partir d'extracte total de cèl·lules HIB-1B transfectades durant 48 hores amb els shRNA, no es tradueix en una disminució del seu senyal en les cèl·lules silenciades per mANT2 (Figura 37C), pel que la proliferació sembla no estar afectada.

Després d'haver vist que el silenciament d'mANT2 comporta una disminució molt petita de la capacitat de creixement, vam estudiar si aquest fenomen quedava reflectit a nivell de cicle cel·lular (Figura 37B). Es va quantificar per citometria de flux, mitjançant el marcatge del DNA amb iodur de propidi, la població relativa de cada una de les fases del cicle cel·lular en cèl·lules transfectades amb els shRNA durant 48 hores. Podem observar com les cèl·lules transfectades amb l'shmANT2 presenten un petit augment de la proporció de cèl·lules en la fase Sub-G<sub>0</sub>, etapa caracteritzada per englobar les cèl·lules apoptòtiques. Concretament, el percentatge de cèl·lules en Sub-G<sub>0</sub> és del 5.56%, mentre que en les altres dues situacions (shANTm i shmANT1) és de menys del 3%.

En resum, el silenciament d'mANT2 en cèl·lules HIB-1B produeix una lleugera disminució del creixement cel·lular que s'acompanya d'un petit augment de l'apoptosi, fet que queda reflectit en l'augment del percentatge de cèl·lules en fase sub-G<sub>0</sub>, el que indicaria un possible paper protector d'mANT2.





**Figura 37.** Anàlisi de la proliferació i del cicle cel·lular en cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'*mANT1* i *mANT2*. **(A)** Determinació del contingut de proteïna total mitjançant tinció amb sulfurodamina B i **(B)** del cicle cel·lular en cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores. **(C)** Immunodetecció i quantificació del PCNA i la tubulina (control de càrrega) en 15 µg d'extracte total de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2, i # entre shmANT1 i shmANT2.

Seguidament es van analitzar els possibles canvis metabòlics que comportava el silenciament de les isoformes d'ANT. Es van transfectar cèl·lules HIB-1B amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores i es va quantificar el consum de glucosa (Figura 38A) i la producció de lactat (Figura 38B), valors que corresponen a les diferències de concentració d'aquests dos metabòlits entre el temps inicial i les 48 hores de transfecció. El silenciament d'*mANT1* no comporta cap diferència en el consum de glucosa ni en la producció de lactat respecte les cèl·lules transfectades amb l'*shANTm*. En canvi, el silenciament d'*mANT2* produeix un augment del 50% en el consum de glucosa i un 28% en la producció de lactat en comparació a les cèl·lules control, esdevenint cèl·lules més glucolítiques.

Amb la finalitat d'aprofundir en el metabolisme glucolític associat a cada una de les situacions de silenciament en cèl·lules HIB-1B, es va quantificar la capacitat d'aquestes cèl·lules per a oxidar la glucosa (Figura 38C). El silenciament

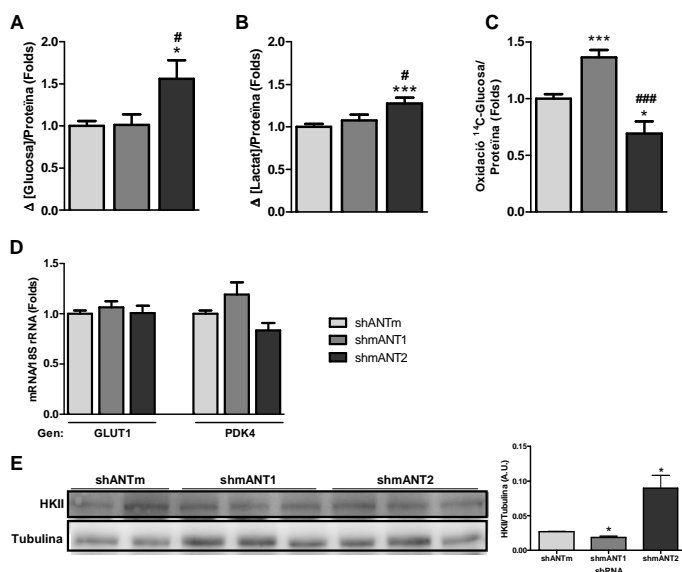
d'mANT1, respecte les cèl·lules transfectades amb l'shANTm (control), produeix un augment del 36% en l'oxidació de la glucosa, mentre que el silenciament d'mANT2 produeix una disminució del 30% en l'esmentada capacitat oxidativa.

A nivell transcripcional es va quantificar per *real-time PCR* els nivells d'mRNA dels gens del GLUT1 i de la PDK4 en cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA durant 48 hores (Figura 38D). El silenciament d'una o altra isoforma ANT no produeix canvis destacables en l'expressió de cap d'aquestes dues proteïnes involucrades en la regulació de les vies d'utilització de la glucosa.

Per últim, es va analitzar per *western blot* els nivells d'una altra proteïna relacionada amb la regulació de la via glucolítica, l'hexoquinasa 2 (HKII). A partir de l'extracte total de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores es va immunodetectar l'HKII i la tubulina (control de càrrega) (Figura 38E). Mentre que el silenciament d'mANT1 no varia els nivells proteics respecte la situació control, el silenciament d'mANT2 produeix un clar augment en els nivells de proteïna de l'HKII.

Per tant, el silenciament d'mANT2 en cèl·lules HIB-1B estimula el metabolisme glucolític, mentre que el silenciament d'mANT1 no, el que indicaria que aquesta isoforma en cèl·lules HIB-1B és poc rellevant metabòlicament, tot i l'augment de l'oxidació que comporta el seu silenciament.

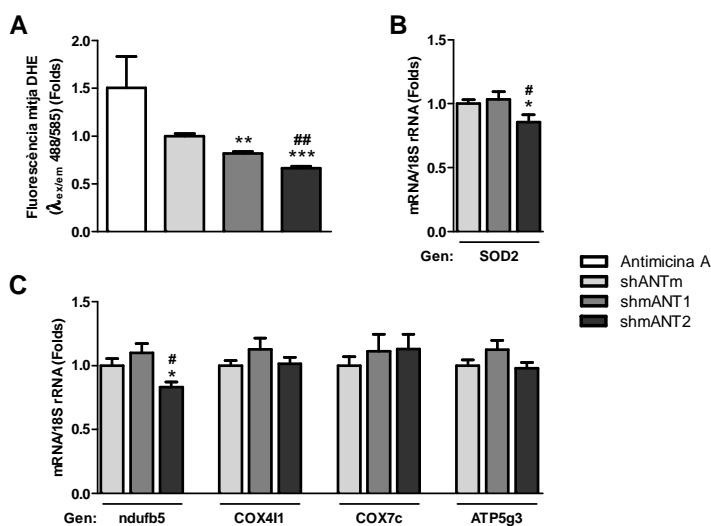
## Resultats



**Figura 38. Caracterització del perfil metabòlic de les cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'ANT1 i mANT2.** (A) Determinació del consum de glucosa i (B) de la producció de lactat durant les 48 hores de transfecció de les cèl·lules HIB-1B amb shANTm, shmANT1 i shmANT2. (C) Determinació de l'oxidació de <sup>14</sup>C-glucosa i (D) determinació de l'expressió gènica de GLUT1 i PDK4 mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores. (E) Immunodetecció i quantificació de l'hexoquinasa II (HKII) i la tubulina (control de càrrega) en 15 µg d'extracte total de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2, i # entre shmANT1 i shmANT2.

Amb l'objectiu d'estudiar si el silenciament de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí té conseqüències en el funcionament mitocondrial, es van transfectar cèl·lules HIB-1B amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores i es va mesurar la producció de ROS (Figura 39A). Tant el silenciament d'mANT1 com el d'mANT2 produeix una disminució de la producció de ROS, tot i que en el cas d'mANT2, aquesta baixada és superior a la que té lloc amb el silenciament d'mANT1. A més, en aquestes condicions experimentals, es va mesurar per *real-time PCR* l'expressió gènica de la superòxid dismutasa mitocondrial (SOD2), veient que el silenciament d'mANT2 produeix una disminució de l'expressió de la SOD2 (Figura 39B).

Per altra banda, també es va mesurar l'expressió de les proteïnes mitocondrials *ndufb5*, *COX411*, *COX7c* i *ATP5g3* (Figura 39C). En general, cap de les proteïnes analitzades varien per efecte del silenciament de les isoformes d'ANT. Només en el cas de la *ndufb5*, el silenciament d'*mANT2* en disminueix la seva expressió respecte les cèl·lules transfectades amb l'*shANTm* (control) i l'*shmANT1*.



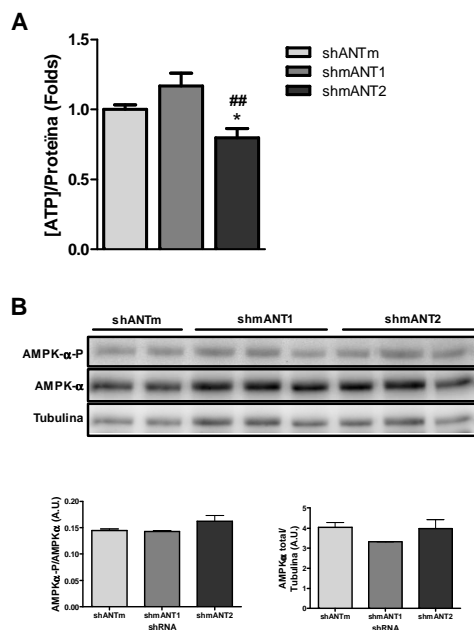
**Figura 39. Quantificació de la producció de ROS i de l'expressió de gens mitocondrials en cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'*mANT1* i *mANT2*.** (A) Determinació de la producció de ROS; i (B) determinació de l'expressió gènica de *SOD2* i (C) de *ndufb5*, *COX411*, *COX7c* i *ATP5g3* mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HIB-1B transfectades amb *shANTm*, *shmANT1* i *shmANT2* durant 48 hores. Tractament en A amb antimicina A 10  $\mu$ M durant 1 hora com a control positiu de producció de ROS. \* representa diferències significatives entre *shANTm* i *shmANT1* o *shmANT2*, i # entre *shmANT1* i *shmANT2*.

Per tal de saber si el canvi metabòlic desencadenat pel silenciament d'*mANT2* està associat a canvis en l'estat energètic de les cèl·lules, es va mesurar el contingut d'ATP intracel·lular de cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA durant 48 hores (Figura 40A). Les cèl·lules transfectades amb l'*shRNA* d'*mANT1* tenen nivells d'ATP similars a les cèl·lules control, mentre que el silenciament

## Resultats

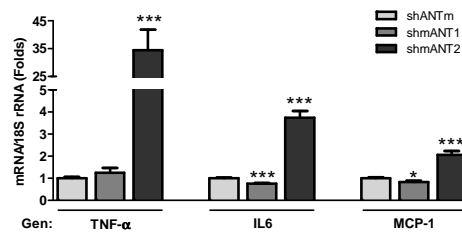
d'mANT2 produeix una davallada en la concentració d'ATP respecte les altres condicions.

Mitjançant *western blot*, es va analitzar si la disminució de l'ATP en les cèl·lules amb l'mANT2 silenciada és suficient per a produir una activació de l'AMPK- $\alpha$  (Figura 40B). Es va immunodetectar la forma fosforilada (activada) i total de l'AMPK- $\alpha$ , així com la tubulina (control de càrrega) en extractes totals de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores. Malgrat que el silenciament d'mANT2 disminueix els nivells d'ATP, no es produeix un augment en la fosforilació de l'AMPK- $\alpha$ , tal i com tampoc passa amb el silenciament d'mANT1.



**Figura 40.** Quantificació de l'ATP cel·lular i anàlisi per *western blot* de l'activació de l'AMPK- $\alpha$  en cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'mANT1 i mANT2. (A) Determinació de l'ATP intracel·lular i (B) immunodetecció i quantificació de l'AMPK- $\alpha$  fosforilada (AMPK- $\alpha$ -P), l'AMPK- $\alpha$  total (AMPK- $\alpha$ ) i la tubulina (control de càrrega) en 15  $\mu$ g d'extracte total de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2 i # entre shmANT1 i shmANT2.

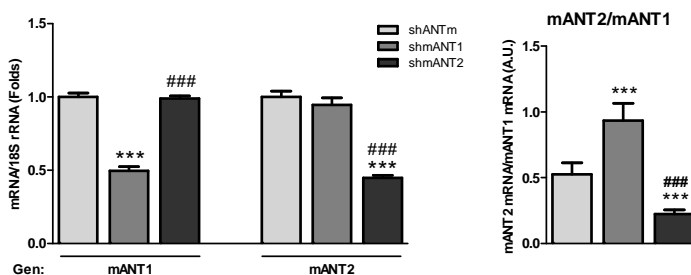
Per altra banda, es va quantificar per *real-time PCR* l'expressió gènica de diferents citoquines per tal de saber si el silenciament de les isoformes d'ANT està associat a una inducció de la resposta inflamatòria (Figura 41). El silenciament d'mANT1 disminueix l'expressió de la IL-6 i de l'MCP-1, mentre que el *knockdown* d'mANT2 produeix una potent inducció de l'expressió de TNF- $\alpha$ , així com de la IL-6 i de MCP-1. Per tant, el silenciament d'mANT2 condueix a una resposta inflamatòria en les cèl·lules HIB-1B.



**Figura 41. Anàlisi transcripcional de diversos marcadors inflamatoris en cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'mANT1 i mANT2.** Determinació de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1 mitjançant *real-time PCR* en cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2 i # entre shmANT1 i shmANT2.

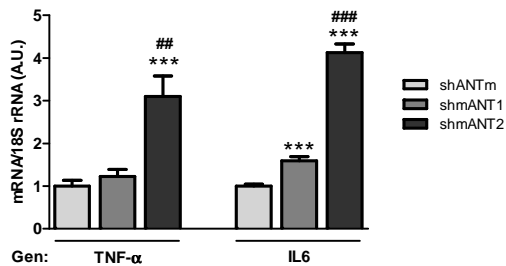
## Resultats

A part de les cèl·lules HIB-1B, també es va estudiar si el silenciament de l'mANT2 de ratolí produïa una inducció de la resposta inflamatòria en preadipòcits 3T3-L1. Primer de tot es va analitzar el correcte funcionament dels shRNA en aquesta línia cel·lular. Es van transfectar preadipòcits 3T3-L1 amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores i es van quantificar els nivells d'expressió d'mANT1 i mANT2 per *real-time PCR* (Figura 42). Les cèl·lules transfectades amb l'shmANT1 tenen uns nivells d'mRNA d'ANT1 inferiors al 50% dels de les cèl·lules transfectades amb l'shANTm (control), sense que es modifiquin els nivells d'expressió d'mANT2. Per la seva banda, la transfecció amb shmANT2 disminueix l'expressió d'mANT2 a la meitat dels nivells de les cèl·lules control, sense modificar l'expressió d'mANT1. En conseqüència, la transfecció amb els shRNA té la capacitat de modificar la relació mANT2/mANT1 en més de 4 vegades entre la situació de silenciament d'mANT1, on la relació és de 0.94 (la relació en les cèl·lules control és de 0.53), mentre que el silenciament d'mANT2 estableix una relació mANT2/mANT1 de 0.23.



**Figura 42. Caracterització de l'eficiència de silenciament gènic dels shRNA de les isoformes mANT1 i mANT2 en cèl·lules 3T3-L1.** Determinació de l'expressió gènica de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí mitjançant *real-time PCR* i càlcul de la relació mANT2/mANT1, després de la transfecció de preadipòcits 3T3-L1 amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2, i # entre shmANT1 i shmANT2.

A continuació, es va analitzar per *real-time PCR* l'expressió gènica de diferents marcadors inflamatoris (Figura 43). Tal i com passa en les cèl·lules HIB-1B, el silenciament d'mANT2 genera una important inducció transcripcional de les citokines TNF- $\alpha$  i IL-6. Tanmateix, el silenciament d'mANT1 en preadipòcits 3T3-L1 també produeix un petit augment en l'expressió de la IL-6 respecte les cèl·lules control (shANTm). Per tant, el silenciament d'mANT2 produeix una activació de la resposta inflamatòria en cèl·lules 3T3-L1, igual que passa en HIB-1B.



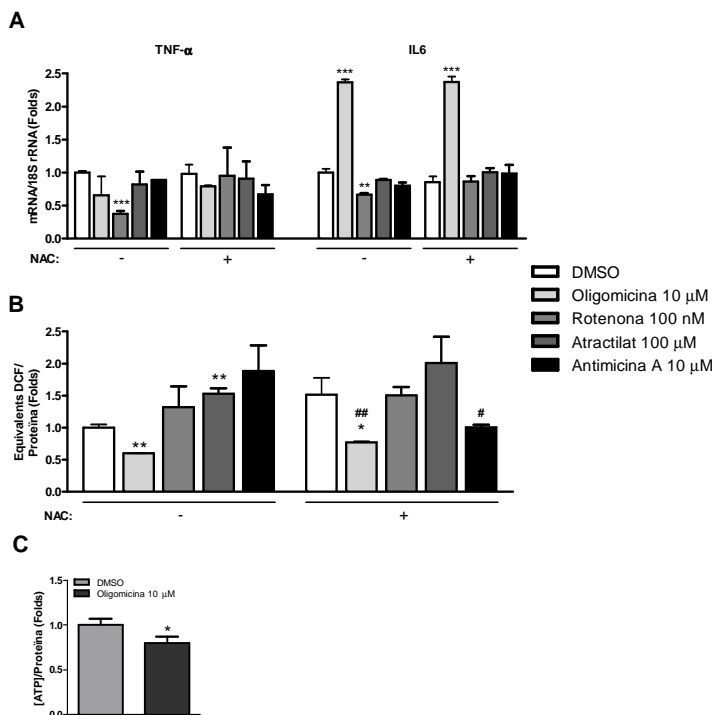
**Figura 43. Anàlisi transcripcional de diversos marcadors inflamatoris en cèl·lules 3T3-L1 transfectades amb els shRNA d'mANT1 i mANT2.** Determinació de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  i IL-6 mitjançant *real-time PCR* en cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2 i # entre shmANT1 i shmANT2.



### II.3 Resposta inflammatòria per efecte del silenciament gènic de l'ANT3 humana i de l'ANT2 de ratolí.

Com a conseqüència del fet que el silenciament d'hANT3 en cèl·lules humanes i d'mANT2 en cèl·lules de ratolí produeix una inducció de l'expressió de diverses citoquines, vam aprofundir en estudiar la importància d'aquesta resposta inflammatòria i si està relacionada amb una situació de compromís energètic o hi intervenen altres elements implicats en l'estrès cel·lular.

Primer de tot vam estudiar si la manca de producció d'ATP mitocondrial mitjançant la inhibició d'alguns dels components dels sistema OXPHOS, induïa en les cèl·lules HeLa una resposta similar. Es van incubar durant 6 hores cèl·lules HeLa amb DMSO (vehicle), oligomicina 10  $\mu$ M (inhibidor de l'ATP-sintasa o complex V), rotenona 100 nM (inhibidor de la NADH-deshidrogenasa o complex I), atractilat 100  $\mu$ M (inhibidor d'ANT) i antimicina A 10  $\mu$ M (bloquejador de la transferència d'electrons entre el citocrom b i el citocrom  $c_1$  en el complex III). Cal destacar que mentre la rotenona i l'antimicina A actuen inhibint la transferència d'electrons, és a dir, la respiració, l'oligomicina i l'atractilat actuen impedit la síntesi d'ATP. A més, aquests tractaments es van realitzar en presència, o no, del quelant de ROS N-acetilcisteïna (NAC) a una concentració de 10 mM, per tal d'esbrinar si l'efecte dels diferents productes és depenent de ROS (Figura 44A). El tractament amb oligomicina no produeix cap canvi en l'expressió de TNF- $\alpha$ , però sí una important inducció de la IL-6, la qual no depèn de ROS, ja que l'augment d'expressió té lloc tant en la situació d'incubació sense NAC com en presència de NAC. En canvi, el tractament amb rotenona produeix una petita disminució de TNF- $\alpha$  i d'IL-6, efecte que desapareix quan el tractament té lloc en presència de NAC. La resta de tractaments no tenen cap efecte en la regulació de l'expressió gènica d'aquestes dues citoquines, independentment de la presència de NAC.



**Figura 44.** Anàlisi transcripcional de diversos marcadors inflamatoris i quantificació de la producció de ROS i ATP intracel·lular en cèl·lules HeLa tractades amb inhibidors de diversos complexos del sistema OXPHOS. (A) Determinació de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  i IL-6 mitjançant *real-time* PCR i (B) quantificació de la producció de ROS en cèl·lules HeLa tractades amb DMSO (vehicle), oligomicina 10  $\mu$ M, rotenona 100 nM, atractilat 100  $\mu$ M o antimicina 10  $\mu$ M en presència, o no, de l'antioxidant N-acetilcisteïna (NAC) durant 6 hores. (C) Quantificació de l'ATP intracel·lular de cèl·lules HeLa incubades amb DMSO o oligomicina 10  $\mu$ M durant 3 hores. \* representa diferències significatives per efecte dels inhibidors dels complexos del sistema OXPHOS i # per efecte del NAC.

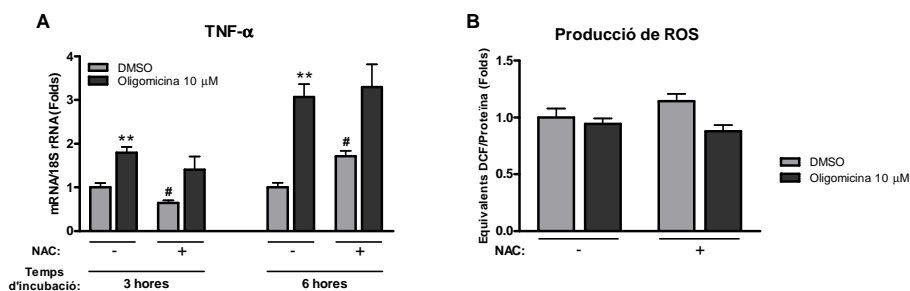
Paral·lelament es va mesurar la producció de ROS en les mateixes condicions experimentals utilitzades per a l'anàlisi transcripcional dels marcadors inflamatoris (Figura 44B). El tractament amb oligomicina produeix una disminució en la producció de ROS respecte a la situació control (DMSO), mentre que l'atractilat l'augmenta. Quan els tractaments es realitzen en presència de NAC, la producció de ROS no és diferent de la que té lloc en absència del quelant de ROS, mantenint-se més baixa en les cèl·lules tractades amb oligomicina, tret del

## Resultats

cas del tractament amb antimicina A, on la producció de ROS disminueix respecte a la situació sense NAC.

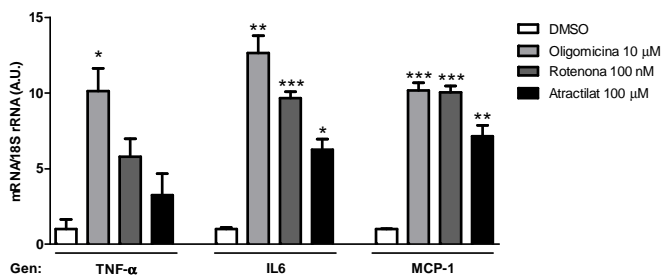
Per últim, es va mesurar la concentració d'ATP intracel·lular de les cèl·lules HeLa incubades amb oligomicina 10  $\mu$ M durant 3 hores (Figura 44C). La inhibició de l'ATP-sintasa per part de l'oligomicina produeix una disminució del *pool* d'ATP. Per tant, la inducció de la resposta inflamatòria en les cèl·lules HeLa incubades amb oligomicina no està associada a un augment de la producció de ROS però sí a una disminució de l'ATP cel·lular.

Amb el propòsit d'estudiar si l'efecte inductor de la resposta inflamatòria de l'oligomicina també té lloc en altres línies cel·lulars humanes, es van incubar cèl·lules HepG<sub>2</sub> amb oligomicina 10  $\mu$ M, amb o sense NAC, durant 3 o 6 hores i es va quantificar l'expressió gènica del TNF- $\alpha$  (Figura 45A). El tractament amb oligomicina produeix un augment de l'expressió de TNF- $\alpha$  a les 3 i a les 6 hores. A més, la producció de ROS a les 3 hores de tractament (Figura 45B) no es veu modificada per efecte de l'oligomicina i és independent de NAC.



**Figura 45. Anàlisi transcripcional del TNF- $\alpha$  i quantificació de la producció de ROS en cèl·lules HepG<sub>2</sub> tractades amb oligomicina.** (A) Determinació de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HepG<sub>2</sub> tractades durant 3 o 6 hores amb DMSO (vehicle) o oligomicina 10  $\mu$ M en presència, o no, de l'antioxidant N-acetilcisteïna (NAC). (B) Quantificació de la producció de ROS en cèl·lules HepG<sub>2</sub> incubades amb DMSO o oligomicina 10  $\mu$ M durant 3 hores. \* representa diferències significatives per efecte de l'oligomicina, i # per efecte del NAC.

Perseguint el mateix objectiu que amb les cèl·lules HeLa i HepG<sub>2</sub>, també s'ha analitzat com la inhibició del sistema OXPHOS induïx una resposta inflamatòria en cèl·lules HIB-1B de ratolí. Es van incubar cèl·lules HIB-1B amb oligomicina 10 µM, rotenona 100 nM i atractilat 100 µM durant 6 hores i es va quantificar l'expressió gènica de diverses citoquines (Figura 46). L'oligomicina produeix un important augment de l'expressió del TNF-α, de la IL-6 i del MCP-1. La rotenona també induïx clarament l'expressió de la IL-6 i de MCP-1, però l'efecte sobre el TNF-α no és estadísticament significatiu, tal i com passa amb el tractament amb atractilat, l'efecte inductor del qual és menor en totes les citoquines analitzades.

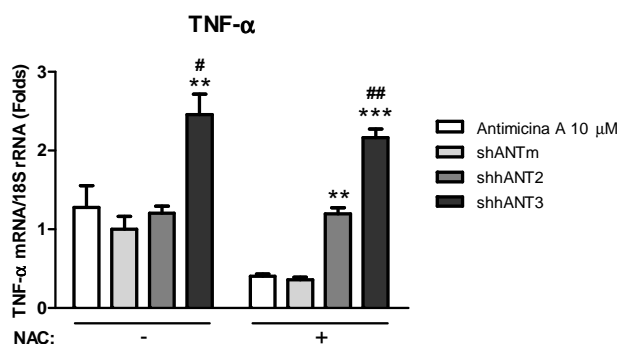


**Figura 46. Anàlisi transcripcional de diversos marcadors inflamatoris en cèl·lules HIB-1B tractades amb inhibidors de diversos complexos del sistema OXPHOS.** Determinació de l'expressió gènica de TNF-α, IL-6 i MCP-1 mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HIB-1B tractades amb DMSO (vehicle), oligomicina 10 µM, rotenona 100 nM o atractilat 100 µM durant 6 hores. \* representa diferències significatives per efecte dels inhibidors dels complexos del sistema OXPHOS.

Havent vist que la alteració de l'estat energètic per inhibició del sistema OXPHOS està associada a una resposta inflamatòria i que aquesta no està produïda per un augment de la producció de ROS, es va voler confirmar que la inducció de la resposta inflamatòria produïda pel silenciament d'hANT3 en cèl·lules humanes i pel silenciament d'mANT2 en cèl·lules de ratolí també està desvinculada de la producció de ROS.

## Resultats

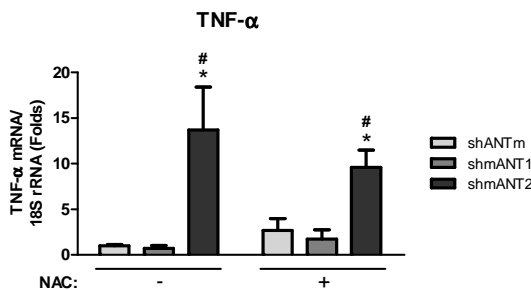
En primer lloc, es van transfectar durant 48 hores cèl·lules HeLa amb shANTm, shhANT2 o shhANT3, amb o sense NAC les últimes 24 hores, i es va mesurar l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  (Figura 47). A més, es van tractar cèl·lules HeLa amb antimicina A 10  $\mu$ M durant 6 hores com a control positiu de producció de ROS. En absència de NAC, el silenciament d'hANT3 augmenta clarament l'expressió de TNF- $\alpha$ . En presència de NAC, l'expressió de TNF- $\alpha$  disminueix en les cèl·lules tractades amb antimicina A i en les transfectades amb l'shANTm respecte a les condicions d'incubació sense NAC. En canvi, les cèl·lules transfectades amb l'shhANT2 i l'shhANT3 no modifiquen l'expressió de TNF- $\alpha$  per efecte del NAC, mantenint-se la inducció per efecte del silenciament d'hANT3.



**Figura 47. Anàlisi transcripcional del TNF- $\alpha$  en cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA d'hANT2 i hANT3 en presència de NAC.** Determinació de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores en presència, o no, de l'antioxidant N-acetilcisteïna (NAC) durant les últimes 24 hores. Tractament amb antimicina A 10  $\mu$ M durant 6 hores com a control positiu de producció de ROS. \* representa diferències significatives entre shANTm i shhANT2 o shhANT3, i # entre shhANT2 i shhANT3.

Segonament, es van transfectar cèl·lules HIB-1B amb els shRNA durant 48 hores, amb o sense NAC les últimes 24 hores i es va mesurar la transcripció gènica de TNF- $\alpha$  (Figura 48). El silenciament d'mANT2 produeix un augment de l'expressió del TNF- $\alpha$ , efecte que és independent de NAC. Per tant, la inducció de

les citocines inflammatòries per efecte del silenciament de l'hANT3 humà o de l'mANT2 de ratolí és independent de ROS.



**Figura 48. Anàlisi transcripcional del TNF- $\alpha$  en cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'mANT1 i mANT2 en presència de NAC.** Determinació de l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores en presència, o no, de l'antioxidant N-acetilcisteïna (NAC) durant les últimes 24 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2, i # entre shmANT1 i shmANT2.

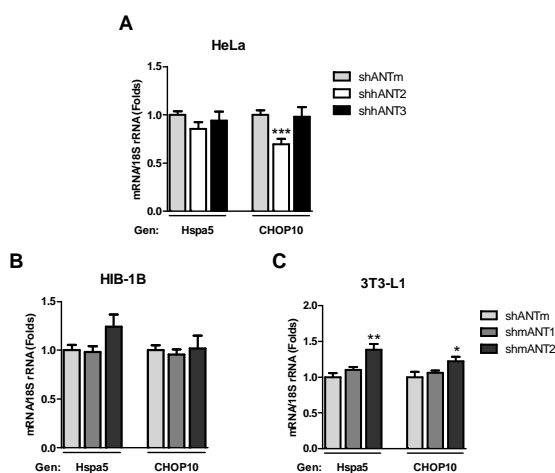
Havent descartat la implicació de la producció de ROS en la inducció de les citocines, es van estudiar altres mecanismes responsables de l'activació de la resposta inflammatòria. Un d'aquests possibles mecanismes és l'estrès de reticle endoplasmàtic, el qual pot ser induït, entre altres fenòmens, per alteracions de l'equilibri REDOX o en la regulació del  $\text{Ca}^{2+}$ , o la manca de glucosa (Xu et al., 2005). Així, es va analitzar, en cèl·lules transfectades amb els shRNA, l'expressió gènica de l'Hspa5 (Gpr78) i CHOP10 (DDIT3), els qual són gens utilitzats com a marcadors d'estrès de reticle.

El silenciament d'hANT2 humà en cèl·lules HeLa produeix una disminució de CHOP10 (Figura 49A), però no modifica Hspa5. Emperò, el silenciament d'hANT3, que és la condició que genera una inducció de la resposta inflammatòria, no produeix cap efecte en l'expressió d'aquests dos marcadors. En el cas de les isoformes de ratolí, el silenciament d'mANT1 no produeix canvis en l'expressió de Hspa5 o CHOP10 en les cèl·lules HIB-1B, però el silenciament d'mANT2 sí té una tendència a induir-ne la seva expressió (Figura 49B), resultat que es confirma amb

## Resultats

els preadipòcits 3T3-L1 (Figura 49C), on aquesta tendència del silenciament de l'mANT2 a augmentar l'expressió d'Hspa5 i CHOP10 és tradueix en un augment significatiu.

Per tant, l'estrès de reticle no sembla estar implicat en la inducció de la resposta inflamatòria com a conseqüència del silenciament de l'hANT3 humà. Tanmateix, en el cas del silenciament de l'mANT2 de ratolí, no es pot descartar que l'estrès de reticle actuï en la inducció de la resposta inflamatòria. Això podria estar relacionat amb el major grau d'efecte que s'observa amb el silenciament d'mANT2 en cèl·lules de ratolí que amb el silenciament d'hANT3 en cèl·lules humanes.



**Figura 49. Anàlisi transcripcional de marcadors d'estrès de reticle endoplasmàtic en cèl·lules HeLa, HIB-1B i 3T3-L1 transfectades amb els shRNA.** Determinació de l'expressió gènica de Hspa5 i CHOP10 mitjançant *real-time* PCR en (A) cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores; i (B) en cèl·lules HIB-1B i (C) en preadipòcits 3T3-L1 transfectats amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives per efecte dels shRNA respecte shANTm.

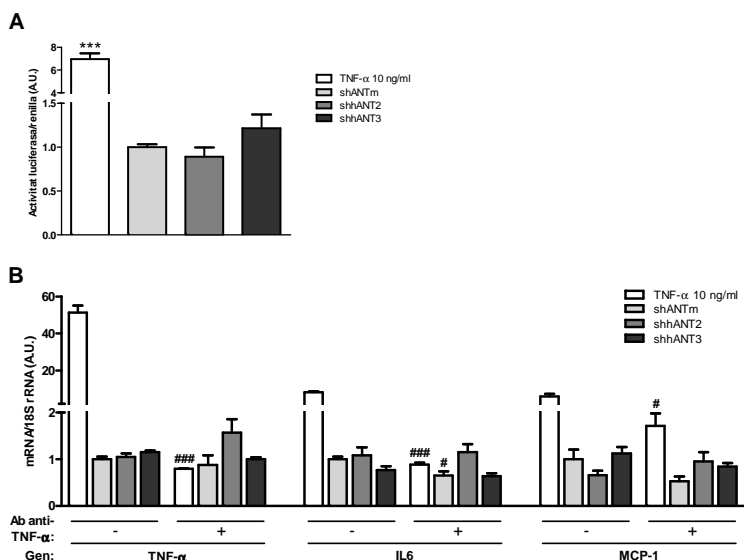
Després d'haver analitzat els possibles mecanismes que vinculin el silenciament específic d'una isoforma ANT amb la resposta inflamatòria, vam voler esbrinar si la inducció transcripcional de les diferents citoquines va acompanyada de la seva síntesi i alliberament al medi, i si són funcionals.

Un dels mètodes més directes per a la quantificació en medi de les citoquines descrites que augmenten la seva expressió per efecte del silenciament d'hANT3 en cèl·lules HeLa és per ELISA. També es va optar per intentar immunodetectar les citoquines per *western blot*. Emperò, aquests mètodes són poc sensibles en el nostre cas, pel que vam haver d'utilitzar altres sistemes que ens permetessin comprovar la secreció de les citoquines al medi. Així, vam optar per a realitzar un bioassaig mitjançant l'ús de medis condicionats, el que permet estudiar els efectes de les citoquines alliberades en els medis de cultiu de les cèl·lules transfectades amb els shRNA.

Primerament, es van transfectar cèl·lules HeLa amb el gen reporter NF- $\kappa$ B-Luc, que codifica per l'enzim luciferasa sota el control del promotor d'NF- $\kappa$ B, el qual respon a estímuls com estrès, radicals lliures, irradiació d'UV, antigens bacterians o virals, o citoquines. Per tant, el grau d'expressió i activitat luciferasa depèn de l'activació del promotor. 24 hores després de ser transfectades, les cèl·lules es van incubar durant 24 hores més amb medis provinents de cèl·lules HeLa prèviament transfectades amb l'shANTm, l'shhANT2 o l'shhANT3 durant 48 hores. A més a més, també es van tractar cèl·lules transfectades amb NF- $\kappa$ B-Luc amb TNF- $\alpha$  10 ng/ml durant 3 hores com a control positiu del sistema de transfecció de la construcció NF- $\kappa$ B-Luc, resposta del promotor i activitat luciferasa (Figura 50A). L'activitat del promotor NF- $\kappa$ B de les cèl·lules incubades amb el medi provinent de les cèl·lules silenciades per hANT2 són similars a la de les cèl·lules incubades amb el medi de cèl·lules control (shANTm), mentre que les que han estat incubades amb el medi de cèl·lules amb hANT3 silenciats, que són les que mostraven una inducció transcripcional de les citoquines, presenten un augment en l'activitat del promotor, tot i que no arriba a ser estadísticament significatiu.



## Resultats



**Figura 50.** Mesura de l'activitat luciferasa regulada pel promotor d'NF-κB i anàlisi transcripcional de marcadors inflamatoris en cèl·lules HeLa en resposta a la incubació amb medis provinents de cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA d'hANT2 i hANT3. **(A)** Quantificació de l'activitat luciferasa (corregida per l'activitat renilla) regulada per l'activitat del promotor d'NF-κB en cèl·lules HeLa cotransfectades amb les construccions NF-κB-Luciferasa i Renilla durant 24 hores i incubades durant 24 hores més amb els medis provinents de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores. **(B)** Determinació de l'expressió gènica de TNF-α, IL-6 i MCP-1 mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HeLa incubades durant 48 hores amb els medis provinents de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores en presència, o no, de 2 μg/ml d'anticòs anti-TNF-α. Tractament de cèl·lules HeLa amb TNF-α 10 ng/ml durant 3 hores com a control positiu. \* representa diferències significatives entre el medi shANTm i shhANT2, shhANT3 o TNF-α, i # per efecte de l'anticòs anti-TNF-α.

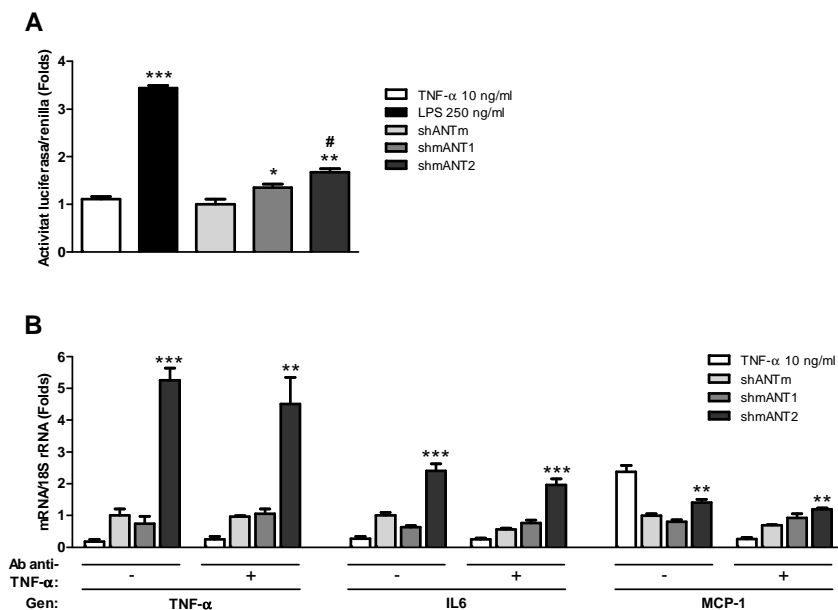
Degut a la manca d'una resposta clara per part del promotor NF-κB-Luc als medis provinents de les cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA, es va optar per estudiar directament la resposta transcripcional de diverses citocines en cèl·lules HeLa per efecte d'aquests medis. Així, es van incubar cèl·lules HeLa durant 48 hores amb els medis obtinguts dels cultius de cèl·lules HeLa transfectades amb shANTm, shhANT2 o shhANT3 durant 48 hores. A més, es va realitzar la incubació amb presència, o no, de 2 μg/ml d'anticòs anti-TNF-α, per tal de descriure la importància d'aquesta citocina en la possible resposta de les

cèl·lules. A part, també es va incloure un tractament de cèl·lules HeLa amb 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  com un control de sensibilitat de resposta de les cèl·lules HeLa a aquest factor i com a control del correcte funcionament de l'anticòs bloquejador (Figura 50B). Tot i que les cèl·lules HeLa augmenten l'expressió de TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1 en resposta al tractament amb TNF- $\alpha$  i que aquest estímul desapareix per efecte de la presència de l'anticòs anti-TNF- $\alpha$ , la incubació amb qualsevol dels medis no produeix cap resposta transcripcional d'aquestes citoquines.

Per tant, en cèl·lules HeLa, la producció de citoquines per efecte del silenciament d'hANT3 no sembla ser suficient per a induir una resposta biològica. En funció d'aquests resultats, els quals no són concloents ja que l'ús dels medis condicionats no produeixen una resposta clara en les cèl·lules HeLa incubades, vam dur a terme aquestes mateixes aproximacions amb cèl·lules HIB-1B, les quals tenen una resposta transcripcional més potent per efecte del silenciament d'mANT2, amb l'objectiu de confirmar si aquesta inducció es tradueix amb la seva síntesi i secreció.

Primer, es van cotransfectar cèl·lules HIB-1B amb el gen reporter NF- $\kappa$ B-Luc durant 24 hores, i posteriorment es van incubar durant 24 hores més amb medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades prèviament durant 48 hores amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 (Figura 51A). A més, es van incubar cèl·lules HIB-1B amb TNF- $\alpha$  10 ng/ml o LPS 250 ng/ml durant 3 hores com a controls positius d'activació del promotor d'NF- $\kappa$ B. En aquest sentit, les cèl·lules HIB-1B transfectades amb la construcció NF- $\kappa$ B-Luc responen de forma destacable a l'LPS, mentre que el tractament amb TNF- $\alpha$  no indueix l'activitat luciferasa. La incubació amb el medi obtingut de cèl·lules transfectades amb l'shmANT1 produeix un augment del 35% de l'activitat del promotor NF- $\kappa$ B respecte les cèl·lules incubades amb el medi provinent de cèl·lules transfectades amb l'shANTm. Per altra banda, la incubació amb el medi obtingut de les cèl·lules transfectades amb l'shmANT2 produeix un 67% d'augment de l'activitat luciferasa. Per tant, el medi obtingut de les cèl·lules HIB-1B amb silenciament d'mANT2 es capaç de produir una resposta inflamatòria.

## Resultats



**Figura 51. Mesura de l'activitat luciferasa regulada pel promotor d'NF-κB i anàlisi transcripcional de marcadors inflamatoris en cèl·lules HIB-1B en resposta a la incubació amb medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'mANT1 i mANT2. (A) Quantificació de l'activitat luciferasa (corregida per l'activitat renilla) regulada pel promotor d'NF-κB en cèl·lules HIB-1B cotransfectades amb les construccions NF-κB-Luciferasa i Renilla durant 24 hores i incubades durant 24 hores més amb els medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores. Tractament de cèl·lules HIB-1B amb LPS 250 ng/ml o TNF-α 10 ng/ml durant 3 hores com a control positiu d'activitat del promotor. (B) Determinació de l'expressió gènica de TNF-α, IL-6 i MCP-1 mitjançant *real-time* PCR en cèl·lules HeLa incubades durant 48 hores amb els medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores en presència, o no, de 2 μg/ml d'anticòs anti-TNF-α. Tractament de cèl·lules HIB-1B amb TNF-α 10 ng/ml durant 3 hores com a control positiu. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2, i # entre shmANT1 i shmANT2.**

Amb l'objectiu d'estudiar la contribució del TNF-α en aquesta resposta, es van incubar cèl·lules HIB-1B amb la presència, o no, de 2 μg/ml d'anticòs anti-TNF-α durant 6 hores amb medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores i es van quantificar per *real-time PCR* els nivells d'expressió de TNF-α, IL-6 i MCP-1. A més, es va realitzar un tractament amb 10 ng/ml de TNF-α (Figura 51B). Es torna a confirmar que el

TNF- $\alpha$  no indueix l'expressió de TNF- $\alpha$  ni de la IL-6 en cèl·lules HIB-1B. Emperò, el tractament amb TNF- $\alpha$  sí indueix l'expressió d'MCP-1, i es perd quan hi ha anticòs en el medi d'incubació. Respecte a l'efecte produït per la incubació amb els medis, el medi obtingut de cèl·lules HIB-1B transfectades amb l'shmANT2 produeix un important augment de l'expressió de TNF- $\alpha$  i IL-6, i en menor mesura, d'MCP-1. Aquest efecte inductor no depèn de TNF- $\alpha$ , ja que l'anticòs afegit al medi d'incubació no bloqueja aquest efecte.

Per tal de confirmar que en el medi de cultiu procedent de les cèl·lules HIB-1B hi ha present una barreja de factors capaços d'induir una resposta inflamatòria en altres cèl·lules, es van incubar altres línies cel·lulars amb aquests medis. En primer lloc es van utilitzar macròfags de ratolí Raw 264.7 (Figura 52A), que al tractar-se de la línia limfocitària, a priori, haurien de ser sensibles als estímuls produïts per citoquines com TNF- $\alpha$ . Els macròfags Raw incubats amb el medi provinent de les cèl·lules HIB-1B transfectades amb l'shmANT2 augmenten la transcripció de TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1, independentment de la presència d'anticòs anti-TNF- $\alpha$ . El medi provinent de les cèl·lules HIB-1B transfectades amb l'shmANT1 no duu a terme cap efecte diferent en la regulació transcripcional d'aquestes citoquines respecte a les incubades amb el medi shmANT1. Estranyament, aquestes cèl·lules no indueixen l'expressió de TNF- $\alpha$ , IL-6 o MCP-1 quan són incubades amb 10 ng/ml de TNF- $\alpha$ .

Amb l'objectiu de comprovar que els macròfags Raw 264.7 són capaços de respondre a estímuls proinflamatoris, es van incubar macròfags amb TNF- $\alpha$  10 ng/ml o LPS 1  $\mu$ g/ml durant 6 hores i es va determinar l'expressió gènica de TNF- $\alpha$  i de MCP-1 (Figura 52B). Es confirma que el tractament amb TNF- $\alpha$  no té cap efecte en la inducció de la transcripció del gen del TNF- $\alpha$  i un petit augment de l'expressió d'MCP-1. En canvi, l'LPS produeix un potent efecte activador de la transcripció de TNF- $\alpha$  i d'MCP-1, molt superior al induït per TNF- $\alpha$ . Per tant, tot i que contràriament al que esperàvem els macròfags Raw tenen una molt baixa sensibilitat al TNF- $\alpha$ , sí responen al medi provinent de les cèl·lules HIB-1B silenciades per mANT2.

## Resultats

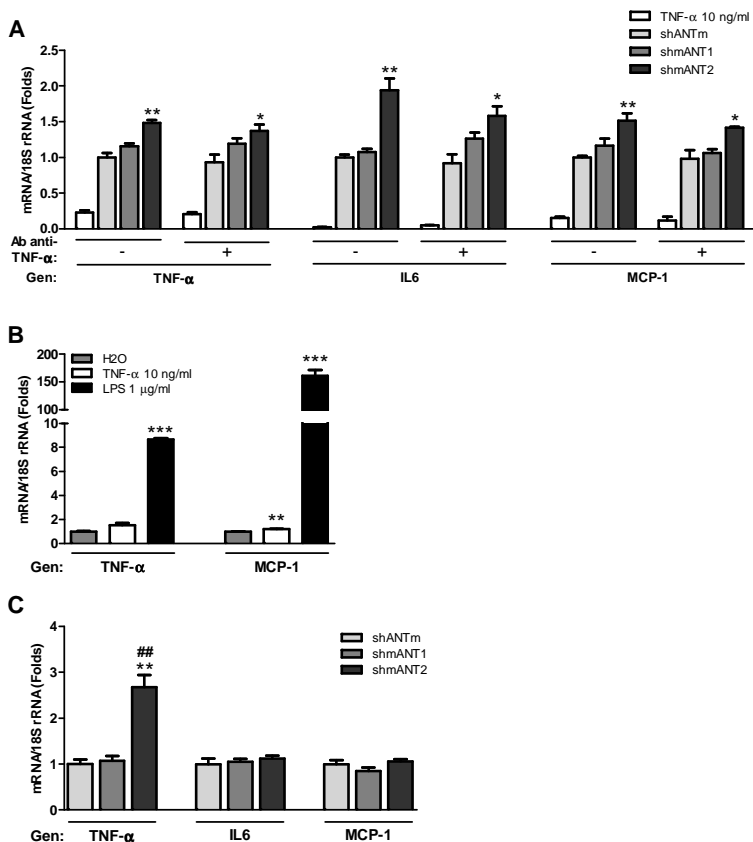


Figura 52. Anàlisi transcripcional de marcadors inflamatoris en macròfags Raw i adipòcits 3T3-L1 en resposta a la incubació amb medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'mANT1 i mANT2. (A) Determinació de l'expressió gènica de TNF-α, IL-6 i MCP-1 mitjançant *real-time* PCR en macròfags Raw incubats durant 48 hores amb medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores en presència, o no, de 2 μg/ml d'anticòs anti-TNF-α. Tractament de cèl·lules HeLa amb TNF-α 10 ng/ml durant 3 hores com a control positiu. (B) Determinació de l'expressió gènica de TNF-α i MCP-1 mitjançant *real-time* PCR en macròfags Raw incubats amb aigua (vehicle), TNF-α 10 ng/ml o LPS 1 μg/ml durant 6 hores. (C) Determinació de l'expressió gènica de TNF-α, IL-6 i MCP-1 mitjançant *real-time* PCR en adipòcits 3T3-L1 incubats durant 48 hores amb medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 o shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2, i # entre shmANT1 i shmANT2.

Segonament, es van incubar adipòcits 3T3-L1 amb els medis provinents de cèl·lules HIB-1B silenciades per mANT1 o mANT2, ja que els adipòcits dintre del seu context fisiològic estan altament regulats pels senyals inflamatoris. En aquest cas, els adipòcits 3T3-L1 responen clarament al medi de cèl·lules HIB-1B transfectades amb l'shmANT2, augmentant la transcripció de TNF- $\alpha$ , tot i que no es produeix una resposta de la IL-6 ni del MCP-1 (Figura 52C).

Així, tot i que les cèl·lules HIB-1B i els macròfags Raw 264.7 tenen una molt baixa resposta al TNF- $\alpha$ , el conjunt de resultats en les diferents cèl·lules utilitzades ens indica que el medi provinent de cèl·lules HIB-1B transfectades amb l'shmANT2 conté un conjunt de factors capaços d'induir una resposta inflamatòria en les cèl·lules incubades.

Finalment, després d'haver analitzat que els medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA contenen una barreja de citoquines capaces de produir una resposta inflamatòria en altres cèl·lules incubades amb aquests medis, es va quantificar la concentració de proteïna de les diferents citoquines que s'indueixen transcripcionalment (TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1) per efecte del silenciament d'mANT2 mitjançant MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Kit (Figura 53). Els medis provinents de cèl·lules HIB-1B silenciades per mANT2 contenen aproximadament 20 vegades més d'IL-6 i el doble de MCP-1 que els medis de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm o shmANT1. Respecte al TNF- $\alpha$ , els seus nivells en els medis són inferiors als límits de detecció de la tècnica.

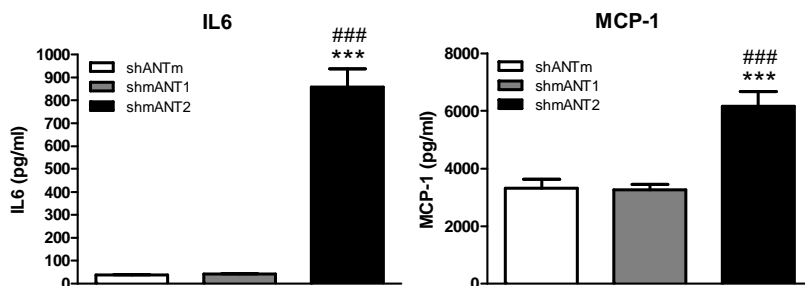


Figura 53. Quantificació de les citoquines en medi de cèl·lules HIB-1B transfectades amb els shRNA d'mANT1 i mANT2. Determinació mitjançant MILLIPLEX® MAP Kit de la IL-6 i MCP-1 en medis provinents de cèl·lules HIB-1B transfectades amb shANTm, shmANT1 i shmANT2 durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre shANTm i shmANT1 o shmANT2, i # entre shmANT1 i shmANT2.

Per tant, el silenciament d'mANT2 en cèl·lules HIB-1B desencadena la inducció gènica de TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1 i d'aquestes, la IL-6 i l'MCP-1 són secretades al medi en suficient quantitat per a ser capaces de produir una resposta inflamatòria en altres cèl·lules quan són incubades amb aquest medi.







### III. EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE LA ISOFORMA 2 HUMANA DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA EN LÍNIES CEL·LULARS HUMANES I DE RATOLÍ.

L'objectiu d'aquest bloc d'experiments era estudiar els efectes funcionals derivats de la sobreexpressió de la isoforma hANT2 humana en diverses línies cel·lulars, tant humanes com de ratolí. La isoforma hANT1 humana no s'ha estudiat ja que la seva expressió està molt restringida a cor, múscul esquelètic i cervell, i no ha estat un objectiu del present treball l'estudi de la seva activitat. A més, la sobreexpressió d'aquesta isoforma indueix apoptosi (Zamora et al., 2004b). Així mateix, degut a que la sobreexpressió d'hANT3 en cultius cel·lulars també genera apoptosi (Zamora et al., 2004a), només s'han estudiat les conseqüències metabòliques derivades de la sobreexpressió d'hANT2 en cèl·lules HeLa, HepG<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i 3T3-L1.

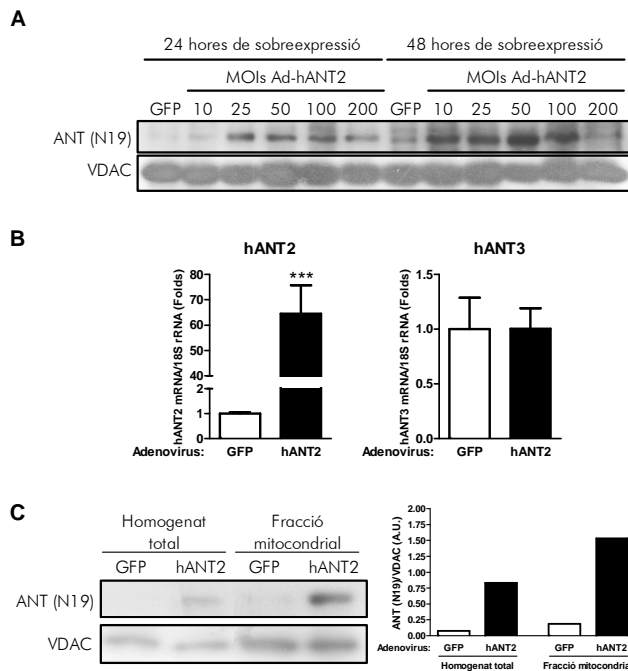
#### III.1 Sobreexpressió de l'ANT2 humana en cèl·lules HeLa.

La sobreexpressió d'una proteïna en una línia cel·lular es pot abordar mitjançant la transfecció transitòria o mitjançant la transducció d'adenovirus portadors del vector d'expressió de la proteïna desitjada. En el nostre cas, obeint l'objectiu de sobreexpressar hANT2 en diferents línies cel·lulars, algunes de les quals es tracten de cèl·lules diferenciades, es va optar per la transducció adenovírica, la qual ens ha permès la introducció amb una elevada eficiència del vector d'expressió en cèl·lules tant en proliferació (HeLa, HepG<sub>2</sub>) com diferenciades (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, 3T3-L1). Inicialment es van transduir cèl·lules HeLa amb els adenovirus portadors del vector d'expressió de GFP (control de transducció) o d'hANT2 a diferents MOIs (10, 25, 50, 100 i 200) durant 24 o 48 hores i es va immunodetectar per *western blot* la proteïna ANT i VDAC (control de càrrega) (Figura 54A) per tal de determinar el MOI i temps de transducció mínims que garanteixin una correcta sobreexpressió de proteïna hANT2. Així, podem observar com a les 24 hores ja hi ha un augment en els nivells de proteïna ANT amb l'ús d'un MOI 25, i que a les 48 hores, també

## Resultats

té lloc a MOIs inferiors (MOI 10). L'ús de MOI molt alts (100 o 200) no es tradueix en uns nivells de proteïna ANT clarament superiors als aconseguits a MOI 25 o 50, pel que es va decidir que un MOI de 50 era suficient per a obtenir una potent sobreexpressió d'hANT2. A continuació es va determinar mitjançant *real-time PCR* l'expressió d'hANT3, a part de la d'hANT2, per tal de descartar que la sobreexpressió d'hANT2 no produïa una regulació transcripcional compensatòria, a l'alça o a la baixa, d'hANT3, que és l'altra isoforma present de forma important en les cèl·lules HeLa (Figura 54B). La transducció d'hANT2 a un MOI 50 durant 48 hores produeix un augment dels nivells d'mRNA d'hANT2 superiors a les 60 vegades als presents en les cèl·lules transduïdes amb GFP sense produir canvis en l'expressió d'hANT3. Per tant, la sobreexpressió d'hANT2 no modifica l'expressió d'hANT3 en cèl·lules HeLa.

A més, també es va comprovar si la proteïna hANT2 sintetitzada *de novo* era transportada a mitocondri, que és la seva localització fisiològica en la cèl·lula. Mitjançant *western blot*, es va immunodetectar la proteïna ANT i VDAC (control de càrrega) en homogenats totals i en fraccions enriquides de mitocondris de cèl·lules HeLa transduïdes amb GFP o hANT2 durant 48 hores (Figura 54C). En els homogenats totals es pot observar l'augment de proteïna ANT en les cèl·lules transduïdes amb hANT2, però sobretot s'observa clarament l'augment de proteïna quan s'immunodetecta ANT en la fracció enriquida de mitocondris, certificant que la transducció amb hANT2 produeix un augment de proteïna i que aquesta es troba a mitocondri.

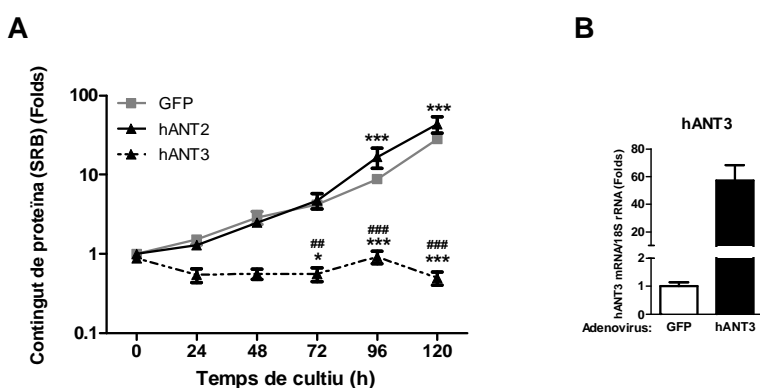


**Figura 54. Caracterització de l'eficiència de la transducció adenovírica de l'hANT2 humana en cèl·lules HeLa.** (A) Immunodetecció de l'ANT (N19) i VDAC (control de càrrega) en 40 µg d'homogenat total de cèl·lules HeLa transduïdes amb els adenovirus de GFP (control) o hANT2 a diferents MOI durant 24 o 48 hores. (B) Determinació de l'expressió gènica de les isoformes humanes d'hANT2 i hANT3 mitjançant *real-time* PCR i (C) immunodetecció i quantificació de l'ANT (N19) i VDAC (control de càrrega) en 40 µg d'homogenat total o fracció enriquida de mitocondris de cèl·lules HeLa transduïdes amb els adenovirus GFP (control) o hANT2 (MOI 50) durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

A continuació es va estudiar si un augment d'hANT2 comportava canvis en la capacitat de créixer de les cèl·lules HeLa. A partir de cèl·lules HeLa transduïdes amb els adenovirus de GFP o d'hANT2 durant 48 hores, es van aixecar les cèl·lules i es van replaquejar a baixa densitat per tal de permetre el seu creixement sense limitacions per efecte de la confluència. Durant 5 dies després del replaqueig, es va mesurar cada 24 hores el creixement cel·lular mitjançant la quantificació de la proteïna total en el cultiu per tinció amb sulfurodamina B (Figura 55A). Per tal de comprovar l'activitat diferencial d'hANT2 i hANT3, també es van transduir cèl·lules amb l'adenovirus d'hANT3. Les cèl·lules que

## Resultats

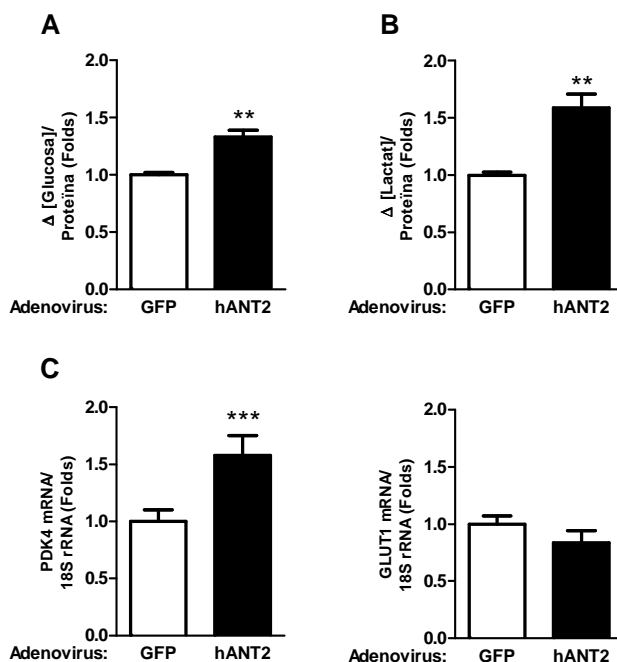
sobreexpressen hANT2 creixen més que les cèl·lules control a partir de les 72 hores del replaueig. Per altra banda, comprovem com les cèl·lules que sobreexpressen hANT3 presenten un creixement nul, fet que concorda amb l'activitat proapoptòtica que li hem atribuït quan se sobreexpressa en cèl·lules en cultiu (Zamora et al., 2004a). Es van determinar els nivells d'hANT3 per *real-time PCR*, per tal de confirmar que la transducció de cèl·lules HeLa amb l'adenovirus d'hANT3 durant 48 hores produeix una correcta sobreexpressió d'hANT3 i que els efectes proapoptòtics són deguts a aquesta sobreexpressió d'hANT3 (Figura 55B).



**Figura 55. Anàlisi del creixement cel·lular en cèl·lules HeLa transduïdes amb els adenovirus de l'hANT2 i l'hANT3 humanes.** (A) Quantificació del contingut de proteïna total mitjançant tinció amb sulfurodamina B cada 24 hores de cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de GFP (control), hANT2 o hANT3 humanes. (B) Determinació de l'expressió gènica de la isoforma hANT3 humana mitjançant *real-time PCR* hores de cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de GFP (control), hANT2 o hANT3 humanes (MOI 50) durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2 i # entre hANT2 i hANT3.

Havent vist que una de les conseqüències de l'augment d'hANT2 és l'increment en el creixement cel·lular, es va analitzar si aquest fenomen s'acompanya de cap canvi metabòlic. A partir dels medis de cèl·lules HeLa transduïdes amb els adenovirus de GFP o hANT2 durant 48 hores, es va quantificar el consum de glucosa (Figura 56A) i la producció de lactat (Figura 56B). La sobreexpressió d'hANT2 comporta un important augment del consum de

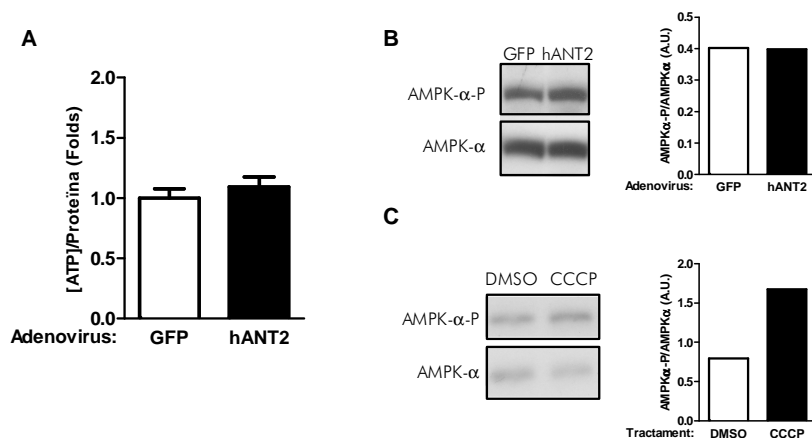
glucosa i de la producció de lactat, indicant un increment de la glucòlisi aeròbica. En vistes d'aquests resultats, es va determinar per *real-time PCR* l'expressió gènica de dues proteïnes reguladores de les vies d'utilització de la glucosa, la PDK4 i el GLUT1 (Figura 56C). Tot i que no s'aprecien canvis en l'expressió de la GLUT1, l'augment d'hANT2 comporta una inducció de l'expressió de la PDK4, l'activitat quinasa de la qual inhibeix l'activitat de la piruvat deshidrogenasa, que és l'enzim encarregat de transformar el piruvat en acetil-CoA, fet que lligaria amb l'augment de la producció de lactat en detriment de la via oxidativa de la glucosa.



**Figura 56.** Caracterització del perfil metabòlic de cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de l'hANT2 humana. Quantificació (A) del consum de glucosa i (B) de la producció de lactat en cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de GFP (control) o de l'hANT2 humana durant 48 hores. (C) Determinació de l'expressió gènica de la PDK4 i GLUT1 en cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de GFP o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

## Resultats

Per tal se saber si l'augment de la glucòlisi desencadenat per la sobreexpressió d'hANT2 comporta canvis en l'estat energètic de les cèl·lules, es van quantificar els nivells d'ATP (Figura 57A) i es va analitzar per *western blot* les formes fosforilada i total de l'AMPK- $\alpha$  (Figura 57B). Un augment d'hANT2 no produeix canvis en la concentració de l'ATP cel·lular, així com tampoc en l'activació de l'AMPK- $\alpha$ . Per tal de confirmar que la via d'activació de l'AMPK- $\alpha$  està conservada en cèl·lules HeLa, es van incubar cèl·lules amb DMSO o CCCP 10  $\mu$ M durant 3 hores i es va immunodetectar la forma fosforilada i total de l'AMPK- $\alpha$ , veient que la forma activada augmenta en les cèl·lules incubades amb CCCP. Per tant, l'augment del creixement cel·lular i de la glucòlisi associat a l'augment d'hANT2 no va acompanyat d'una alteració de l'estat energètic de les cèl·lules.



**Figura 57. Quantificació de l'ATP cel·lular i anàlisi per *western blot* de l'activació de l'AMPK- $\alpha$  en cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de l'hANT2 humana.** (A) Quantificació de l'ATP intracel·lular de cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de GFP o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores. Immunodetecció de l'AMPK- $\alpha$  fosforilada (AMPK- $\alpha$ -P) i total (AMPK- $\alpha$ ) a partir de 40  $\mu$ g d'extracte total de cèl·lules HeLa (B) transduïdes amb l'adenovirus de GFP (control) o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores o (C) incubades amb DMSO o CCCP 10  $\mu$ M durant 3 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

Ja que la sobreexpressió d'hANT2 en cèl·lules HeLa augmenta la seva capacitat glucolítica i la proliferació cel·lular, ens vam plantejar saber si la sobreexpressió d'hANT2 confereix protecció a les cèl·lules en una situació de manca de la funció mitocondrial, mitjançant la inhibició de l'ATP-sintasa per l'oligomicina. Amb aquest objectiu, es va quantificar l'ATP de cèl·lules HeLa transduïdes amb els adenovirus de GFP o hANT2 durant 48 hores, moment en què s'incuben les cèl·lules durant 30 minuts amb medi DMEM amb glucosa 10 mM o sense glucosa i, en presència, o no, d'oligomicina 1 o 2.5  $\mu$ M (Figura 58).

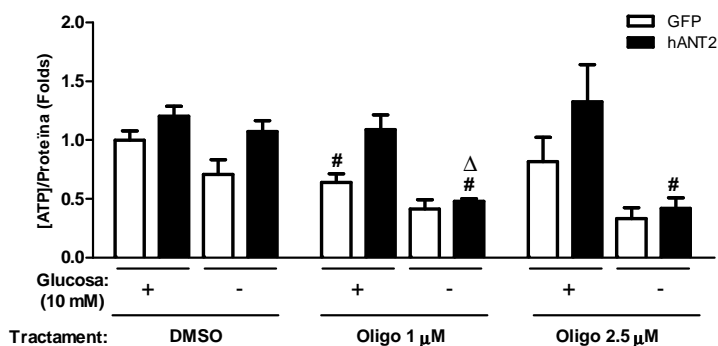
En primer lloc, podem observar que les cèl·lules GFP en absència de glucosa durant 30 minuts no canvia els nivells d'ATP. Quan s'inhibeix el metabolisme oxidatiu amb l'oligomicina, si hi ha disponibilitat de glucosa, les cèl·lules tenen la capacitat de mantenir els nivells d'ATP, confirmant la importància de la glucòlisi aeròbica (efecte Warburg) en aquestes cèl·lules. El tractament amb oligomicina i en absència de glucosa sí disminueix els nivells d'ATP, tot i que no siguin diferències estadísticament significatives. Per tant, les cèl·lules HeLa són predominantment glucolítiques. No obstant, en absència de glucosa, les cèl·lules activen el metabolisme oxidatiu, el qual, en condicions normals, no contribueix de manera destacable en el metabolisme energètic, però que és capaç de mantenir l'estat energètic de les cèl·lules quan aquestes no poden realitzar la glucòlisi.

Per altra banda, la sobreexpressió d'hANT2 no produeix canvis destacables en els nivells d'ATP cel·lulars en presència o absència de glucosa. La inhibició del metabolisme oxidatiu amb oligomicina en cèl·lules que sobreexpressen hANT2 i disposen de glucosa en el medi no disminueix l'ATP cel·lular i, a més, existeix una tendència a que aquests valors siguin superiors als de les cèl·lules control (GFP). Per últim, en la situació en què es tracten les cèl·lules amb oligomicina (qualsevol de les dues concentracions) en absència de glucosa, els nivells d'ATP també disminueixen en les cèl·lules amb sobreexpressió d'hANT2. Per tant, semblaria que quan les cèl·lules es troben en una situació en què els hi és obligat realitzar la glucòlisi (disponibilitat de glucosa i tractament amb oligomicina), la sobreexpressió



## Resultats

d'hANT2 pot conferir a les cèl·lules un cert avantatge energètic, confirmant l'activitat proglucolítica d'hANT2.



**Figura 58. Quantificació de l'ATP cel·lular en cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de l'hANT2 humana i incubades amb o sense glucosa i tractades amb oligomicina.** Quantificació de l'ATP intracel·lular de cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de GFP o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores i incubades amb o sense glucosa 10 mM i amb DMSO, oligomicina 1 μM o oligomicina 2.5 μM durant 30 minuts. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2, Δ per efecte de la glucosa i # per efecte de l'oligomicina.

Sabent que la sobreexpressió d'hANT3 induïx apoptosi en cèl·lules en cultiu, amb l'objectiu de trobar diferències funcionals, no exclusivament metabòliques, entre les dues isoformes, es va analitzar si la sobreexpressió d'hANT2 podia tenir un efecte protector davant estímuls apoptòtics, ja que està descrit que la manca d'hANT2 sensibilitza les cèl·lules a l'efecte de diversos tractaments proapoptòtics (Le Bras M. et al., 2006). Es van transduir cèl·lules HeLa amb els adenovirus de GFP (control de transducció) o hANT2 durant 48 hores i es van incubar durant les últimes 6 hores amb DMSO (control de tractament), lonidamina 0.25 nM, estaurosporina 0.1 o 0.25 μM, o etopòsid 0.1 mM. La lonidamina és un derivat de l'àcid indazol-3-carboxílic que inhibeix l'hexoquinasa i, en conseqüència, impossibilita a les cèl·lules tumorals realitzar tant la glucòlisi com la respiració mitocondrial (Pelicano et al., 2006). L'estaurosporina és un antibiòtic que promou l'apoptosi a través de l'activació de JKN1, la caspasa 3 i factors de transcripció com AP-1 i NF-κB (Chae et al., 2000). Per la seva banda,

l'etopòsid és un citostàtic que actua inhibint la topoisomerasa II, el que produeix la fragmentació del DNA i la conseqüent aturada de la proliferació, induint l'apoptosi en cèl·lules tumorals (Hande, 1998). Primerament es va determinar la capacitat d'aquests compostos per a induir la mort cel·lular. Per a fer-ho, es va quantificar per citometria de flux el percentatge de cèl·lules marcades positivament amb iodur de propidi (Figura 59A). Els diferents tractaments de les cèl·lules transduïdes amb GFP produeixen un augment del percentatge de cèl·lules mortes, tot i que només el tractament amb estaurosporina és estadísticament significatiu. La sobreexpressió d'hANT2 és capaç de reduir el percentatge de cèl·lules mortes en la situació control de tractament (DMSO). A més, aquest efecte protector davant la mort cel·lular també té lloc quan les cèl·lules són incubades amb l'estaurosporina o amb l'etopòsid.

Lligat amb la mesura de mort cel·lular, es va quantificar el potencial de membrana mitocondrial, promig de la població total de cèl·lules, mitjançant marcatge amb DiIC<sub>1</sub>(5) (Figura 59B). En tots els tractaments, les cèl·lules transduïdes amb l'adenovirus d'hANT2 presenten uns nivells de potencial membrana superiors a les cèl·lules control, encara que només en el cas de l'estaurosporina 0.25  $\mu$ M, aquesta diferència és significativa.

Per últim, es van mesurar els nivells d'ATP (Figura 59C). A trets generals, tots els tractaments produeixen una important disminució de l'ATP cel·lular en les cèl·lules control (GFP), tret de la concentració de 0.1  $\mu$ M d'estaurosporina, que no arriba a ser significativa. En les cèl·lules amb sobreexpressió d'hANT2, el tractament amb lonidamina disminueix l'ATP tal i com ho fa amb les cèl·lules control. Per tant, la sobreexpressió d'hANT2 no genera cap avantatge a les cèl·lules tractades amb lonidamina, ja que la inhibició del metabolisme anaeròbic compromet la via d'obtenció d'energia a ambdues poblacions cel·lulars. L'estaurosporina 0.1  $\mu$ M no afecta la quantitat d'ATP de les cèl·lules amb sobreexpressió d'hANT2 i la dosi de 0.25  $\mu$ M no redueix l'ATP amb la mateixa severitat que ho fa en les cèl·lules control. D'igual manera, les cèl·lules transduïdes

## Resultats

amb hANT2 i tractades amb etopòsid també presenten tendència a mantenir nivells d'ATP superiors als de les cèl·lules control.

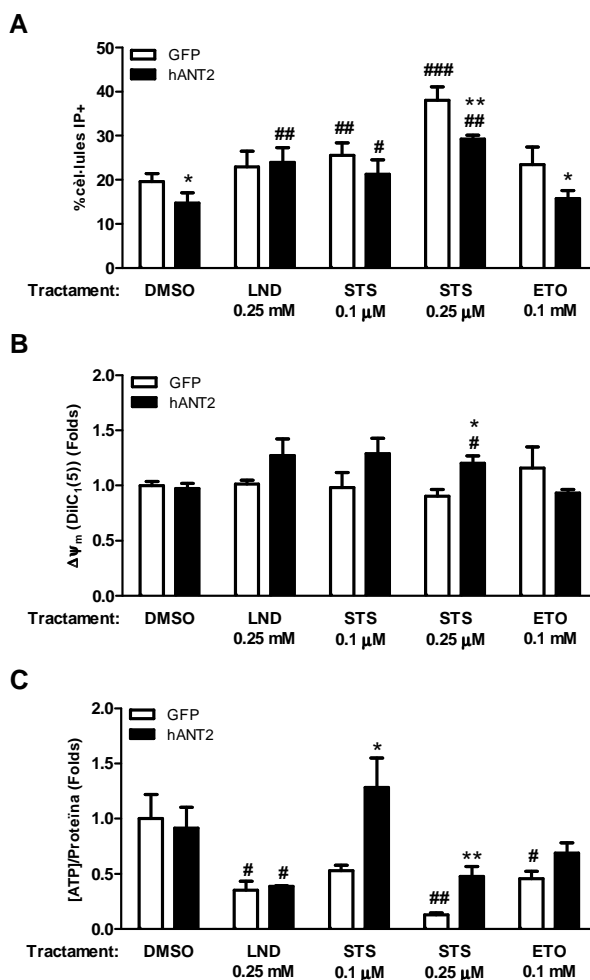
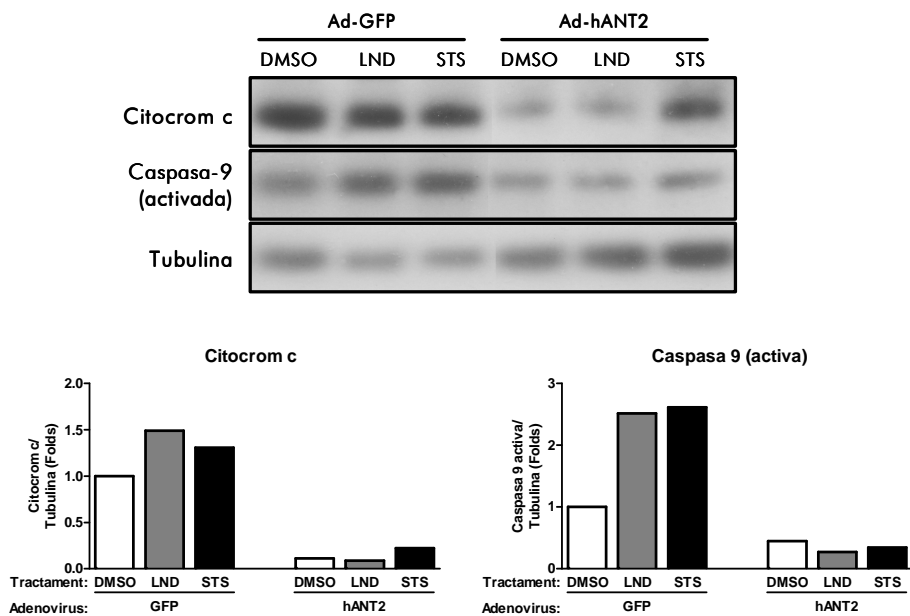


Figura 59. Quantificació de l'ATP cel·lular, percentatge de cèl·lules mortes i potencial de membrana mitocondrial en cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de l'hANT2 humana i tractades amb diversos inductors de l'apoptosi. Quantificació (A) del percentatge de cèl·lules mortes mitjançant el marcatge amb iodur de propidi (IP), (B) del potencial de membrana mitjançant el marcatge amb DiIC<sub>1</sub>(5) i (C) de l'ATP intracel·lular en cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de GFP o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores i incubades amb DMSO, lonidamina (LND) 0.25 nM, estaurosporina (STS) 0.1 o 0.25 μM, o etopòsid (ETO) 0.1 mM durant les últimes 6 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2 i # per efecte dels tractaments.

A més, es va analitzar per *western blot* si les diferències en el percentatge de cèl·lules mortes es deuen a apoptosi (Figura 60). A partir d'extractes citosòlics de cèl·lules HeLa transduïdes amb els adenovirus de GFP o d'hANT2 durant 48 hores i incubades amb DMSO (control de tractament), lonidamina 0.25 mM o estaurosporina 0.25  $\mu$ M durant les últimes 6 hores, es va immunodetectar l'alliberament de citocrom c en citosol, de la forma proteolitzada (activa) de la caspasa 9 i de la tubulina (control de càrrega). Tant el tractament amb lonidamina com amb estaurosporina de les cèl·lules transduïdes amb GFP produeix un augment de la quantitat de citocrom c en citosol. La sobreexpressió d'hANT2 per si sola confereix una clara disminució dels nivells de citocrom c en citosol. El tractament amb lonidamina en cèl·lules que sobreexpressen hANT2 no produeix cap efecte apreciable en els nivells de citocrom c citosòlics respecte les cèl·lules control (DMSO) i, tot i que l'estaurosporina augmenta l'alliberament de citocrom c al citosol respecte el seu control, els nivells són molt inferiors als que es detecten en les cèl·lules transduïdes amb GFP. Respecte a la caspasa 9, els tractaments de les cèl·lules GFP amb lonidamina i estaurosporina produeixen una clara activació, mentre que la sobreexpressió d'hANT2 disminueix l'activació de la caspasa 9 en la situació control i la impedeix de forma evident quan són tractades amb els diferents compostos proapoptòtics.

Per tant, la sobreexpressió d'hANT2 redueix el número de cèl·lules mortes per efecte dels diferents tractaments i limita l'activació de la via apoptòtica, fet que va acompanyat per uns nivells de potencial de membrana mitocondrial i d'ATP més alts.

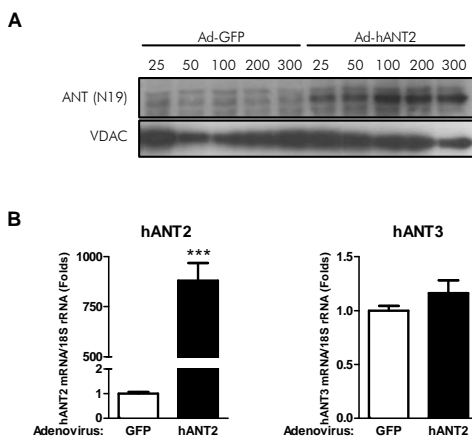
## Resultats



**Figura 60.** Anàlisi per *western blot* de la inducció d'apoptosi en cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de l'hANT2 humana i tractades amb diversos inductors de l'apoptosi. Immunodetecció del citocrom c, de la forma activa de la caspasa 9 i de la tubulina (control de càrrega) en 40 µg d'extracte citosòlic de cèl·lules HeLa transduïdes amb l'adenovirus de GFP o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores i incubades amb DMSO, Ionidamina (LND) 0.25 nM o estaurosporina (STS) 0.25 µM durant les últimes 6 hores.

### III.2 Sobreexpressió de l'ANT2 humana en cèl·lules HepG<sub>2</sub>.

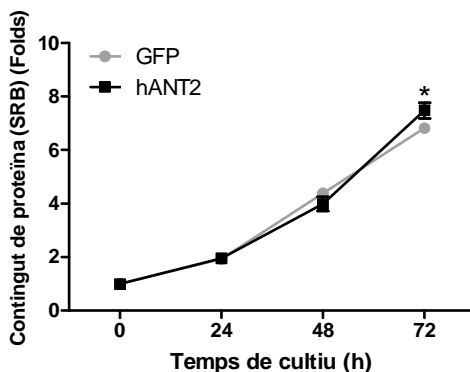
A part de les cèl·lules HeLa, també es van utilitzar cèl·lules HepG<sub>2</sub>, amb més capacitat oxidativa que les cèl·lules HeLa, per a estudiar els efectes de la sobreexpressió d'hANT2 en cèl·lules humanes. Primerament, es va analitzar el MOI mínim de l'adenovirus d'hANT2 per a obtenir una clara sobreexpressió. Es van transduir cèl·lules HepG<sub>2</sub> amb els adenovirus de GFP o hANT2 a diferents MOIs (25, 50, 100, 200 i 300) durant 48 hores i mitjançant *western blot* a partir d'homogenats totals es va immunodetectar la proteïna ANT i VDAC (control de càrrega) (Figura 61A). A les 48 hores de transducció, un MOI 25 és suficient per a observar un clar augment de proteïna ANT. A continuació es van quantificar els nivells d'mRNA per *real-time PCR* de les isoformes hANT2 i hANT3 en cèl·lules HepG<sub>2</sub> transduïdes amb els adenovirus de GFP o ANT2 a un MOI 50 durant 48 hores per tal de descartar qualsevol regulació compensatòria de la seva expressió (Figura 61B). La transducció amb l'adenovirus d'hANT2, com és lògic havent vist l'augment de proteïna, produeix un elevat augment dels seus nivells d'mRNA sense modificar l'expressió de la isoforma hANT3.



**Figura 61. Caracterització de l'eficiència de la transducció adenovírica de l'hANT2 humana en cèl·lules HepG<sub>2</sub>.** (A) Immunodetecció de l'ANT (N19) i VDAC (control de càrrega) en 40 µg d'homogenat total de cèl·lules HepG<sub>2</sub> transduïdes amb els adenovirus GFP (control) o hANT2 a diferents MOI durant 48 hores; i (B) determinació de l'expressió gènica de les isoformes humanes d'hANT2 i hANT3 (MOI 50) mitjançant *real-time PCR*. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

## Resultats

Una vegada comprovat que la transducció és un sistema eficient per a la sobreexpressió d'hANT2 en cèl·lules HepG<sub>2</sub>, es va analitzar la capacitat de creixement de les cèl·lules mitjançant tinció amb sulforodamina B (Figura 62). Les cèl·lules que sobreexpressen hANT2 disposen d'una major capacitat per créixer, ja que a les 72 hores de la transducció tenen uns valors lleugerament superiors de contingut proteic total que les cèl·lules transduïdes amb l'adenovirus de GFP.

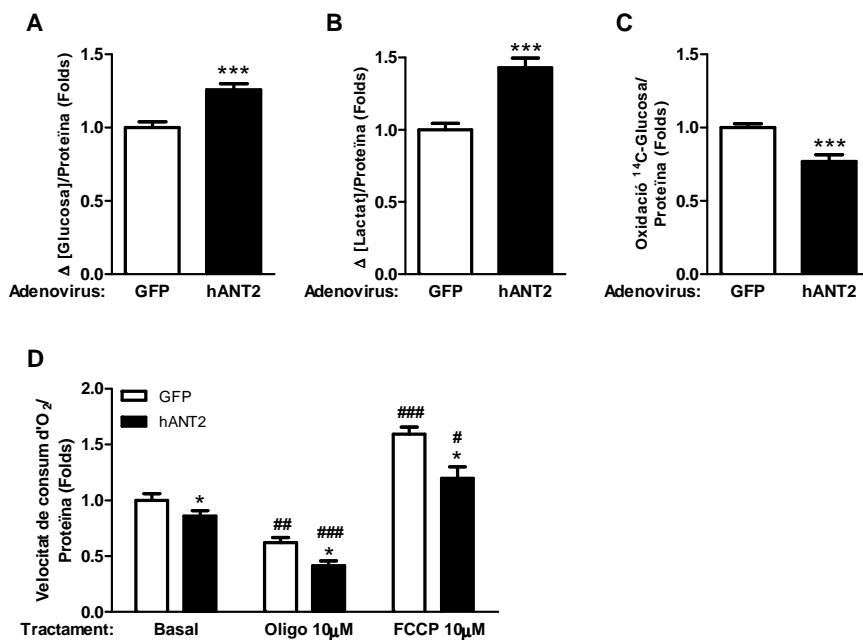


**Figura 62. Anàlisi del creixement cel·lular en cèl·lules HepG<sub>2</sub> transduïdes amb l'adenovirus de l'hANT2 humana.** Quantificació del contingut de proteïna total mitjançant tinció amb sulforodamina B cada 24 hores de cèl·lules HepG<sub>2</sub> transduïdes amb l'adenovirus de GFP (control) o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 72 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

A nivell metabòlic, les cèl·lules transduïdes amb l'adenovirus d'hANT2 augmenten el consum de glucosa (Figura 63A) i la producció de lactat (Figura 63B). A més, també presenten una disminució de la capacitat per a oxidar la glucosa (Figura 63C). Com a conseqüència d'aquesta observació, es va quantificar la velocitat de consum d'oxigen en cèl·lules HepG<sub>2</sub> transduïdes amb els adenovirus de GFP o hANT2 durant 48 hores i incubades amb DMSO (vehicle), oligomicina 10 µM o FCCP 10 µM (Figura 63D). Les cèl·lules HepG<sub>2</sub> tenen una activitat oxidativa superior a les cèl·lules HeLa, suficient per a permetre la mesura del consum d'oxigen en aquestes cèl·lules. La sobreexpressió d'hANT2 produeix una disminució de la velocitat de consum d'oxigen en estat basal (DMSO), en estat d'inhibició de la cadena respiratòria (oligomicina) i en estat de

desacoblament (FCCP). Per tant, la disminució de l'oxidació de la glucosa va acompanyada d'una menor velocitat de consum d'oxigen.

En conclusió, la sobreexpressió d'hANT2 en cèl·lules HepG<sub>2</sub> produeix un augment del creixement cel·lular i del metabolisme glucolític, i una inhibició del metabolisme oxidatiu.



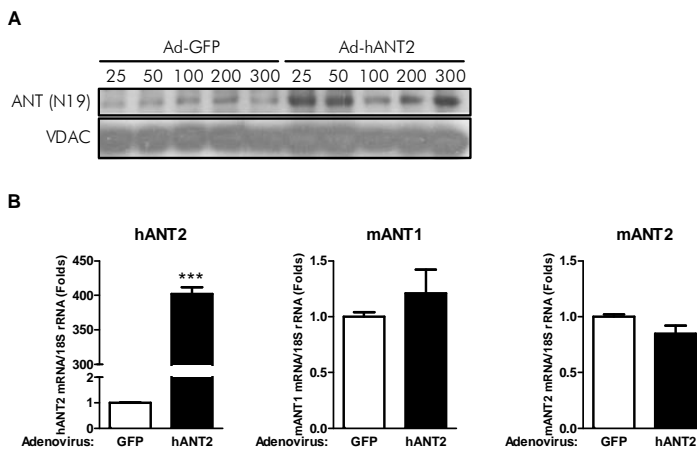
**Figura 63.** Caracterització del perfil metabòlic de cèl·lules HepG<sub>2</sub> transduïdes amb l'adenovirus de l'hANT2 humana. Quantificació (A) del consum de glucosa; (B) de la producció de lactat; (C) de l'oxidació de <sup>14</sup>C-glucosa i (D) de la velocitat de consum d'oxigen en cèl·lules HepG<sub>2</sub> transduïdes amb l'adenovirus de GFP (control) o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2 i # per efecte del tractament amb oligomicina o FCCP en la quantificació del consum d'oxigen.



### III.3 Sobreexpressió de l'ANT2 humana en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

A part de l'estudi dels efectes de la sobreexpressió d'hANT2 en 2 línies altament proliferatives com són les cèl·lules HeLa i les HepG<sub>2</sub>, també es van utilitzar línies cel·lulars amb la capacitat de diferenciació. Aquest és el cas dels miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, les quals es caracteritzen per tenir un elevat metabolisme oxidatiu. L'objectiu d'estudi en aquestes cèl·lules, les quals són de ratolí i no tenen proteïna hANT2 humana, era esbrinar si la sobreexpressió heteròloga d'hANT2 és capaç per si sola de canviar el metabolisme energètic, tal i com fa en HeLa i HepG<sub>2</sub>.

Per tal de comprovar la correcta transducció i sobreexpressió d'hANT2 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, es van immunodetectar la proteïna ANT i VDAC (control de càrrega) en homogenats totals de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb els adenovirus de GFP i hANT2 a MOIs 25, 50, 100, 200 i 300 durant 48 hores (Figura 64A). Tot i que els miotubs no produeixen la isoforma hANT2 humana, degut a què l'anticòs utilitzat no detecta de forma específica una o altra isoforma, en els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb GFP també es detecta la proteïna ANT endògena. En els miotubs transduïts amb l'adenovirus d'hANT2 es pot detectar un clar augment en els nivells de proteïna ANT, que podem atribuir a la sobreexpressió de l'hANT2 humana. A més, es van quantificar els nivells d'mRNA de l'hANT2 humana i de l'mANT1 i mANT2 de ratolí propis de les cèl·lules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> per *real-time PCR* després de transduir els miotubs amb els adenovirus de GFP o hANT2 a un MOI 50 durant 48 hores (Figura 64B). Lògicament, només es pot detectar l'mRNA de l'hANT2 humana els miotubs transduïts amb l'Ad-hANT2, ja que les cèl·lules control (GFP) no l'expressen. Tanmateix, la introducció heteròloga de la isoforma hANT2 humana no produeix canvis compensatoris en l'expressió de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí.

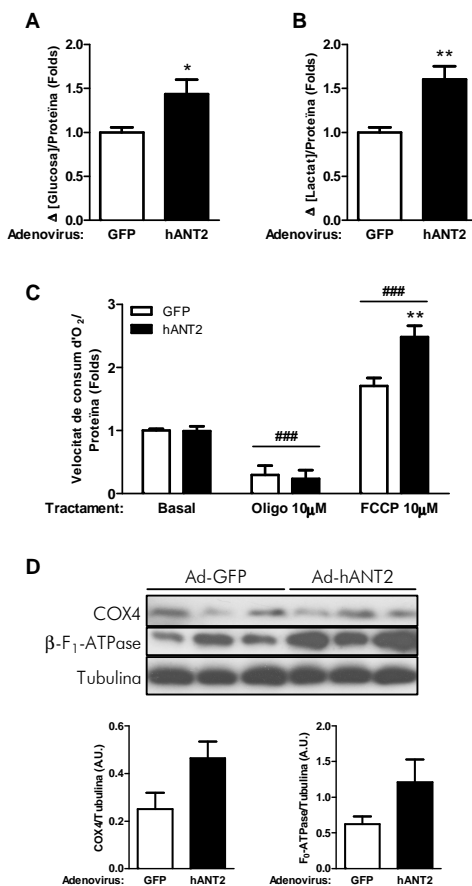


**Figura 64. Caracterització de l'eficiència de la transducció adenovírica de l'hANT2 humana en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.** (A) immunodetecció i quantificació de l'ANT (N19) i VDAC (control de càrrega) en 30 µg d'homogenat total de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb els adenovirus GFP (control) o hANT2 a diferents MOI durant 48 hores; i (B) determinació de l'expressió gènica de les isoformes hANT2 humana i mANT1 i mANT2 de ratolí mitjançant *real-time* PCR en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïdes amb l'adenovirus de GFP (control) o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

Metabòlicament, la sobreexpressió d'hANT2 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> dona lloc a un augment del consum de glucosa (Figura 65A) i en la producció lactat (Figura 65B). En referència a la velocitat de consum d'oxigen, en estat basal (DMSO), la sobreexpressió d'hANT2 no produeix canvis respecte les cèl·lules control (GFP) (Figura 65C). El tractament amb oligomicina redueix per igual el consum d'oxigen (aproximadament 4 vegades), indicant que els mitocondris estan acoblats en ambdós casos. Per últim, el tractament amb FCCP mostra com els miotubs amb sobreexpressió d'hANT2 tenen una capacitat total de consum d'oxigen superior a les cèl·lules GFP. Per tal d'esbrinar si aquest augment en la capacitat respiratòria va associat amb un augment de la maquinària respiratòria, es va analitzar per *western blot* els nivells proteics d'algun dels components del sistema OXPHOS (Figura 65D). La immunodetecció de la COX4 i de la subunitat β de l'F<sub>1</sub>-ATPasa mostra com les cèl·lules transduïdes amb l'adenovirus d'hANT2 tenen uns nivells superiors d'aquestes dues proteïnes en comparació a les transduïdes amb GFP.

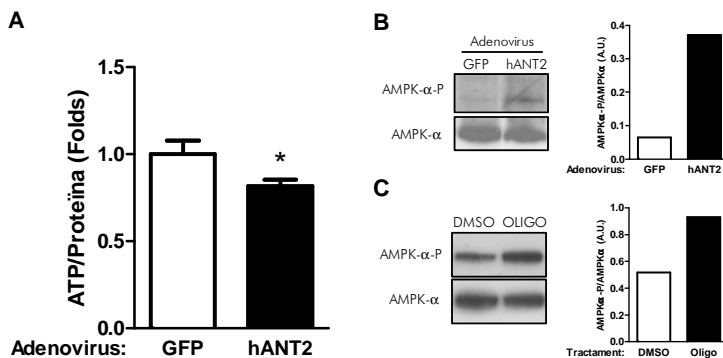
## Resultats

Per tant, la sobreexpressió d'hANT2 en miotubs  $C_2C_{12}$  produeix una inducció del metabolisme glucolític, tot i que aquests mostren una major capacitat total de consum d'oxigen associada a un possible augment de la quantitat de complexos dels sistema OXPHOS.



**Figura 65. Caracterització del perfil metabòlic de miotubs  $C_2C_{12}$  transduïts amb l'adenovirus de l'hANT2 humana.** Quantificació (A) del consum de glucosa; (B) de la producció de lactat i (C) de la velocitat de consum d'oxigen en miotubs  $C_2C_{12}$  transduïts amb l'adenovirus de GFP (control) o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores. (D) Immunodetecció i quantificació de COX4 i  $\beta$ -F<sub>1</sub>-ATPase en 50 µg d'homogenat total de miotubs  $C_2C_{12}$  transduïts amb els adenovirus GFP (control) o hANT2 (MOI 50) durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2 i # per efecte del tractament amb oligomicina o FCCP en la quantificació del consum d'oxigen.

Per tal de saber si el canvi metabòlic produït per la sobreexpressió de l'hANT2 humana en miotubs  $C_2C_{12}$  va acompanyat de canvis en l'estat energètic de la cèl·lula, es va quantificar l'ATP intracel·lular de miotubs transduïts amb GFP o hANT2 durant 48 hores, veient que la sobreexpressió d'hANT2 produeix una baixada en els nivells d'ATP (Figura 66A). En conseqüència, es va analitzar per *western blot* si aquesta disminució del *pool* d'ATP comportava una activació de la AMPK- $\alpha$  (Figura 66B). La immunodetecció de la forma fosforilada, respecte la total, de l'AMPK- $\alpha$  ens mostra que la sobreexpressió d'hANT2 produeix una activació de la via de l'AMPK- $\alpha$ , associada a uns nivells d'ATP més baixos. Per tal de confirmar que en miotubs  $C_2C_{12}$  una disminució en els nivells d'ATP cel·lulars produeix la fosforilació, i activació, de l'AMPK- $\alpha$ , es van incubar miotubs  $C_2C_{12}$  amb DMSO o oligomicina 2.5  $\mu$ M durant 1 hora i es van immunodetectar les formes fosforilades i totals de l'AMPK- $\alpha$  en homogenats totals. La inhibició de l'ATP-sintasa i, per tant, la disminució de l'ATP cel·lular produeix una activació de l'AMPK- $\alpha$ .



**Figura 66.** Quantificació de l'ATP cel·lular i anàlisi per *western blot* de l'activació de l'AMPK- $\alpha$  en miotubs  $C_2C_{12}$  transduïts amb l'adenovirus de l'hANT2 humana. (A) Quantificació de l'ATP intracel·lular de miotubs  $C_2C_{12}$  transduïts amb l'adenovirus de GFP o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores. (B) Immunodetecció i quantificació de l'AMPK- $\alpha$  fosforilada (AMPK- $\alpha$ -P) i total (AMPK- $\alpha$ ) a partir de 30  $\mu$ g d'extracte total de miotubs  $C_2C_{12}$  transduïts amb l'adenovirus de GFP o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores. (C) Immunodetecció i quantificació de l'AMPK- $\alpha$  fosforilada (AMPK- $\alpha$ -P) i total (AMPK- $\alpha$ ) a partir de 30  $\mu$ g d'extracte total de miotubs  $C_2C_{12}$  incubats amb DMSO o oligomicina 2.5  $\mu$ M durant 1 hora. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

## Resultats

Tal i com es va fer amb les cèl·lules HeLa, també ens vam plantejar en miotubs  $C_2C_{12}$  la hipòtesi de si la isoforma hANT2 humana confereix cap avantatge davant una situació d'inhibició del metabolisme oxidatiu. Així, es van transduir durant 48 hores miotubs  $C_2C_{12}$  amb els adenovirus de GFP o hANT2 (MOI 50) i es van incubar durant 30 minuts amb o sense glucosa (10 mM) i/o oligomicina (1 o 2.5  $\mu$ M) abans de quantificar l'ATP cel·lular (Figura 67). La sobreexpressió d'hANT2 en miotubs no produeix canvis en els nivells cel·lulars d'ATP, tot i que anteriorment hem vist que la sobreexpressió d'hANT2 en miotubs produeix una disminució de l'ATP. Una possible explicació a aquestes diferències pot recaure en les condicions experimentals, ja que les concentracions de glucosa són diferents. En aquests cas, una reducció de la concentració de la glucosa a 10 mM pot posar de relleu un cert avantatge energètic gràcies a l'augment de glucòlisi induït per la sobreexpressió d'hANT2. En segon lloc, la manca de glucosa en el medi d'incubació durant 30 minuts no modifica els nivells d'ATP en els miotubs, sense diferències entre GFP i hANT2. Per altra banda, el tractament amb oligomicina durant 30 minuts redueix els nivells d'ATP, sobretot amb l'ús de la concentració de 2.5  $\mu$ M, però no d'una forma dramàtica, indicant que l'activitat glucolítica és la via majoritària en miotubs  $C_2C_{12}$  mantinguts en condicions d'alta concentració de glucosa. La doble combinació de manca de glucosa i d'inhibició de l'ATP-sintasa produeix una important baixada de l'ATP cel·lular, confirmant la dependència de l'activitat mitocondrial per a l'obtenció d'energia en miotubs en absència de glucosa. La presència de la isoforma hANT2 humana en miotubs no els hi atribueix cap resposta diferencial a la manca de glucosa i/o a la inhibició de la cadena respiratòria per oligomicina.

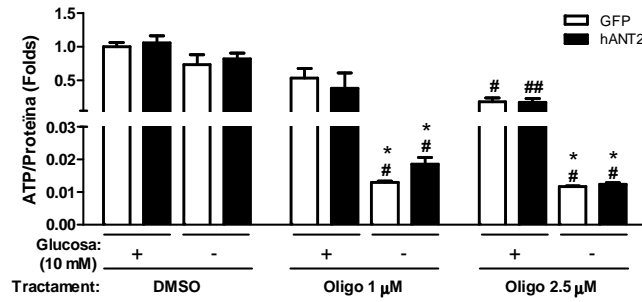
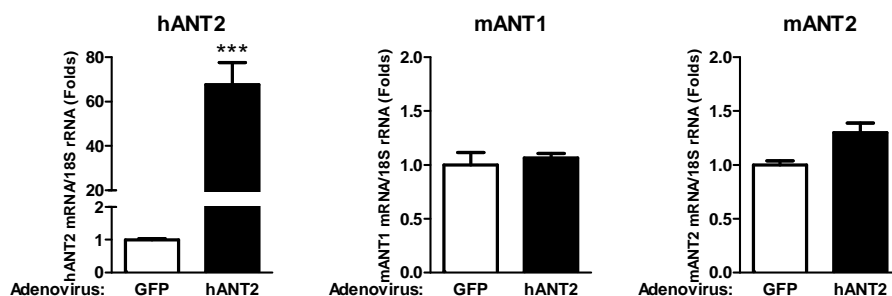


Figura 67. Quantificació de l'ATP cel·lular en miotubs  $C_2C_{12}$  transduïts amb l'adenovirus de l'hANT2 humana i incubats amb o sense glucosa i tractats amb oligomicina. Quantificació de l'ATP intracel·lular de miotubs  $C_2C_{12}$  transduïts amb l'adenovirus de GFP o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores i incubats amb o sense glucosa 10 mM i amb DMSO, oligomicina 1  $\mu$ M o oligomicina 2.5  $\mu$ M durant 30 minuts. \* representa diferències significatives per efecte de la glucosa i # per efecte de l'oligomicina.

### III.4 Sobreexpressió de l'ANT2 humana en adipòcits 3T3-L1.

Finalment, es van estudiar les repercussions metabòliques derivades de la sobreexpressió heteròloga de l'hANT2 humana en adipòcits 3T3-L1. Primer de tot es van quantificar en adipòcits transduïts amb els adenovirus de GFP o hANT2 a un MOI 50 durant 48 hores, els nivells d'mRNA de la isoforma hANT2 humana, per tal de comprovar la seva correcta expressió, i els de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí, per tal d'estudiar possibles regulacions compensatòries en l'expressió dels gens de les isoformes de ratolí (Figura 68). La transducció amb l'adenovirus d'hANT2 en adipòcits 3T3-L1 permet l'expressió del gen sense que es produeixin canvis apreciables en l'expressió de les isoformes de ratolí.



**Figura 68. Caracterització de l'eficiència de la transducció adenovírica de l'hANT2 humana en adipòcits 3T3-L1.** Determinació de l'expressió gènica de la isoforma hANT2 humana i de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí, mitjançant *real-time* PCR en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb els adenovirus GFP (control) o hANT2 (MOI 50) durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

La sobreexpressió d'hANT2 en adipòcits 3T3-L1 té tendència a augmentar el consum de glucosa (Figura 69A) i un clar augment de la producció de lactat (Figura 69B). A més, també es va quantificar la producció de glicerol (Figura 69C) per tal de saber si la sobreexpressió de l'hANT2 humana produeix canvis en l'activitat lipolítica. La sobreexpressió d'hANT2 no modifica de forma destacable la producció de glicerol, pel que la sobreexpressió d'hANT2 induïx el metabolisme glucolític sense increments en la lipòlisi en adipòcits 3T3-L1.

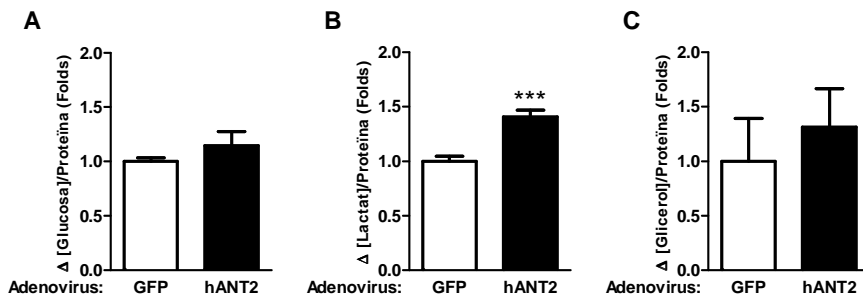


Figura 69. Caracterització del perfil metabòlic d'adipòcits 3T3-L1 transduïts amb l'adenovirus de l'hANT2 humana. Quantificació (A) del consum de glucosa; (B) de la producció de lactat i (C) de la producció de glicerol en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb l'adenovirus de GFP (control) o de l'hANT2 humana (MOI 50) durant 48 hores. \* representa diferències significatives entre GFP i hANT2.

Per tant, englobant tots els resultats obtinguts amb la sobreexpressió de la isoforma hANT2 humana tant en cèl·lules humanes com de ratolí, podem concloure que hANT2 per si sola augmenta el metabolisme glucolític i inhibeix l'oxidatiu, augmenta el creixement cel·lular en cèl·lules en proliferació i confereix protecció davant l'apoptosi.





#### IV. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIONI DE LES ISOFORMES ANT1, ANT2 I ANT3 HUMANES I ANT1 I ANT2 DE RATOLÍ PER PGC-1 $\alpha$

Paral·lelament als estudis presentats en la primera part d'aquest treball, on es descriu la modulació de l'expressió gènica de les diferents isoformes d'ANT en funció de l'estat proliferatiu i del metabolisme glucolític/oxidatiu de diferents línies cel·lulars humanes i de ratolí, en aquest segon bloc es va estudiar si PGC-1 $\alpha$  està implicat en la regulació de l'expressió gènica d'ANT. A més, també es van buscar possibles factors de transcripció que puguin participar en aquest procés.

##### IV.1 Inducció de l'expressió de l'adenina nucleòtid translocasa per PGC-1 $\alpha$

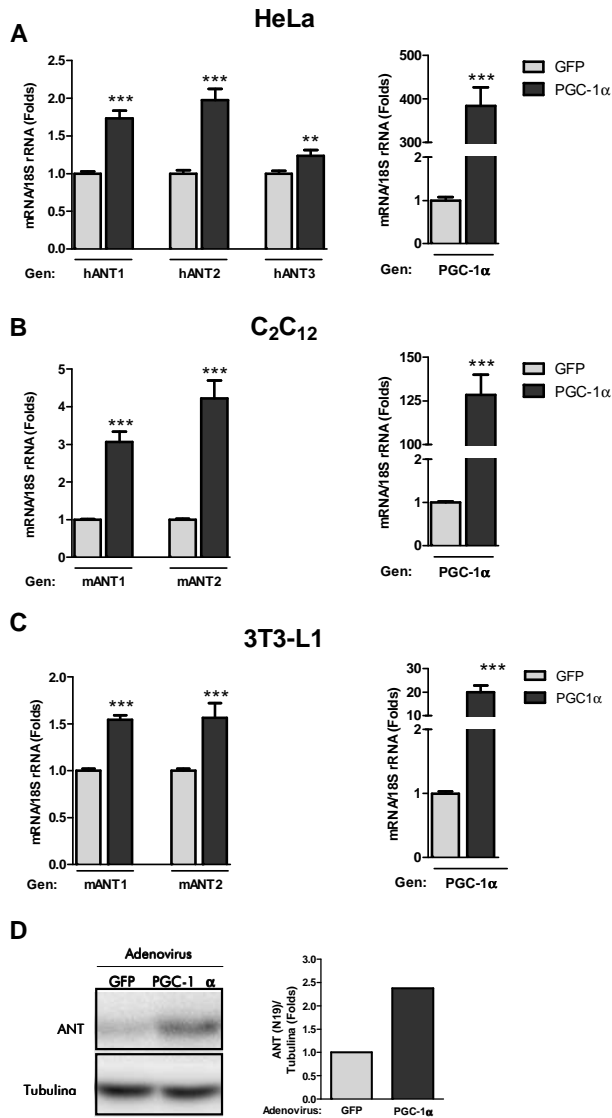
El nostre objectiu de partida en aquest bloc experimental era estudiar si el coactivador transcripcional PGC-1 $\alpha$ , el qual està implicat en el procés de la biogènesi mitocondrial a través de la interacció amb diversos factors de transcripció reguladors de l'expressió gènica de moltes proteïnes mitocondrials (Scarpulla, 2002a), regula també l'expressió de les diverses isoformes d'ANT. Per tal d'obtenir resposta a aquesta hipòtesi, es va sobreexpressar PGC-1 $\alpha$  en cèl·lules HeLa, en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i en adipòcits 3T3-L1.

Es van transduir cèl·lules HeLa amb els adenovirus portadors del vector d'expressió de GFP (control) o de PGC-1 $\alpha$  a un MOI de 100 durant 48 hores i es va quantificar els nivells d'mRNA de les isoformes hANT1, hANT2 i hANT3, així com de PGC-1 $\alpha$  (Figura 70A). La sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  induïx l'expressió d'hANT1, hANT2 i hANT3 en 1.73, 1.97 i 1.25 vegades, respectivament. Com a control de l'eficiència de transducció es va quantificar l'expressió de PGC-1 $\alpha$ , la qual és unes 400 vegades l'expressió endògena.

## Resultats

Per altra banda, també es van transduir miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> amb els adenovirus de GFP o PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) i es van quantificar els nivells d'expressió de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí (Figura 70B). La sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  augmenta l'expressió d'mANT1 en 3.06 vegades l'expressió dels miotubs control (GFP) i en 4.22 la d'mANT2. A més, també es comprova l'eficiència de transducció amb la mesura de PGC-1 $\alpha$ , que arriba a uns nivells 128 vegades superiors als endògens. A més, es va analitzar mitjançant *western blot* que la inducció transcripcional de les isoformes ANT anés en paral·lel amb un augment en els nivells de proteïna (Figura 70D). En aquest sentit, la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  augmenta unes 2.5 vegades els nivells d'ANT respecte el control.

Per últim, també es va seguir el mateix disseny experimental en adipòcits madurs 3T3-L1 (Figura 70C). La sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , comprovada mitjançant la quantificació dels seus nivells transcripcionals, provoca un augment de més d'1.5 vegades en l'expressió d'mANT1 i mANT2 en comparació a les cèl·lules transduïdes amb l'adenovirus de GFP (control).



**Figura 70. Expressió gènica de les isoformes ANT i PGC-1 $\alpha$  en cèl·lules HeLa, miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i adipòcits 3T3-L1 transduïts amb Ad-PGC-1 $\alpha$ .** (A) Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'hANT1, hANT2, hANT3 i PGC-1 $\alpha$  en cèl·lules HeLa ; (B) d'mANT1, mANT2 i PGC-1 $\alpha$  en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> i (C) en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores. (D) Immunodetecció d'ANT (N19) en 40  $\mu$ g d'enriquiment mitocondrial a partir de miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores. Immunodetecció de VDAC i tubulina com a control de càrrega. \* representa diferències significatives per efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

### IV.2 Factors de transcripció involucrats en la inducció gènica d'ANT per PGC-1 $\alpha$

Una vegada descrita la implicació de PGC-1 $\alpha$  en la regulació gènica de les diferents isoformes d'ANT, tant humanes com de ratolí, es va voler aprofundir en el mecanisme molecular responsable. En aquest sentit, es van cercar quins dels factors de transcripció descrits que interaccionen amb PGC-1 $\alpha$  en la regulació transcripcional de proteïnes mitocondrials, especialment les integrants del sistema OXPHOS, també puguin tenir com a diana d'acció els gens de les diferents isoformes d'ANT.

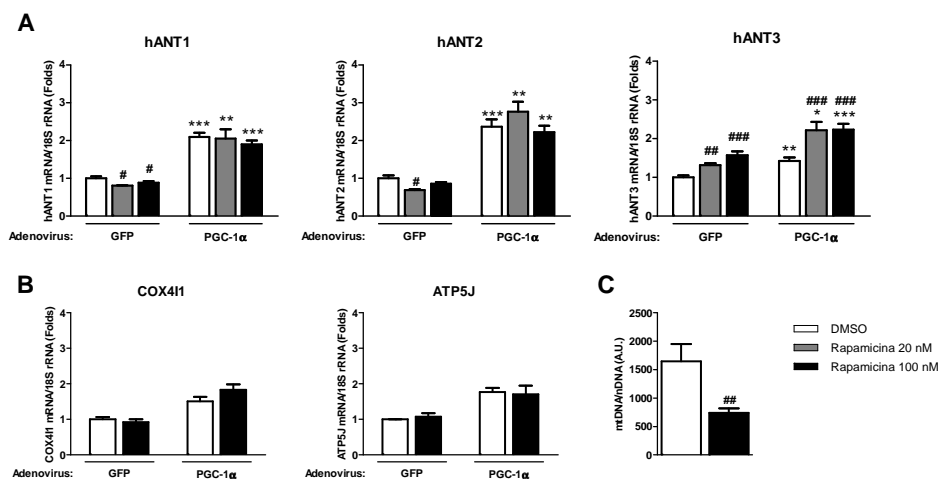
#### IV.2.1 HeLa

El primer sistema regulador de la transcripció de les isoformes d'ANT que hem estudiat en cèl·lules HeLa ha estat el format per mTOR i YY-1. YY-1 s'ha descrit com un factor de transcripció implicat en la regulació de múltiples proteïnes mitocondrials en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Cunningham et al., 2007), on la fosforilació de YY-1 per mTOR permet el reclutament de PGC-1 $\alpha$  a YY-1 sobre el promotor dels seus gens diana (Blattler et al., 2012). Amb l'objectiu d'esbrinar la implicació d'aquest sistema en la regulació de les isoformes d'ANT en cèl·lules HeLa, es va realitzar una transducció amb els adenovirus de GFP (control) i PGC-1 $\alpha$  (MOI 100). A les 24 hores, es van incubar les cèl·lules durant 24 hores més amb DMSO o amb dues concentracions de rapamicina (20 o 100 nM). La rapamicina és un inhibidor d'mTOR i, d'acord amb el model proposat per Cunningham et al., la inhibició de TORC1 no permet el reclutament de PGC-1 $\alpha$  a YY-1 per la manca de fosforilació del factor, no duent-se a terme l'activació transcripcional. El tractament de cèl·lules HeLa transduïdes amb l'Ad-GFP amb rapamicina 20 nM i 100 nM disminueix l'expressió d'hANT1 en un 19% i un 12%, respectivament, i la d'hANT2 en un 31% i un 15% (Figura 71A), tal i com hem vist en el primer bloc de resultats (Figura 19). Emperò, aquests tractaments augmenten l'expressió d'hANT3 un 31% i un 57%. En canvi, quan té lloc una sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , el tractament amb rapamicina no té cap efecte sobre l'expressió de cap de les 3

isoformes, mantenint-se en uns nivells similars als induïts per PGC-1 $\alpha$ . Fins i tot, en el cas d'hANT3, la rapamicina té un efecte potenciador, augmentant un 50% el grau d'inducció dut a terme per PGC-1 $\alpha$ . La quantificació de l'expressió de les proteïnes mitocondrials COX411 i ATP5J (Figura 71B) mostra com el tractament amb rapamicina 100 nM, tal i com passa amb hANT1 i hANT2, no modifica la transcripció gènica d'altres proteïnes mitocondrials.

La mesura del contingut de DNA mitocondrial s'utilitza com a control positiu d'efecte de la rapamicina, la qual disminueix la replicació del DNA mitocondrial (Figura 71C). En el nostre cas, el tractament amb rapamicina 100 nM produeix una disminució a la meitat del contingut de DNA mitocondrial.

Per tant, la regulació de les isoformes d'ANT per PGC-1 $\alpha$  en cèl·lules HeLa no depèn de la participació d'mTOR-YY-1.



**Figura 71. Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i altres proteïnes mitocondrials en cèl·lules HeLa transduïdes amb PGC-1 $\alpha$  i incubades en presència o absència de rapamicina.**

(A) Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'hANT1, hANT2 i hANT3 i (B) de COX411 i ATP5J en cèl·lules HeLa transduïdes amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència, o no, de l'inhibidor de mTOR, rapamicina (20 o 100 nM). (C) Quantificació del DNA mitocondrial en cèl·lules HeLa transduïdes amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència de DMSO o rapamicina 100 nM. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i # per efecte del tractament amb rapamicina.

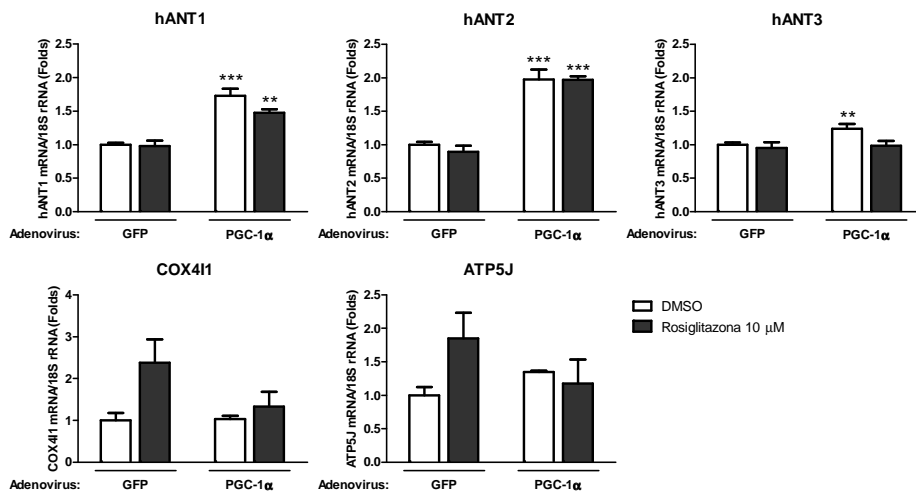
## Resultats

Els *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) són uns receptors nuclears que actuen com a factors de transcripció en la regulació gènica, entre altres, de proteïnes implicades en la funció mitocondrial. En aquest treball també s'ha estudiat la possible participació de diferents membres de la família PPAR en la inducció transcripcional de les isoformes d'ANT per efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

El primer PPAR analitzat ha estat PPAR- $\gamma$ , el qual està involucrat en la regulació transcripcional de la biogènesi mitocondrial en el teixit adipós (Rong et al., 2011). Per a estudiar la possible implicació de PPAR- $\gamma$  en la regulació de les isoformes d'ANT, es van transduir cèl·lules HeLa amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 24 hores i es van incubar durant 24 hores més amb rosiglitazona 10  $\mu$ M, el qual és un lligand agonista de PPAR- $\gamma$  (Figura 72). La incubació de les cèl·lules control (GFP) amb rosiglitazona no modifica l'expressió de cap de les 3 isoformes respecte l'expressió basal. En les cèl·lules transduïdes amb PGC-1 $\alpha$ , el tractament amb rosiglitazona tampoc no produeix cap efecte diferencial en l'expressió d'hANT1 i hANT2 en comparació amb l'obtinguda amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  per si sol. En el cas d'hANT3, el tractament amb rosiglitazona no permet la seva inducció per part de PGC-1 $\alpha$ .

A més, també es va quantificar l'mRNA de dues proteïnes del sistema OXPHOS, la COX411 i l'ATP5J per tal de descriure el comportament d'altres proteïnes mitocondrials per efecte del tractament amb rosiglitazona en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  en cèl·lules HeLa. Així, la incubació de les cèl·lules control (Ad-GFP) amb rosiglitazona sembla augmentar l'expressió d'aquestes dues proteïnes, però en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  es perdria aquest efecte.

En resum, l'augment de l'expressió de les isoformes d'ANT per PGC-1 $\alpha$  és independent de l'activitat de PPAR- $\gamma$ , tot i que aquest sí pugui estar implicat en la regulació d'altres proteïnes mitocondrials.



**Figura 72.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i altres proteïnes mitocondrials en cèl·lules HeLa transduïdes amb PGC-1 $\alpha$  i incubades en presència o absència de rosiglitazona. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'hANT1, hANT2, hANT3, COX411 i ATP5J en cèl·lules HeLa transduïdes amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència, o no, del lligand agonista PPAR- $\gamma$  rosiglitazona 10  $\mu$ M. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

L'altra PPAR analitzat va ser el PPAR- $\alpha$ , el qual participa, entre altres processos, en la regulació transcripcional de proteïnes implicades en l'activitat mitocondrial, concretament en l'oxidació d'àcids grassos (Mandard et al., 2004). Es van transduir cèl·lules HeLa amb els adenovirus de PGC-1 $\alpha$  i/o PPAR- $\alpha$  durant 24 hores i es van incubar en presència de DMSO (control de tractament) o de l'agonista de PPAR- $\alpha$  Wy-14643 10  $\mu$ M durant 24 hores més (Figura 73). En absència del lligand, PPAR- $\alpha$  no té cap efecte sobre la regulació d'hANT1 ni hANT2, però sí exerceix un efecte repressor de l'expressió d'hANT3.

En la situació de sobreexpressió combinada de PGC-1 $\alpha$  i PPAR- $\alpha$ , l'expressió d'hANT1 s'indueix tal i com té lloc amb PGC-1 $\alpha$  sol. En el cas d'hANT2, el grau d'inducció, tot i tenir lloc és inferior a l'aconseguida amb PGC-1 $\alpha$ . En el cas d'hANT3, la sobreexpressió de PPAR- $\alpha$  bloqueja totalment l'efecte



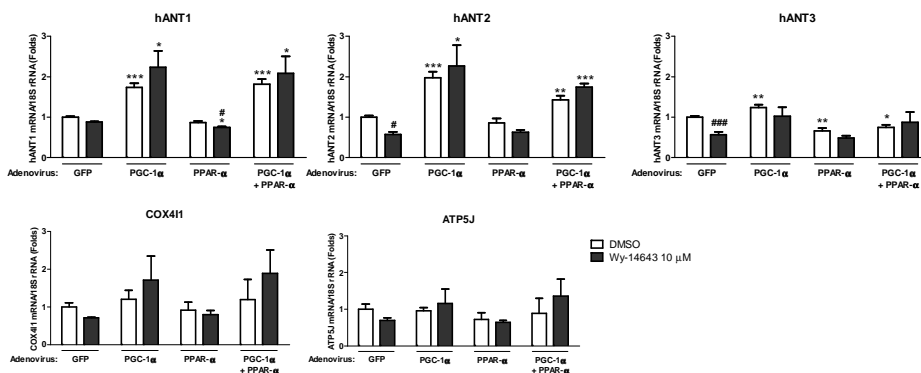
## Resultats

inductor produït per la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , sent fins i tot inferior a l'expressió basal.

La incubació de les cèl·lules control (GFP) amb el lligand Wy-14643 té tendència a disminuir l'expressió d'hANT1 i a reduir l'expressió d'hANT2 i hANT3. El tractament amb Wy-14643 en cèl·lules transduïdes amb PGC-1 $\alpha$  continua permetent la inducció de l'expressió d'hANT1 i hANT2, però sí bloqueja la inducció d'hANT3. La transducció de PPAR- $\alpha$  i la incubació amb el seu agonista Wy-14643 disminueix l'expressió d'hANT1 un 26%, la d'hANT2 un 37% i la d'hANT3 un 52% respecte els controls. La combinació de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i PPAR- $\alpha$  en presència de Wy-14643 no té efectes diferents als observats quan les cèl·lules no s'incuben amb el lligand.

L'anàlisi transcripcional d'altres proteïnes mitocondrials mostra com la COX4I1 i l'ATP5J tenen un comportament similar a les isoformes ANT, tot i que l'efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  d'augmentar la seva expressió no és tant evident. Per altra banda, la presència del lligand Wy-14643 en combinació, o no, de la sobreexpressió de PPAR- $\alpha$ , tampoc no produeix un patró d'expressió diferent a l'observat en les isoformes ANT.

Per tant, PPAR- $\alpha$  no participa de la inducció de les isoformes d'ANT en cèl·lules HeLa per efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ . Fins i tot, sembla que hi pugui estar jugant un paper repressor. A més, la presència de lligand exogen Wy-14643 no modifica els resultats obtinguts amb la sobreexpressió del receptor sol, pel que es podria pensar que les cèl·lules HeLa disposen de lligand endogen suficient per a activar el PPAR- $\alpha$ .

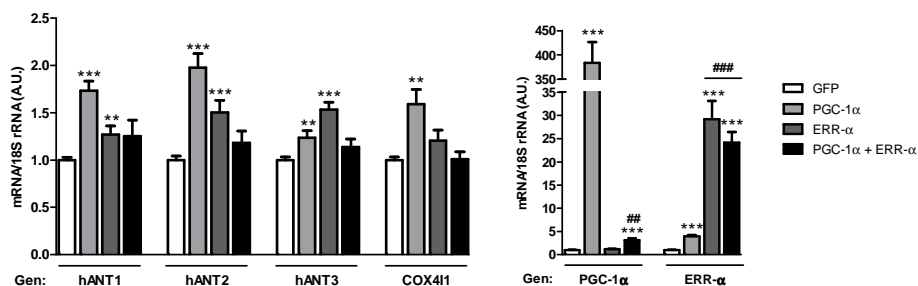


**Figura 73.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i altres proteïnes mitocondrials en cèl·lules HeLa transduïdes amb PGC-1 $\alpha$  i/o PPAR- $\alpha$  i incubades en presència o absència de Wy-14643. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'hANT1, hANT2, hANT3, COX4I1 i ATP5J en cèl·lules HeLa transduïdes amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o PPAR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència, o no, del lligand agonista PPAR- $\alpha$  Wy-14643 10  $\mu$ M. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

L'últim factor de transcripció analitzat en cèl·lules HeLa ha estat l'*Estrogen-related receptor* (ERR- $\alpha$ ). L'ERR- $\alpha$  és un receptor nuclear que pertany a la família de receptors orfes i que s'ha descrit com un regulador transcripcional de la biogènesi mitocondrial i del metabolisme oxidatiu, entre altres processos (Villena and Kralli, 2008). Primerament es van transduir cèl·lules HeLa amb els adenovirus de GFP, PGC-1 $\alpha$  i/o ERR- $\alpha$  a MOI 100 durant 48 hores i es van quantificar els nivells de les isoformes d'ANT, COX4I1, PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  (Figura 74). A part de la inducció de les isoformes d'ANT per part de PGC-1 $\alpha$ , la sobreexpressió d'ERR- $\alpha$  també indueix l'expressió d'hANT1 en 1.27 vegades, d'hANT2 en 1.50x i d'hANT3 en 1.53x. Respecte a l'expressió d'una altra proteïna mitocondrial com és COX4I1, l'efecte d'ERR- $\alpha$  no és tant clar com en el cas de les isoformes d'ANT però també s'observa una tendència a augmentar. Emperò, la doble sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  produeix una pèrdua de l'efecte estimulador de PGC-1 $\alpha$  sobre l'expressió de les isoformes d'ANT o de COX4I1. Analitzant els nivells d'expressió tant de PGC-1 $\alpha$  com d'ERR- $\alpha$ , la cotransducció impedeix la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , i tot i que ERR- $\alpha$  sí se sobreexpressa, en aquesta

## Resultats

situació es perd l'efecte estimulador de PGC-1 $\alpha$  en l'expressió de les isoformes d'ANT.



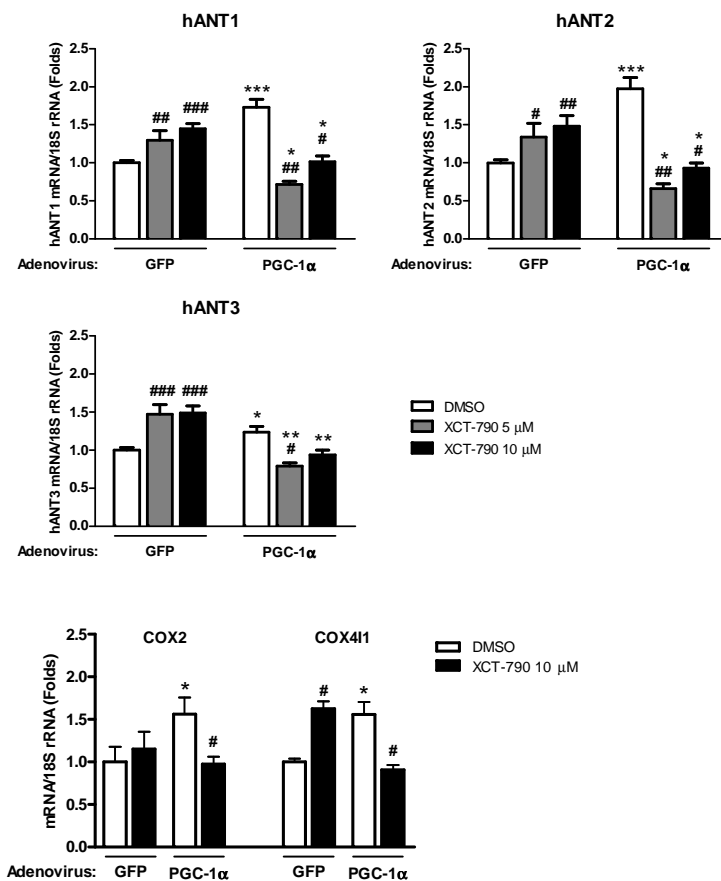
**Figura 74.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT, COX411, PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  en cèl·lules HeLa transduïdes amb PGC-1 $\alpha$  i/o ERR- $\alpha$ . Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'hANT1, hANT2, hANT3, COX411, PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  en cèl·lules HeLa transduïdes amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o ERR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i # entre els grups de sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i els d'ERR- $\alpha$ .

Havent vist que ERR- $\alpha$  està implicat en la regulació gènica de les isoformes d'ANT, una aproximació alternativa a la cotransducció per tal d'estudiar si PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  actuen conjuntament, és la inhibició d'ERR- $\alpha$  mitjançant el lligand antagonista XCT-790 (Busch et al., 2004). Es van transduir cèl·lules HeLa amb els adenovirus de GFP (control) i de PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 24 hores i a continuació es van incubar les cèl·lules en presència de DMSO (vehicle) o d'XCT-790 a 5 o 10  $\mu$ M durant 24 hores més (Figura 75). En la situació control (sense sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ ), el tractament amb qualsevol de les dues concentracions d'XCT-790 produeix un augment de l'expressió d'hANT1, hANT2 i hANT3. En canvi, en la situació on hi ha sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i, per tant, un augment de l'expressió de les isoformes d'ANT, la incubació amb XCT-790 bloqueja aquest efecte inductor, a qualsevol de les dues concentracions utilitzades (5 o 10  $\mu$ M).

La inhibició d'ERR- $\alpha$  per XCT-790 no té cap efecte sobre l'expressió de COX2, però sí augmenta l'expressió de COX411, tal i com ho fa amb les isoformes d'ANT. La inhibició d'ERR- $\alpha$  en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  bloqueja l'efecte inductor de l'expressió de COX2 i COX411 per PGC-1 $\alpha$ .

Per tant, ERR- $\alpha$  sembla tenir un efecte dual en la regulació de l'expressió de les isoformes d'ANT i d'altres proteïnes mitocondrials en cèl·lules HeLa. Per una banda, la inhibició d'ERR- $\alpha$  per XCT-790 augmenta l'expressió de les isoformes d'ANT, indicant una activitat repressora a nivell basal. Però per altra banda, quan se sobreexpressa PGC-1 $\alpha$  i augmenta l'expressió de les isoformes d'ANT, ERR- $\alpha$  sí participa d'aquesta regulació, ja que si s'inhibeix, es perd l'efecte inductor de PGC-1 $\alpha$ .

## Resultats



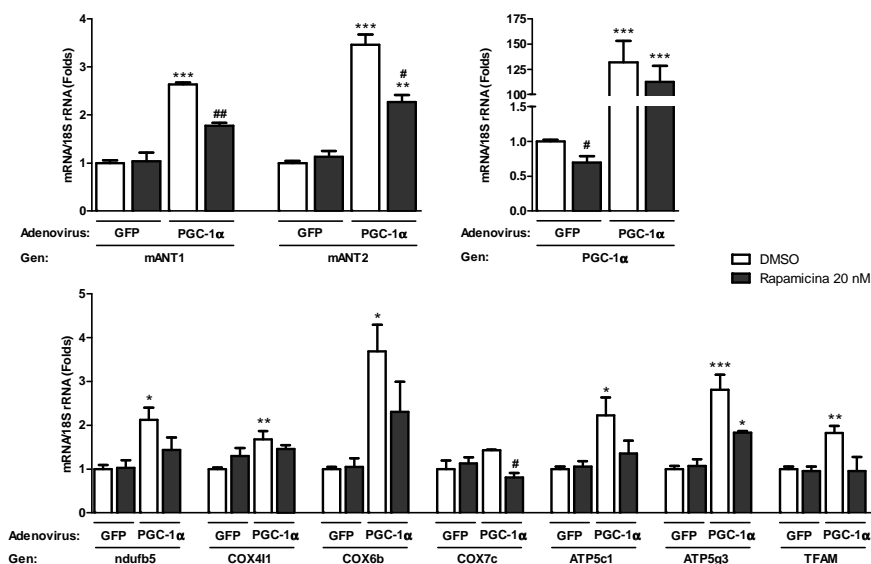
**Figura 75.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i altres proteïnes mitocondrials en cèl·lules HeLa transduïdes amb PGC-1α i incubades en presència o absència d'XCT-790. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'hANT1, hANT2, hANT3, COX2 i COX41 en cèl·lules HeLa transduïdes amb Ad-GFP i/o Ad-PGC-1α (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència de DMSO o del lligand antagonista ERR-α XCT-790 (5 o 10 μM). \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1α i # per efecte del tractament amb XCT-790.

## IV.2.2 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>

De la mateixa manera que s'ha procedit amb les cèl·lules HeLa, es va procedir a analitzar els possibles factors de transcripció implicats en la regulació de l'expressió de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

Primerament, es va estudiar si el sistema mTOR-YY-1-PGC-1 $\alpha$ , el qual està implicat en la regulació de l'expressió de moltes proteïnes mitocondrials en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Cunningham et al., 2007), també regula l'expressió de les isoformes d'ANT en aquestes mateixes cèl·lules. Es van transduir miotubs amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores en presència de DMSO o rapamicina 20 nM durant les últimes 24 hores (Figura 76). La inhibició d'mTOR per efecte de la rapamicina en miotubs transduïts amb GFP (control) no repercuteix en la regulació d'mANT1 i mANT2. Emperò, el tractament amb rapamicina dels miotubs transduïts amb PGC-1 $\alpha$  bloqueja parcialment, però de manera significativa l'efecte inductor de PGC-1 $\alpha$ , reduint la seva expressió en un 30%. Analitzant els nivells d'expressió de PGC-1 $\alpha$ , podem observar com el tractament amb la rapamicina no afecta la seva sobreexpressió, pel que l'efecte bloquejant de la rapamicina no es degut a una pèrdua dels nivells de PGC-1 $\alpha$ . Quantificant l'expressió d'altres proteïnes mitocondrials, es pot observar tant l'efecte inductor del PGC-1 $\alpha$  com l'efecte bloquejant de la rapamicina sobre aquesta inducció, tal i com passa amb les isoformes d'ANT. Per tant, el sistema mTOR-YY-1-PGC-1 $\alpha$  també regula l'expressió d'mANT1 i mANT2 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, tal i com fa amb altres proteïnes mitocondrials.

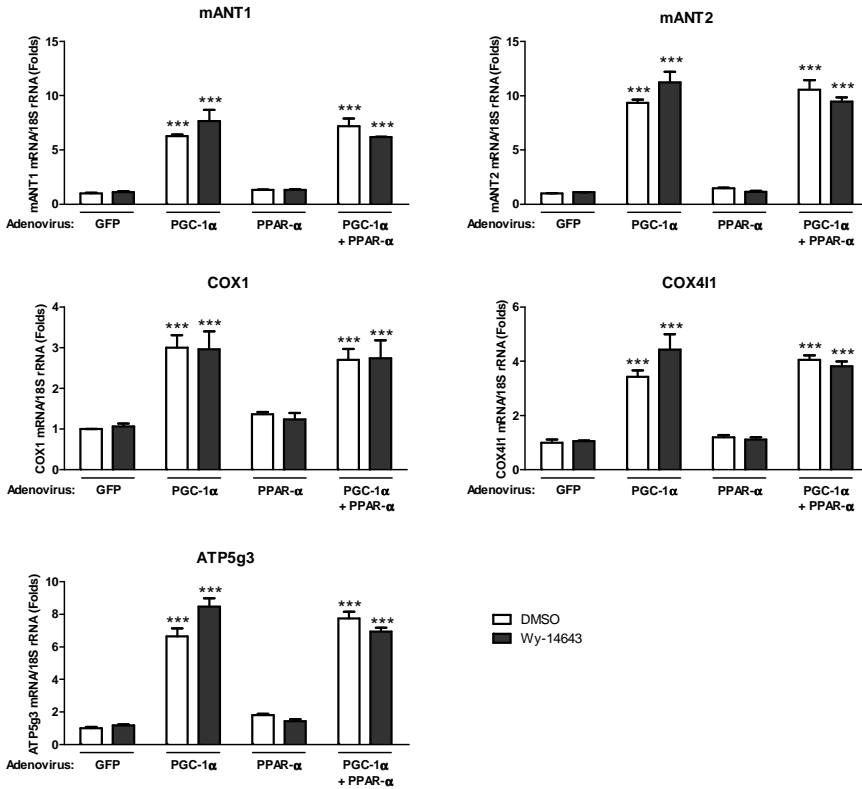
## Resultats



**Figura 76.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT, PGC-1 $\alpha$  i diverses proteïnes mitocondrials en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i incubades en presència de DMSO o rapamicina. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1 i mANT2; de PGC-1 $\alpha$  i de ndufb5, COX411, COX6b, COX7c, ATP5c1, ATP5g3 i TFAM en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència de DMSO (vehicle) o de l'inhibidor d'mTOR rapamicina 20 nM. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i # per efecte del tractament amb rapamicina.

A part del sistema mTOR-YY-1, també es van estudiar la implicació d'altres factors de transcripció en la regulació de l'expressió de les isoformes d'ANT en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en combinació amb PGC-1 $\alpha$ , com poden ser els PPAR. Es van transduir miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> amb els adenovirus de GFP o PGC-1 $\alpha$ , en combinació amb PPAR- $\alpha$  durant 24 hores, i amb presència de DMSO o del seu lligand agonista Wy-14643 10  $\mu$ M durant 24 hores més (Figura 77). La presència del lligand Wy-14643 no produeix cap efecte sobre l'expressió de cap de les isoformes d'ANT. La sobreexpressió de PPAR- $\alpha$ , amb o sense lligand Wy-14643, tampoc té cap efecte. La sobreexpressió conjunta de PGC-1 $\alpha$  i PPAR- $\alpha$  continua produint la inducció de l'expressió de les isoformes d'ANT, tal i com ho fa PGC-

1 $\alpha$ . En el cas de la regulació de l'expressió de les proteïnes mitocondrials COX1, COX411 i ATP5g3, l'efecte de PPAR- $\alpha$  és similar al que té lloc en mANT1 o mANT2. Per tant, PPAR- $\alpha$  no sembla estar implicat en la regulació de les isoformes d'ANT, com tampoc en les altres proteïnes mitocondrials estudiades.



**Figura 77.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i diverses proteïnes mitocondrials en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i/o PPAR- $\alpha$  i incubades en presència o absència de Wy-14643. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1 i mANT2; i de COX1, COX411 i ATP5g3 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o PPAR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència de DMSO o del lligand agonista PPAR- $\alpha$  Wy-14643 10  $\mu$ M. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

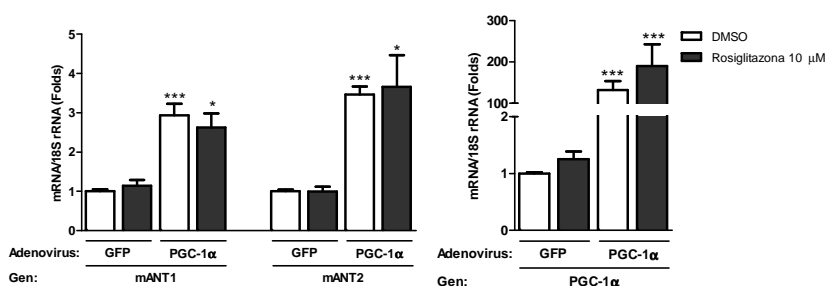
Havent descartat PPAR- $\alpha$  com a regulador de l'expressió de les isoformes d'ANT en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, vam estudiar el possible paper de PPAR- $\gamma$ . Es van transduir miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  a un MOI 100 durant 24



## Resultats

hores, i a continuació es van incubar durant 24 hores més en presència de DMSO (vehicle) o del lligand agonista PPAR- $\gamma$  rosiglitazona 10  $\mu$ M (Figura 78). Mitjançant *real-time PCR* es va determinar l'expressió gènica de les dues isoformes d'ANT i de PGC-1 $\alpha$  (control de transducció). El tractament amb rosiglitazona dels miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb GFP no té cap efecte sobre l'expressió d'mANT1 o mANT2 i, en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , el seu efecte inductor no és diferent al que ja s'aconsegueix amb PGC-1 $\alpha$  per si sol.

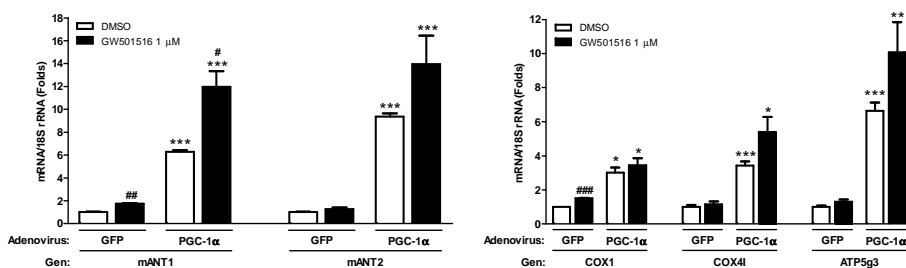
Així, PPAR- $\gamma$ , com PPAR- $\alpha$ , no participa en l'augment de l'expressió d'mANT1 i mANT2 per efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.



**Figura 78.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i PGC-1 $\alpha$  en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i incubades en presència o absència de rosiglitazona. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1, mANT2 i PGC-1 $\alpha$  en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència, o no, del lligand agonista PPAR- $\gamma$  rosiglitazona 10  $\mu$ M. \* representa diferències significatives per efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

Per últim, es va explorar el paper de PPAR- $\delta$ , al qual se l'hi ha atribuït la propietat de regular la biogènesi mitocondrial a través de PGC-1 $\alpha$  en cèl·lules musculars (Hondares et al., 2007). Després de transduir els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 24 hores, es va incubar amb DMSO (vehicle) o el lligand agonista de PPAR- $\delta$  GW501516 1  $\mu$ M durant 24 hores més i es va determinar l'expressió gènica d'mANT1 i mANT2 per *real-time PCR* (Figura 79). El tractament amb GW501516 produeix un lleuger augment de l'expressió d'mANT1. La combinació de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  amb el lligand induïx

clarament la transcripció d'mANT1 i mANT2 a uns nivells superiors als assolits amb PGC-1 $\alpha$ . La incubació amb GW501516 activa l'expressió de COX1, però en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  no té lloc cap efecte sumatori. En canvi, GW501516 no augmenta l'expressió de COX4I1 o ATP5g3 per si sol, però en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  sí s'observa una tendència a augmentar l'expressió d'aquestes dues proteïnes mitocondrials amb més potència que PGC- $\alpha$  per si sol, tal i com passa amb mANT2. Així, l'activació de PPAR- $\delta$  induïx l'expressió de les dues isoformes d'ANT en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, sent més sensible la regulació d'mANT1, i potencia l'efecte inductor de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

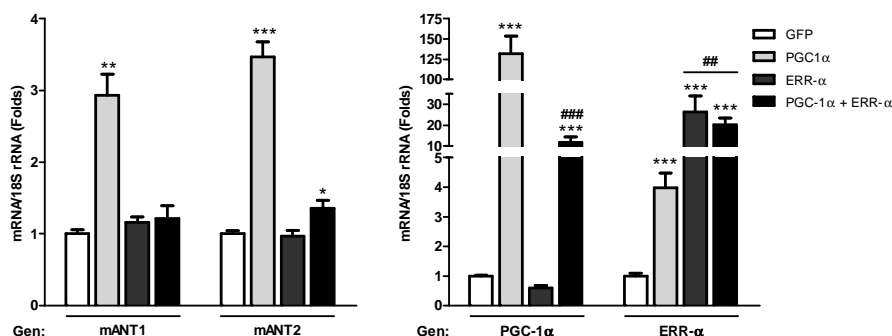


**Figura 79. Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i diverses proteïnes mitocondrials en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i incubades en presència de DMSO o GW501516.** Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1 i mANT2; i de COX1, COX4I1 i ATP5g3 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència de DMSO o del lligand agonista PPAR- $\delta$  GW501516 1  $\mu$ M. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i # per efecte de GW501516.

Finalment, també es va analitzar el paper d'ERR- $\alpha$  en la regulació de les isoformes d'ANT. En primer lloc es van transduir miotubs amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o ERR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores (Figura 80). A nivell transcripcional, amb la sobreexpressió d'ERR- $\alpha$  no té lloc cap efecte inductor de l'expressió d'mANT1 o mANT2. A més, tal i com passa amb les cèl·lules HeLa, la doble transducció anul·la pràcticament l'augment transcripcional de les isoformes d'ANT adquirit per efecte de PGC-1 $\alpha$ . Com a conseqüència d'aquest resultat, es van analitzar els nivells d'expressió de PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  com a controls de transducció,

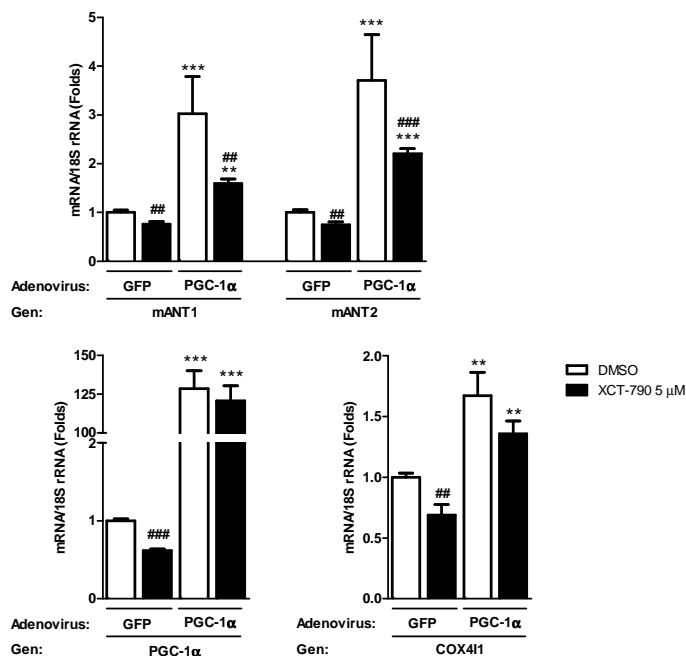
## Resultats

veient que la cotransducció genera un artefacte experimental que no permet la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  als nivells que s'obtenen amb la transducció sola d'aquest, perdent-se el seu efecte inductor.



**Figura 80.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i/o ERR- $\alpha$ . Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1, mANT2, PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o ERR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores. \* representa diferències significatives per efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i # entre els grups de sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i els d'ERR- $\alpha$ .

D'acord amb aquests resultats, no es podia deduir si ERR- $\alpha$  estava implicat en la regulació de les isoformes d'ANT, pel que es va optar per una estratègia alternativa, que va consistir en la utilització de l'antagonista XCT-790. Es van transduir miotubs amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 24 hores i es van incubar amb DMSO o XCT-790 a una concentració de 5  $\mu$ M durant 24 hores més (Figura 81). La inhibició de l'ERR- $\alpha$  endogen per efecte de l'XCT-790 produeix una disminució de l'expressió basal d'mANT1 i mANT2 i, quan el tractament té lloc en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , el seu efecte inductor sobre les isoformes d'ANT disminueix notablement, sense que es vegin afectats els nivells de sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ . Respecte a la proteïna mitocondrial analitzada, COX411 té una regulació de l'expressió similar a qualsevol de les dues isoformes d'ANT, ja que la inhibició d'ERR- $\alpha$  per XCT-790 disminueix l'expressió quan les cèl·lules són transduïdes amb GFP i té tendència a bloquejar l'efecte inductor produït per la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

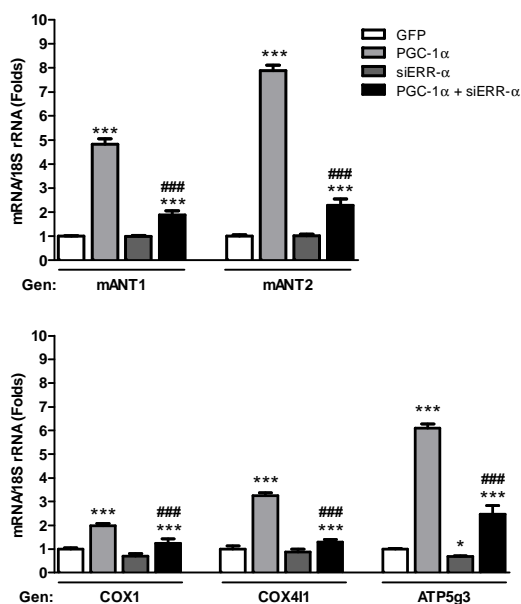


**Figura 81.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT, PGC-1 $\alpha$  i COX411 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i incubades en presència de DMSO o d'XCT-790. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1, mANT2, PGC-1 $\alpha$  i COX411 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència de DMSO o del lligand antagonista ERR- $\alpha$  XCT-790 5  $\mu$ M. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i # per efecte del tractament amb XCT-790.

Per tal de reafirmar aquesta implicació d'ERR- $\alpha$  en la regulació d'mANT1 i mANT2 mitjançant PGC-1 $\alpha$ , es van transduir miotubs amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o Ad-siERR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores (Figura 82). La transducció dels miotubs amb l'adenovirus portador del vector d'expressió de l'RNA d'interferència d'ERR- $\alpha$  no té cap efecte sobre l'expressió basal de les isoformes d'ANT, però en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , la manca d'ERR- $\alpha$  suprimeix en gran part l'efecte d'inducció. L'anàlisi de les proteïnes mitocondrials COX1, COX411 i ATP5g3 mostra un perfil d'expressió similar al de les isoformes d'ANT.

## Resultats

Per tant, ERR- $\alpha$ , tal i com passa amb la regulació de les isoformes hANT1, hANT2 i hANT3 humanes en les cèl·lules HeLa, també participa en la regulació de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí en els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> per part de PGC-1 $\alpha$ .



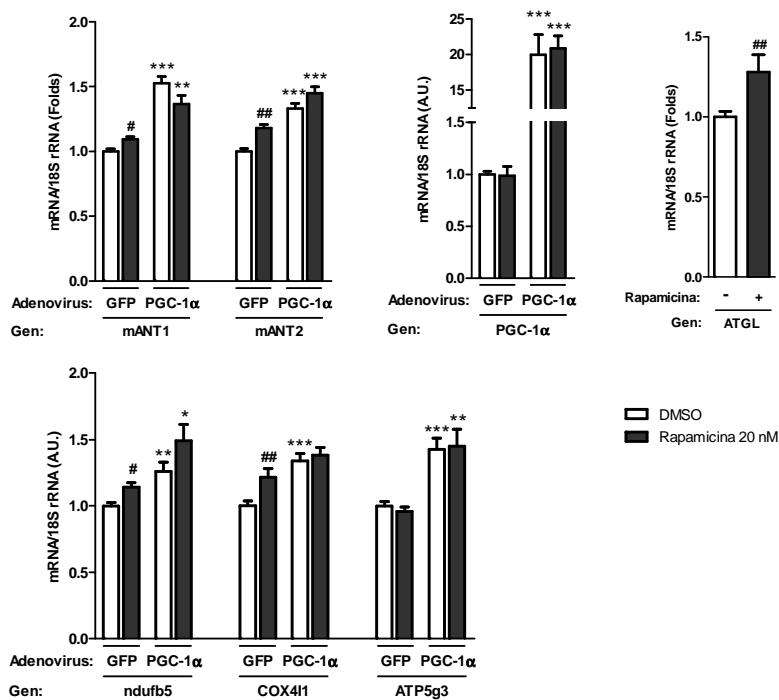
**Figura 82.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i diverses proteïnes mitocondrials en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i/o siERR- $\alpha$ . Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1 i mANT2; i de COX1, COX411 i ATP5g3 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> transduïts amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o siERR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de l'adenovirus i # entre PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\alpha$  + ERR- $\alpha$ .

### IV.2.3 3T3-L1

A part dels miotubs  $C_2C_{12}$ , també es va estudiar la regulació de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí en adipòcits 3T3-L1. Seguint el mateix plantejament utilitzat en les cèl·lules HeLa i miotubs  $C_2C_{12}$ , es analitzar la implicació de diferents factors de transcripció en situació de sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ .

En primer lloc es va comprovar la validesa del model mTOR-YY-1-PGC-1 $\alpha$  en aquest tipus cel·lular mitjançant la transducció d'adipòcits 3T3-L1 amb els adenovirus de GFP (control de transducció) o de PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, en presència de DMSO o rapamicina a una concentració de 20 nM durant les últimes 24 hores (Figura 83). La inhibició d'mTOR per part de la rapamicina en les cèl·lules control (GFP) produeix un petit augment en l'expressió d'mANT1 i mANT2, tal i com passa amb altres proteïnes mitocondrials com ndufb5 o COX4I1. Per tal de comprovar que la rapamicina exerceix el seu efecte inhibidor, es va determinar l'expressió gènica de l'ATGL, gen silenciada per mTOR (Chakrabarti et al., 2010). Tal i com està descrit, la inhibició d'mTOR per part de la rapamicina induïx l'expressió d'ATGL. A més, també es va controlar si el tractament amb rapamicina modula la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ . Així, podem veure que els efectes d'inducció de les isoformes d'ANT via rapamicina no són deguts a un augment en l'expressió del PGC-1 $\alpha$  endogen. En la situació de sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , la inhibició d'mTOR tampoc limita l'efecte inductor de PGC-1 $\alpha$ , pel que es dedueix que l'eix mTOR-YY-1-PGC-1 $\alpha$  no està implicat en la regulació d'mANT1 i mANT2 (i les altres proteïnes mitocondrials estudiades) en els adipòcits 3T3-L1, a diferència del que passa en els miotubs  $C_2C_{12}$ .

## Resultats



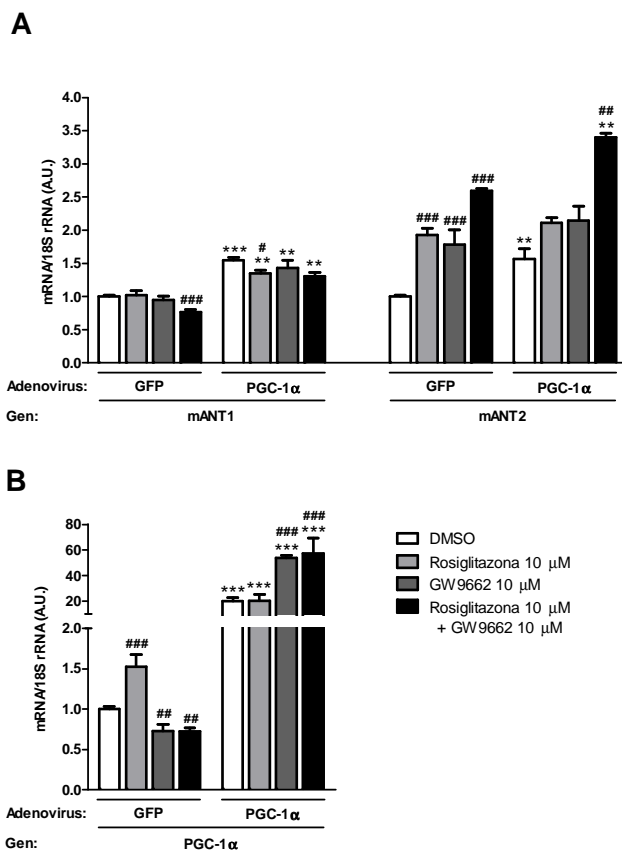
**Figura 83.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT, PGC-1 $\alpha$ , ATGL i diverses proteïnes mitocondrials en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i incubades en presència de DMSO o rapamicina. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1 i mANT2; de PGC-1 $\alpha$ ; ATGL i de ndufb5, COX4I1 i ATP5g3 en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència de DMSO (vehicle) o de l'inhibidor d'mTOR rapamicina 20 nM. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i # per efecte del tractament amb rapamicina.

Per altra banda es va estudiar el paper de PPAR- $\gamma$  en la regulació de les isoformes d'ANT per PGC-1 $\alpha$ . Es van transduir adipòcits 3T3-L1 amb els adenovirus de GFP o PGC-1 $\alpha$  durant 24 hores i es van incubar amb DMSO, rosiglitazona 10  $\mu$ M (l·ligand agonista PPAR- $\gamma$ ) i/o GW9662 10  $\mu$ M (l·ligand antagonista PPAR- $\gamma$ ) durant 24 hores més i es va quantificar l'expressió gènica per *real-time PCR* l'expressió d'mANT1 i mANT2 (Figura 84A). El tractament amb rosiglitazona en les cèl·lules control (GFP), el qual no té cap efecte sobre l'expressió d'mANT1, augmenta de forma clara l'expressió d'mANT2. L'antagonista GW9662 tampoc produeix cap efecte en l'expressió d'mANT1, però augmenta l'expressió d'mANT2. Així mateix, el doble tractament amb rosiglitazona i GW9662 també augmenta l'expressió d'mANT2.

En la situació de sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , el tractament amb rosiglitazona continua sense tenir cap efecte en sobre mANT1, però sí que indueix mANT2, tot i que al mateix nivell que ho fa la rosiglitazona per si sola. Per tant, l'efecte de la rosiglitazona no es suma a l'efecte de PGC-1 $\alpha$ . A més, l'ús de l'antagonista GW9662 no modifica l'efecte inductor de PGC-1 $\alpha$ . La quantificació de l'expressió de PGC-1 $\alpha$  (Figura 84B), al tractar-se d'un gen diana de PPAR- $\gamma$ , ens permet assegurar que tant l'agonista rosiglitazona com l'antagonista GW9662 actuen a través de PPAR- $\gamma$  en la seva regulació, ja que la rosiglitazona indueix l'expressió de PGC-1 $\alpha$  mentre que el GW9662 bloqueja aquest efecte. Tanmateix, l'efecte inductor de GW9662 sobre l'expressió específica d'mANT2 (i no sobre mANT1 o PGC-1 $\alpha$ ) ens fa pensar que aquest antagonista pot tenir un efecte regulador d'mANT2 independent de PPAR- $\gamma$ .

Per tant, PGC-1 $\alpha$  i PPAR- $\gamma$  sembla que no formarien part d'un mateix complex regulador de la transcripció gènica d'mANT1 o mANT2, tot i que per separat sí augmenten l'expressió d'mANT2 en adipòcits 3T3-L1.

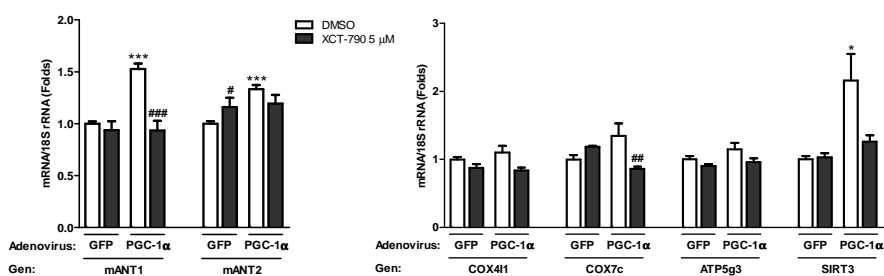




**Figura 84.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT, PGC-1α i controls d'efecte dels tractaments en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb PGC-1α i incubats amb rosiglitazona i/o insulina. (A) Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* mANT1 i mANT2; i (B) de PGC-1α en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1α (MOI 100) durant 48 hores i incubades amb rosiglitazona 10 μM i/o GW9662 10 μM durant les últimes 24 hores. \* representa diferències significatives per efecte de PGC-1α i # per efecte del tractament.

Finalment es va estudiar si ERR-α, tal i com passa amb les cèl·lules HeLa humanes com en els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de ratolí, també està implicat en la regulació de les isoformes d'ANT en adipòcits 3T3-L1. Primer de tot, es van transduir adipòcits 3T3-L1 amb Ad-GFP o Ad-PGC-1α (MOI 100) durant 24 hores i a continuació es van incubar amb DMSO o l'inhibidor d'ERR-α, XCT-790 5 μM durant 24 hores més (Figura 85). El tractament amb XCT-790 de les cèl·lules

control (GFP) no produeix cap efecte en l'expressió d'mANT1, però sí és capaç de bloquejar l'augment d'expressió mitjançat per la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ . XCT-790 augmenta l'expressió d'mANT2 en les cèl·lules control. La combinació d'XCT-790 amb la transducció de l'adenovirus de PGC-1 $\alpha$ , tot i produir una lleugera disminució respecte els nivells d'mRNA produïts per la sobreexpressió, aquesta no és significativa. Analitzant l'expressió gènica d'altres proteïnes mitocondrials, es pot observar com l'XCT-790 no té efectes sobre l'expressió basal de COX411, COX7c, ATP5g3 i SIRT3, però sí presenta un petit efecte en el bloqueig de la inducció mitjançada per PGC-1 $\alpha$ , sobretot en el cas de COX7c i SIRT3.

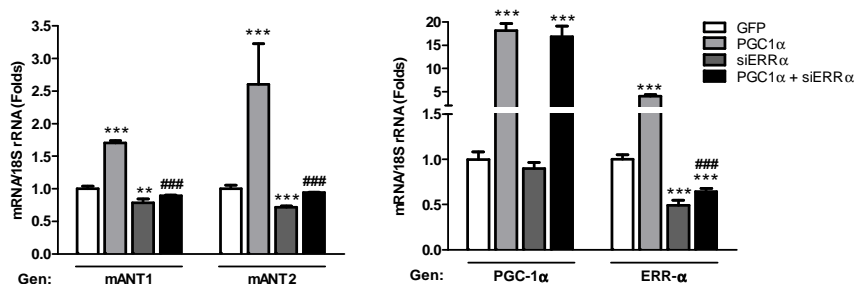


**Figura 85.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i diverses proteïnes mitocondrials en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i incubades en presència de DMSO o d'XCT-790. Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1, mANT2, COX411, COX7c, ATP5g3 i SIRT3 en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb Ad-GFP o Ad-PGC-1 $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores, les últimes 24 hores de les quals en presència de DMSO o del lligand antagonista ERR- $\alpha$  XCT-790 5  $\mu$ M. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  i # per efecte del tractament amb XCT-790.

Degut a què els resultats obtinguts amb l'ús de l'inhibidor XCT-790 no són concloents pel que fa a la implicació d'ERR- $\alpha$  en la regulació d'mANT2, tot i que amb mANT1 sí, es van transduir adipòcits 3T3-L1 amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o Ad-siERR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores (Figura 86). La transducció dels adipòcits amb l'adenovirus siERR- $\alpha$  produeix una disminució de l'expressió d'mANT1 i mANT2 i, en combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , l'RNA d'interferència d'ERR- $\alpha$  produeix el bloqueig total de la inducció de la transcripció de les dues

## Resultats

isoformes d'ANT. Aquest bloqueig de l'efecte de PGC-1 $\alpha$  per part del silenciament d'ERR- $\alpha$  té lloc sense alterar els nivells de sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ . A més, també podem comprovar com siERR- $\alpha$  disminueix la transcripció d'ERR- $\alpha$  (control de l'eficiència de la interferència).



**Figura 86.** Perfil d'expressió gènica de les isoformes d'ANT i controls de transducció en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb PGC-1 $\alpha$  i/o siERR- $\alpha$ . Determinació de l'expressió gènica mitjançant *real-time PCR* d'mANT1, mANT2, PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  en adipòcits 3T3-L1 transduïts amb Ad-GFP, Ad-PGC-1 $\alpha$  i/o siERR- $\alpha$  (MOI 100) durant 48 hores. \* representa diferències significatives per efecte la sobreexpressió de l'adenovirus i # entre PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\alpha$  + ERR- $\alpha$ .

En vista d'aquests resultats, podem concloure que en els adipòcits 3T3-L1, el receptor nuclear ERR- $\alpha$  participa de la inducció transcripcional d'mANT1 i mANT2 per part de PGC-1 $\alpha$ .





DISCUSSIÓ



## DISCUSSIÓ

L'interès per l'adenina nucleòtid translocasa (ANT) arrenca en la dècada del 1950, quan es va descriure que els mitocondris contenien elevades quantitats de nucleòtids d'adenina amb diferents nivells de fosforilació (Siekevitz and POTTER, 1955) i ja en la dècada del 1960, quan es va acceptar que la membrana mitocondrial interna constituïa una barrera osmòtica (Brierley and Green, 1965), es va iniciar una línia de recerca amb l'objectiu de descriure el mecanisme pel qual es pogués explicar la distribució compartimentada dins la cèl·lula dels diferents *pools* de nucleòtids. Així, una vegada es van trobar evidències de l'existència d'un transport específic de nucleòtids a través de la membrana mitocondrial interna relacionat amb l'activitat OXPHOS, a finals dels anys 60 es va identificar el transportador responsable, l'ANT (Pfaff et al., 1965; Duee and Vignais, 1965). Així, la funció que se li va atribuir en un inici a l'ANT era la de realitzar el bescanvi a través de la membrana mitocondrial interna entre l'ADP citosòlic i l'ATP mitocondrial, producte final de la fosforilació oxidativa. Tanmateix, al llarg de les 5 dècades d'estudi, s'ha vist que ANT presenta altres activitats a part del propi bescanvi, les quals també són d'una elevada importància per al correcte funcionament del mitocondri i, en extensió, de la cèl·lula i teixit. Aquesta diversitat de funcions s'han anat descrivint després de constatar l'existència de diverses isoformes, fins a quatre en el cas dels humans, cada una de les quals presenta unes característiques pròpies, com poden ser la seva regulació transcripcional, la seva distribució tissular o, com ja hem dit, les seves activitats (Brenner et al., 2011). Així, per exemple, el nostre grup ha descrit que la sobreexpressió d'hANT1 i hANT3 indueix apoptosi en cèl·lules en cultiu, mentre que la sobreexpressió d'hANT2 no produeix aquest efecte (Zamora et al., 2004a; Zamora et al., 2004b).

Aquest treball es va iniciar amb l'objectiu d'aprofundir més en el coneixement al voltant de les funcions diferencials de les isoformes ANT dins el context del metabolisme energètic i la proliferació cel·lular, així com la regulació de la seva expressió gènica. Per a fer-ho, es va optar per estudiar, primerament la



## Discussió

relació entre l'estat de proliferació o diferenciació de diferents línies cel·lulars, tant humanes com de ratolí, i el patró d'expressió de les isoformes ANT. A continuació, amb l'objectiu de discernir possibles funcions diferencials entre les isoformes humanes, s'han analitzat les conseqüències en el metabolisme energètic, la proliferació i l'apoptosi cel·lular derivades de canvis en l'expressió de l'hANT2 o l'hANT3 humanes i de l'mANT1 i l'mANT2 de ratolí mitjançant el seu silenciament o sobreexpressió. Per últim, s'ha realitzat una aproximació a la regulació de l'expressió gènica dels ANTs per part de PGC-1 $\alpha$  i els possibles factors de transcripció associats.

## ESTUDI DELS CANVIS EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES ISOFORMES DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA DEPENDENTS DEL METABOLISME I DE L'ESTAT DE PROLIFERACIÓ EN LÍNIES CEL·LULARS HUMANES I DE RATOLÍ.

El clonatge de les 4 isoformes humanes d'ANT i els corresponents estudis d'expressió van permetre descriure la seva distribució tissular. Així, hANT1 és la isoforma majoritària en múscul cardíac i esquelètic, i en cervell; hANT2 s'expressa en cèl·lules amb elevada taxa de proliferació, com teixits en desenvolupament o tumors; hANT3 és d'expressió ubiqua i hANT4 es localitza principalment en testicles (Stepien et al., 1992; Dolce et al., 2005).

Una de les principals característiques de les cèl·lules tumorals és el tipus de metabolisme que adopten. La relació entre l'estat proliferatiu d'una cèl·lula i el seu metabolisme ha estat estudiat durant moltes dècades des que Otto Warburg observà que l'elevada taxa proliferativa de les cèl·lules canceroses va associada a un metabolisme marcadament glucolític, amb un elevat consum de glucosa i de producció de lactat, tot i la disponibilitat d'oxigen (Warburg, 1956b). Aquest tipus de metabolisme obliga a les cèl·lules a ser grans consumidores de glucosa, ja que el rendiment energètic mitjançant glucòlisi (2 ATP/glucosa) és molt inferior al que s'obté per fosforilació oxidativa (36 ATP/glucosa) (Greiner et al., 1994). A més, les cèl·lules amb ràpida divisió també són grans consumidores de glutamina, la qual

és imprescindible, juntament amb la glucosa, per a assegurar el continu subministrament de molècules intermediàries (esquelets de carboni) necessàries per al manteniment de l'alta activitat de les rutes de biosíntesi de macromolècules. Per exemple, la utilització de la glucosa per via glucolítica permet el funcionament de la via de les pentoses fosfat, la qual genera una elevada quantitat de poder reductor en forma de NADPH i de ribosa-P, imprescindibles per a la síntesi de lípids i àcids nucleics (DeBerardinis et al., 2008; DeBerardinis and Thompson, 2012).

Els mecanismes que regulen el tipus de metabolisme requerit d'acord amb l'estat proliferatiu d'una cèl·lula i com la cèl·lula obté aquests nutrients en funció de les seves necessitats, encara són objecte de constant estudi i disten d'estar caracteritzats al 100%, tot i que s'han fet grans avenços. Per exemple, s'han establert les bases moleculars que determinen l'ús diferencial de la glucosa i de la glutamina al llarg del cicle cel·lular, fenòmens clau per a garantir la divisió cel·lular. Concretament, l'activació de la glucòlisi i de la glutaminòlisi durant la divisió cel·lular està regulada per ubiquitina-lligases, les quals controlen l'activitat d'enzims clau d'aquestes vies (Colombo et al., 2011). Per tant, l'acció de proteïnes reguladores del cicle cel·lular regula, de forma diferencial, l'activitat dels mecanismes encaminats a satisfer les demandes metabòliques específiques de les cèl·lules en funció de la fase del cicle cel·lular en què es troben (Colombo et al., 2011; Moncada et al., 2012).

Coneixedors d'aquesta associació entre el tipus de metabolisme i l'estat de proliferació d'una cèl·lula, en primer lloc ens vam plantejar estudiar si el patró d'expressió de les diferents isoformes humanes d'ANT depèn d'aquests factors. La isoforma hANT2 es va clonar originalment en fibroblasts humans com un gen de resposta primerenca (*early response gene*), pel que des d'un inici se l'ha associat amb la proliferació cel·lular en fibroblasts humans (Battini et al., 1987). A més, l'estudi del seu promotor i la identificació dels elements de resposta involucrats en la regulació de la transcripció d'hANT2 en funció de l'estat proliferatiu (Barath et al., 1999b), van confirmar aquesta relació entre proliferació cel·lular i expressió

## Discussió

d'hANT2 en cèl·lules capaces d'aturar el seu creixement, és a dir, en cèl·lules que conservaven la dependència per factors de creixement, com els fibroblasts NIH3T3 o les cèl·lules d'origen mieloide HL-60 (Battini et al., 1987; Barath et al., 1999b; Luciakova et al., 2003), els fibroblasts provinents de teixit pulmonar embrionari WI-38 (Giraud et al., 1998), les cèl·lules epitelials CAKI 1 (Giraud et al., 1998).

Tenint en compte aquesta associació entre proliferació i glucòlisi, i entre proliferació i hANT2, es podria associar hANT2 al metabolisme glucolític, a pesar de què la seva activitat intrínseca de bescanvi de nucleòtids d'adenina semblaria estar més lligada al metabolisme oxidatiu que al glucolític. D'una manera interessant, els nostres experiments demostren que, tot i que sí existeix una estreta relació entre l'expressió de les isoformes d'ANT i el metabolisme d'una cèl·lula en funció del seu estat de proliferació, el patró d'expressió de les isoformes d'ANT depèn del tipus cel·lular. Així, en cèl·lules que no aturen el seu creixement, com HeLa o HepG<sub>2</sub>, és l'expressió d'hANT3 la que es regula per proliferació, i no hANT2 (Figures 14 i 21). En aquestes cèl·lules, l'aturada de la proliferació suposa efectivament un augment de l'oxidació i també una inducció de l'expressió d'hANT3, que és la isoforma que a priori s'associa a aquest tipus de metabolisme (Figures 13 i 20). En canvi, en cèl·lules SGBS, una aturada de la proliferació sí va associada a una disminució de l'expressió d'hANT2 (Figura 22), el que encaixa amb el paper d'hANT2 com a marcador de proliferació en cèl·lules on la seva proliferació depèn totalment de la presència de factors de creixement i de la inhibició per contacte (*growth-arrest*). Per tant, sembla ser que no només hANT2 es regula per proliferació, sinó que també ho pot fer hANT3 depenent de si la cèl·lula és sensible als senyals d'aturada del creixement.

Aquesta idea es veu reforçada amb els resultats que hem obtingut mitjançant diferents experiments en els que hem controlat la proliferació per tal d'estudiar la regulació de les isoformes d'ANT. Primerament, en cèl·lules HeLa incubades amb medi deplecionat de sèrum on, tot i existir una disminució del creixement cel·lular, aquest no s'atura totalment (Figura 17), és l'expressió

d'hANT3 la que és regulada a l'alça, i no la d'hANT2 que es reguli a la baixa (Figura 18).

En segon lloc, l'ús de rapamicina com a inhibidor d'mTOR i, per tant, de la via de senyalització iniciada per molts factors de creixement (Pallet et al., 2005), també confirma el fet que la supressió dels estímuls proliferatius en cèl·lules HeLa va associat a un increment de l'expressió d'hANT3 i no a una disminució d'hANT2 (Figura 19). Per tant, hANT3, considerada com a isoforma ubiqua no sotmesa a regulació, sí es regula per proliferació en aquestes cèl·lules.

Finalment, els resultats obtinguts amb la incubació de cèl·lules HeLa amb medi deplecionat de glucosa també apunten a que és hANT3 la isoforma regulada. Davant la manca de glucosa, les cèl·lules depenen de la glutamina com a substrat energètic, obligant a les cèl·lules a obtenir l'energia a partir del metabolisme oxidatiu (Weber et al., 2002) i a aturar el seu creixement (DeBerardinis et al., 2008). En el nostres estudis també podem observar aquesta adaptació de les cèl·lules, tal i com mostra l'augment de la capacitat oxidativa i la disminució de la producció de lactat (Figura 15). A més, i a diferència de la depleció de sèrum, la manca de glucosa sí que condiciona dràsticament la capacitat de les cèl·lules HeLa per a proliferar. En aquesta situació, on es força a les cèl·lules a dependre energèticament de l'oxidació i a entrar en un estat de quiescència, té lloc un augment de l'expressió d'hANT3 (Figura 16).

Tot aquest conjunt d'observacions ens han permès definir un índex que permet associar el patró d'expressió de les isoformes d'ANT amb el tipus de metabolisme present en la cèl·lula d'acord amb el seu estat de proliferació. Aquest índex, que hem anomenat *quocient glucolític* relaciona els nivells d'mRNA d'hANT2, que com hem vist, és la isoforma pròpia de cèl·lules en proliferació i, per tant, majoritàriament glucolítiques, amb la suma dels nivells d'mRNA d'hANT1 i hANT3, que són les isoformes principals dels teixits oxidatius. Així, una cèl·lula proliferant presenta un quocient glucolític superior a les cèl·lules que tenen aturada la seva divisió, i viceversa (Figures 14, 16, 18, 19, 21, 22). Amb tot,

## Discussió

degut a l'estreta relació entre el metabolisme glucolític i la proliferació, aquest índex que hem denominat com a quocient glucolític també podria ser interpretat com a quocient proliferatiu.

El fet que, depenent del tipus cel·lular, sigui l'expressió d'hANT2 o d'hANT3 la que es reguli, no resta valor a la importància del quocient glucolític, ja que la seva relació amb la proliferació/quiescència i amb el metabolisme glucolític/oxidatiu es manté amb independència de quina sigui la isoforma regulada. Per tant, el sentit fisiològic resultant de la regulació d'una o altra isoforma és comú en tots els casos, ja que l'aturada de la proliferació i el corresponent canvi metabòlic cap a un augment de l'oxidació van associats a una disminució del quocient glucolític, indistintament sí ve determinat per una disminució dels nivells d'mRNA d'hANT2 o un augment dels d'hANT3.

Fins ara, la isoforma que s'ha estudiat en més profunditat, a nivell de la seva regulació transcripcional, és la d'hANT2. El promotor d'hANT2 conté diferents elements de resposta encarregats de regular la seva expressió. Així, s'ha descrit que el promotor d'hANT2 conté 3 caixes de reconeixement d'elements Sp1 responsables de l'activació (caixes A i B) o inhibició de l'expressió (caixa C) (Li et al., 1996a; Luciakova et al., 2000; Zaid et al., 2001), l'activitat dels quals depèn alhora de l'estat d'acetilació de la cromatina (Hodny et al., 2000) i d'altres factors, com l'AP-2, que actuarà com un intensificador de l'activació de la transcripció per Sp1 (Li et al., 1999). Però sens dubte, la identificació de Go-1 i Go-2 com dues regions essencials per al silenciament (Barath et al., 1999a) ha estat clau per a comprendre la regulació de l'expressió d'hANT2 en funció de la proliferació. Aquestes caixes són llocs d'unió del factor NF-1, amb participació de proteïnes Smad el qual s'hi uneix quan les cèl·lules es troben en estat de quiescència, reprimint l'expressió gènica d'hANT2 en aquestes condicions (Luciakova et al., 2003; Barath et al., 2004; Luciakova et al., 2008). A més, la identificació de l'element GRBOX (*glycolysis regulated box*) (Giraud et al., 1998) com a inhibidor de l'expressió d'hANT2 en teixits madurs oxidatius, ha permès

establir el model de regulació de l'expressió d'hANT2 en funció de la proliferació i del metabolisme.

En canvi, els estudis al voltant de la regulació de l'expressió d'hANT3 han estat molt escassos, ja que sempre s'ha considerat que aquesta isoforma s'expressa de forma ubiqua, ja que el seu promotor només presenta elements Sp1 (Cozens et al., 1989) i manca de caixes CCAAT i TATA. No obstant, en vista dels nostres resultats, podem proposar que l'expressió d'hANT3 sembla estar més regulada del que s'havia descrit fins ara, i que la proliferació, tal i com passa amb hANT2, també juga un important paper en la seva regulació.

Sembla evident, doncs, que l'existència d'una regulació diferencial de l'expressió de les isoformes d'ANT en funció del tipus de metabolisme li ha de suposar a la cèl·lula algun avantatge adaptatiu i és una base important per a hipotetitzar sobre l'existència de funcions diferents entre elles.

Paral·lelament també s'ha estudiat la relació entre l'expressió de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí amb el metabolisme i l'estat de proliferació i diferenciació en diverses línies cel·lulars. La distribució tissular de l'mANT1 de ratolí és similar a la dels humans, trobant-se només en teixits altament oxidatius com cor i múscul esquelètic, mentre que la isoforma mANT2 té una distribució pràcticament ubiqua, a excepció del múscul (Levy et al., 2000; Rodic et al., 2005). Així, es va analitzar el perfil d'expressió d'mANT1 i mANT2 d'acord amb l'estat de proliferació i/o diferenciació i del tipus de metabolisme energètic present en cèl·lules HIB-1B, 3T3-L1 i C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

mANT2, tot i la seva distribució ubiqua en ratolins, en cèl·lules HIB-1B es comporta d'una manera similar a un gen marcador de proliferació, com l'hANT2 humana (Battini et al., 1987), ja que la seva expressió disminueix amb una aturada de la proliferació d'aquestes cèl·lules (Figura 23).

## Discussió

En cèl·lules 3T3-L1 es pot observar com, tot i que la isoforma mANT2 disminueix la seva expressió per efecte de l'aturada en la proliferació dels preadipòcits, la seva expressió torna a augmentar d'acord amb el procés de diferenciació (Figura 25), situació en què es produeix una clara inducció del metabolisme oxidatiu (Figura 24). Per tant, en cèl·lules 3T3-L1, mANT2 té un doble patró d'expressió: el que correspon a la seva condició de marcador de proliferació en fibroblasts i el de ser la isoforma pròpia de cèl·lules diferenciades i oxidatives no musculars. En ratolins, doncs, la isoforma mANT2 realitzaria les diferents funcions que les isoformes hANT2 i hANT3 fan en humans. Una altra dada que reforça la idea de què mANT2 és la isoforma associada a la maduració adipocitària en cèl·lules 3T3-L1, és la comprovació que hem fet sobre el tractament amb factors adipogènics, com la insulina (Spiegelman et al., 1993) i/o l'agonista de PPAR-g, rosiglitazona (Tontonoz et al., 1994). Tal i com hem vist, aquests dos factors indueixen clarament l'expressió d'mANT2, fins i tot en adipòcits madurs, on el procés de diferenciació teòricament ja està completat (Figura 26). En canvi, aquests factors adipogènics no regulen de forma tant evident l'expressió d'ANT1 (Figura 84).

En mioblasts  $C_2C_{12}$ , l'expressió d'mANT2 disminueix a mida que les cèl·lules aturen el seu creixement en augmentar la densitat cel·lular (confluència) i s'inicia el procés de diferenciació, ja que aquestes cèl·lules també es regulen per proliferació. En el nostre cas, l'expressió d'mANT1 també disminueix amb la diferenciació, tot i que no en el mateix grau que ho fa mANT2 (Figura 29). Stepien i col·laboradors (1992) van observar que el procés de diferenciació d'una línia de cèl·lules musculars en cultiu s'associa a un lleuger increment d'mANT1, tot i que aquesta inducció dista molt de la que es produeix en teixit muscular *in vivo*. En el nostre cas, no hem pogut observar l'increment d'mANT1, l'expressió del qual és molt baixa, fins i tot en cultius primaris de cèl·lules musculars diferenciades *in vitro* (Lunardi et al., 1992), tot i que l'expressió de diferents marcadors de diferenciació, com la miogenina, o de proteïnes mitocondrials confirmen un complet estat de diferenciació dels miotubs (Figura 29). A més, tot i que la diferenciació de les cèl·lules  $C_2C_{12}$  va associat a un augment del metabolisme oxidatiu, tal i com

demostra la disminució del consum de glucosa i producció de lactat (Figura 27), aquestes cèl·lules presenten un metabolisme glucolític superior al que s'esperaria pel fet de ser cèl·lules musculars, ja que els nivells d'ATP en aquestes cèl·lules, en presència de glucosa, és molt insensible a l'efecte inhibidor de l'OXPHOS per part de l'oligomicina (Figura 67). Per tant, els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en cultiu, amb alta disponibilitat de glucosa, presenten un metabolisme poc dependent de l'oxidació, el que lliga amb el petit increment en el consum d'oxigen dels miotubs respecte els mioblasts (Figura 28), tot i l'enriquiment de la maquinària mitocondrial, el que podria suggerir que la manca d'inducció transcripcional d'mANT1 sigui limitant en aquest cas.

Per tant, en ratolins, mANT2 és la isoforma lligada a la proliferació en cèl·lules sensibles a l'aturada del seu creixement i és regulada en funció d'aquesta, com veiem en els fibroblasts HIB-1B, els adipòcits 3T3-L1 i els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. A més, en les línies cel·lulars no musculars i que, per tant, no tenen mANT1 com a isoforma pròpia del teixit madur oxidatiu, mANT2 també és la isoforma responsable de l'activitat translocasa en les cèl·lules quiescents, com en el cas dels adipòcits 3T3-L1.

## EFFECTES DEL SILENCIAMENT GÈNIC MITJANÇANT shRNA DE LES ISOFORMES DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA HUMANES I DE RATOLÍ.

Després d'observar la connexió entre l'aturada de la proliferació i el canvi metabòlic que dirigeix les cèl·lules a augmentar el metabolisme oxidatiu en detriment del glucolític, i que aquest fenotip correlaciona amb una disminució del quocient glucolític, es va plantejar l'objectiu de veure si els canvis d'expressió de les isoformes d'ANT són capaços per si sols de canviar el metabolisme i la proliferació de les cèl·lules. Així, es va realitzar el silenciament mitjançant shRNA de les isoformes hANT2 i hANT3 humanes en cèl·lules HeLa i de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí en cèl·lules HIB-1B.



## Discussió

Primerament, podem observar com el silenciament d'hANT2, amb la consegüent disminució del quocient glucolític, en cèl·lules HeLa és capaç per ell mateix de fer les cèl·lules més oxidatives, ja que produeix una disminució en la producció de lactat i un augment de la capacitat per a oxidar glucosa (Figura 32). A més, el silenciament d'hANT2 també produeix una disminució de l'expressió de GLUT1, transportador íntimament relacionat amb el metabolisme glucolític en cèl·lules tumorals (Furuta et al., 2010), ja que la seva activitat és imprescindible per a satisfer l'elevada demanda de glucosa en aquestes cèl·lules. L'increment de la capacitat oxidativa produïda pel silenciament d'hANT2 també queda demostrada per l'augment en la capacitat per a oxidar àcids grassos (Figura 32D) i per l'augment en el consum d'oxigen (Figura 32E).

Malgrat la relació que existeix entre hANT2 i proliferació, no hem observat que el silenciament d'hANT2 afecti al creixement cel·lular. La transfecció transitòria dels shRNA requereix que les cèl·lules es trobin a una elevada confluència en el cultiu, circumstància que fa que les cèl·lules hagin disminuït significativament la seva capacitat proliferativa, com s'observa al comparar les velocitats de creixement entre les cèl·lules HeLa transfectades amb els shRNA (Figura 31) i la de les cèl·lules HeLa en la situació d'un cultiu normal (Figura 15), les quals proliferen a una velocitat 5 vegades superior. Aquesta restricció proliferativa podria explicar el fet de què no observem efectes del silenciament d'hANT2 sobre la capacitat de creixement de les cèl·lules HeLa, ja que aquestes ja tindrien el seu creixement prou disminuït.

En canvi, tot i que el silenciament d'hANT3 no produeix grans canvis a nivell glucolític, sí és responsable d'una baixada dels nivells d'ATP intracel·lular (Figura 33). Aquesta sensibilitat de les cèl·lules a la manca d'hANT3 no deixa de ser sorprenent ja que les cèl·lules HeLa, com a cèl·lules tumorals que són, es caracteritzen per una activitat oxidativa molt baixa a favor de la glucòlisi i semblaria que no haguessin de ser dependents d'ANT3. Emperò, aquesta disminució de l'activitat mitocondrial es tradueix en la disminució dels nivells d'ATP i en la fosforilació de l'AMPK- $\alpha$  (Figura 33), que alhora podria determinar la taxa

de proliferació cel·lular a través d'mTOR (Hardie, 2011). És conegut que la proliferació requereix d'una elevada activitat de vies anabòliques, les quals són grans consumidores d'ATP (Moncada et al., 2012). Per tant, una de les principals conseqüències de la disminució dels nivells d'ATP i de l'activació de l'AMPK- $\alpha$  és la repressió de les vies de síntesi de macromolècules (Hardie and Carling, 1997) i de la proliferació (Luo et al., 2010), el que lliga amb els nostres resultats de baixada de la proliferació (Figura 31). Així, les cèl·lules HeLa, tot i ser cèl·lules tumorals altament glucolítiques, en una situació de baixa proliferació necessiten d'una certa activitat OXPHOS, pel que la manca d'hANT3, que és la isoforma associada a l'oxidació, pot condicionar el funcionament mitocondrial.

El silenciament d'hANT3, tal i com passa amb el d'hANT2, també produeix un augment en l'oxidació d'àcids grassos, tot i que el mecanisme a través del qual ho fa ha de ser diferent. Una possible explicació és que el silenciament d'hANT3 suposa l'activació de l'AMPK- $\alpha$  i aquesta iniciaria una sèrie de respostes encaminades a augmentar l'oxidació dels àcids grassos (Jeon et al., 2012). A més, aquesta activació de l'AMPK- $\alpha$  també podria explicar la inducció de l'expressió de la PDK4, la qual actuaria disminuint l'oxidació de la glucosa a favor de la dels àcids grassos (Houten et al., 2009). Concretament, l'activació de la via de l'AMPK- $\alpha$  condueix a la inhibició de les acetil-CoA carboxilases 1 i 2 (ACC1-2), disminuint la biosíntesi d'àcids grassos i, al mateix temps, s'indueix l'activitat de la carnitina-palmitoil-transferasa 1 (Cpt1), augmentant el flux de la  $\beta$ -oxidació (Abu-Elheiga et al., 2001). Aquest augment en l'oxidació d'àcids grassos també va acompanyat d'un augment en la velocitat de consum d'oxigen (Figura 32E), associació que ja ha estat descrita, per exemple, en miotubs silenciats per SIRT4, on es produeix un augment de la fosforilació de l'AMPK- $\alpha$ , de l'oxidació dels àcids grassos i del consum d'oxigen (Nasrin et al., 2010). Tanmateix, en el nostre cas, aquest augment de l'oxidació no va associat a una disminució de la producció de lactat, tot i que aquest fenomen podria ser una conseqüència de la inducció de la PDK4.

## Discussió

Per altra banda, també es van estudiar les repercussions metabòliques derivades del silenciament de les isoformes de ratolí mANT1 i mANT2 en cèl·lules HIB-1B. El silenciament d'mANT2 produeix un augment del metabolisme glucolític, com demostra l'augment en el consum de glucosa, la producció de lactat, la inducció de l'hexoquinasa II i la disminució de la capacitat oxidativa (Figura 38). A més a més, el silenciament d'mANT2 també suposa una baixada de l'ATP cel·lular (Figura 40) i una disminució del creixement cel·lular, possiblement produïda per una inducció de l'apoptosi (Figura 37), indicant un possible paper protector d'aquesta isoforma davant l'apoptosi. Aquest canvi metabòlic produït per la pèrdua d'mANT2 és contradictori amb el paper de marcador de proliferació que li hem atribuït a aquesta isoforma d'acord amb els resultats que es desprenen del primer bloc de resultats on observem que una aturada de la proliferació va acompanyat d'una baixada de l'expressió d'mANT2.

No obstant, hem de tenir en compte que, degut als requisits experimentals, aquestes cèl·lules es troben a una alta confluència, pel que és probable que aquestes cèl·lules passin a dependre del metabolisme més oxidatiu. A més, podem pensar que les cèl·lules HIB-1B, com a cèl·lules d'origen no muscular o cerebral, són altament dependents d'mANT2, ja que a diferència de les cèl·lules humanes, no disposen d'una altra isoforma amb la que es pugui repartir activitats diferencials. Per tant, la pèrdua d'mANT2 en cèl·lules HIB-1B suposa una pèrdua d'activitat translocasa que suposa una disminució del metabolisme oxidatiu. En canvi, el silenciament d'mANT1, isoforma que a priori hauria de ser poc important en l'activitat mitocondrial d'aquestes cèl·lules, no comporta grans repercussions metabòliques, només un petit augment de la capacitat oxidativa de la glucosa, que no va acompanyat de canvis en els nivells de producció de lactat (Figura 38).

A part dels canvis a nivell metabòlic i proliferatiu, un dels resultats més clars obtinguts en el present treball ha estat que el silenciament de l'hANT3 humana o de l'mANT2 de ratolí suposa una inducció de la transcripció de diverses citoquines, com són TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1 (Figures 35 i 41). Tot i que els estudis amb medis condicionats amb cèl·lules HeLa no són concloents (Figura 50), els

medis provinents de cèl·lules HIB-1B silenciades per mANT2 són capaços d'estimular en cèl·lules HIB-1B incubades amb aquests medis, una resposta inflamatòria, tal i com es veu amb els estudis d'activitat de promotor (Figura 51A) com a nivell transcripcional (Figura 51B), fins i tot, en altres línies cel·lulars com macròfags Raw 264.7 o adipòcits 3T3-L1 (Figura 52). Aquestes dades indiquen, doncs, que la inducció transcripcional va acompanyada de la síntesi i alliberament en el medi d'aquestes citoquines. El fet de què, malgrat el bloqueig del TNF- $\alpha$  en el medi mitjançant l'ús d'anticossos anti-TNF- $\alpha$  es continuï obtenint una inducció de la resposta inflamatòria en les cèl·lules incubades, fa pensar que la quantitat de TNF- $\alpha$  en el medi és molt baixa i que l'activació de la resposta inflamatòria és produïda per la participació de varies citoquines. A més, tot i que la inducció transcripcional té lloc en les tres citoquines analitzades (TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1), només la IL-6 i MCP-1 assoleixen els nivells suficients per a ser detectats (Figura 53), reforçant aquesta idea de què la resposta inflamatòria està vehiculada per un conjunt de citoquines.

Una de les possibles vies d'activació de la resposta inflamatòria és un augment en la producció de ROS deguda a una disfunció de l'activitat mitocondrial (Cillero-Pastor et al., 2008; Vaamonde-Garcia et al., 2012). En el nostre cas, l'augment en la transcripció de citoquines per efecte del silenciament de l'hANT3 humana o de l'mANT2 de ratolí, no és degut a un increment de la producció de ROS, ja que els seus nivells són fins i tot més baixos (Figures 34D i 39A) i l'ús de l'antioxidant N-acetilcisteïna no evita que tingui lloc la producció de citoquines (Figures 47 i 48). Aquestes dades, doncs, permeten descartar la producció de ROS com a inductor de la resposta inflamatòria, mecanisme que sí té lloc, per exemple, en una situació d'infecció, on es produeixen alteracions en el metabolisme mitocondrial que acaben generant ROS i una activació de la resposta inflamatòria (Tschopp, 2011).

Emperò, no es pot descartar que la inducció de la resposta inflamatòria sigui conseqüència d'un mal funcionament del sistema OXPHOS, perquè la inhibició de l'ATP-sintasa per oligomicina en cèl·lules HeLa i HepG<sub>2</sub>, la qual

## Discussió

produeix una disminució de l'ATP cel·lular, també indueix la síntesi de citoquines (Figures 44 i 45). En el cas de les cèl·lules HIB-1B, aquesta inducció de la resposta inflamatòria també té lloc amb la inhibició d'altres components del sistema OXPHOS, com el complex I per la rotenona o la pròpia ANT per atractilat (Figura 46). A més, aquesta resposta de la cèl·lula al tractament amb oligomicina, corrobora les dades de què la resposta inflamatòria pot tenir lloc amb independència de ROS, a pesar del que està descrit (Vaamonde-Garcia et al., 2012).

Per tant, es pot pensar en què la inducció de la producció de citoquines està relacionada amb la disminució dels nivells d'ATP intracel·lular. Se sap que un compromís energètic és capaç d'induir estrès de reticle i que aquest, al seu torn, pot activar la resposta inflamatòria (Tahanian et al., 2011). Emperò, en les cèl·lules HeLa, els marcadors transcripcionals d'estrès de reticle Hspa5 (Grp78) i CHOP10 no reflecteixen cap activació de la via (Figura 49). En el cas de les cèl·lules HIB-1B i 3T3-L1, on el silenciament de la isoforma mANT2 de ratolí també produeix una disminució de l'ATP cel·lular i una forta inducció de la resposta inflamatòria (Figura 41), sí té lloc un augment de l'mRNA d'Hspa5 i CHOP10, tot i que sembla ser molt petit per la contundència de la resposta inflamatòria. Amb tot, no es pot descartar la implicació de l'estrès de reticle en aquesta resposta.

Tot i que no es pugui descartar la participació de l'estrès de reticle, aquesta sèrie d'esdeveniments que tenen lloc en les cèl·lules en resposta al silenciament de la isoforma hANT3 humana i de l'mANT2 de ratolí (aturada de la proliferació, producció de citoquines) fan pensar en la possibilitat de què s'estigui duent a terme un fenomen similar a la senescència. Existeixen dos tipus de senescència: la replicativa i la prematura (Kuilman et al., 2010). La primera consisteix en una resposta cel·lular a l'escurçament progressiu dels telòmers dels cromosomes, el qual és un efecte secundari de la replicació continuada del DNA al llarg de les contínues divisions cel·lulars, tot i que també es produeix en resposta a altres alteracions del DNA. Quan els telòmers assoleixen una determinada longitud, a

les cèl·lules els hi és impossible continuar realitzant la replicació del material genètic, pel que s'atura la divisió cel·lular (d'Adda di Fagagna F., 2008). Per tant, la senescència actua com a supressor de tumors, ja que està encaminada a evitar la proliferació descontrolada de les cèl·lules, a costa de produir un envelliment del teixit (Saab, 2011). En el cas de la senescència prematura, aquesta té lloc abans de què els telòmers arribin a la seva longitud crítica, i pot ser induïda *in vitro* per múltiples factors, com condicions d'estress en el cultiu (Sherr and DePinho, 2000), oncògens (Collado et al., 2005), pèrdua de gens supressors de tumors (Caino et al., 2009).

Les cèl·lules senescentes es caracteritzen per presentar, entre altres, alguns dels següents biomarcadors: aturada del creixement, transformacions morfològiques, activació de gens supressors de tumors, increment de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa, formació de grànuls d'heterocromatina, producció de ROS, autofàgia i inducció de la resposta inflamatòria (Kuilman et al., 2010). En aquest sentit, s'ha descrit que la senescència cel·lular actua com una potent font d'inflamació crònica, amb una elevada producció de citoquines i quimioquines, com la IL-6 o l'MCP-1 (Coppe et al., 2008), que té per objectiu establir un circuit de retroalimentació autocrí que reforci l'aturada de la proliferació així com senyalitzar la retirada de cèl·lules senescentes per part del sistema immune (Freund et al., 2010).

A part dels mecanismes de resposta a dany en el DNA, la senescència també pot ser induïda per un mal funcionament de la cadena respiratòria. S'ha descrit que un impulsor d'aquesta activació és un augment de la producció de ROS (Chen and Ames, 1994; von et al., 1995). En el nostre cas, la inducció de la resposta inflamatòria produïda pels silenciaments de les isoformes hANT3 humana o mANT2 de ratolí, com ja hem comentat, és independent de la producció de ROS, ja que l'N-acetilcisteïna (neutralitzador de ROS) no impedeix la inducció de les citoquines (Figures 47 i 48).

## Discussió

Aquestes dades van en el mateix sentit que les obtingudes per altres grups en altres tipus cel·lulars on una aturada de la proliferació cel·lular produïda per deficiències de la cadena respiratòria no depèn, almenys de forma important, de ROS. Concretament, el tractament de fibroblasts diploides humans (HDF) provinents de la pell amb antimicina A o oligomicina, inhibidors del complex III i de l'ATP-sintasa, respectivament, indueix senescència amb independència de ROS, ja que l'ús d'N-acetilcisteïna en aquests tractaments no evita el bloqueig de la proliferació ni l'augment de l'activitat  $\beta$ -galactosidasa (Stockl et al., 2006). A més, cal emfatitzar que en el nostre cas, la inducció de la producció de citoquines per l'oligomicina s'aconsegueix amb 3 o 6 hores de tractament, mentre que els models utilitzats per altres grups requereixen d'un tractament perllongat durant 14 dies (Stockl et al., 2006).

A més, s'ha descrit que l'envelliment va associat a una disminució de l'expressió d'mANT2 en fetge i que la sobreexpressió de l'mANT2 de ratolí en hepatòcits confereix resistència a l'envelliment i té un efecte protector davant de l'estrès oxidatiu a través de l'estabilització del potencial de membrana mitocondrial i d'una producció incrementada d'ATP (Kim et al., 2012), pel que es pot pensar que la seva pèrdua repercuteixi, d'alguna manera, en promoure la senescència cel·lular.

Així, ha d'existir alguna altra conseqüència derivada de l'aturada de la cadena respiratòria, i que no és ROS, capaç d'induir senescència. En aquest sentit, una disminució dels nivells d'ATP i/o un increment en els d'AMP, conseqüències també d'un mal funcionament de la cadena respiratòria, també són inductors d'una aturada del creixement i de senescència cel·lular a través de l'activació de l'AMPK- $\alpha$  (Wang et al., 2003; Zwerschke et al., 2003). A més, l'AMPK- $\alpha$  també és responsable d'activar l'autofàgia, que és un dels fenòmens que també poden tenir lloc en una cèl·lula senescent, en resposta a una discapacitat energètica (Filomeni et al., 2010). Per tant, és plausible que la disminució dels nivells d'ATP intracel·lulars produïts pel silenciament de les

isoformes hANT3 humana i mANT2 de ratolí siguin responsables de l'establiment d'un fenotip similar a la senescència.

## EFFECTES DE LA SOBREEXPRESSION DE LA ISOFORMA 2 HUMANA DE L'ADENINA NUCLEÒTID TRANSLOCASA EN LÍNIES CEL·LULARS HUMANES I DE RATOLÍ.

Conjuntament amb els experiments de silenciament gènic de les diferents isoformes humanes i de ratolí, la sobreexpressió de l'hANT2 humana ha permès deduir que el propi augment de la relació d'aquesta isoforma respecte a les altres, és suficient per a produir canvis rellevants en el metabolisme energètic i en la capacitat proliferativa de les cèl·lules. En aquestes condicions, no s'han pogut realitzar els estudis comparatius amb la sobreexpressió d'hANT3, degut a que aquesta induïx apoptosi en cèl·lules en cultiu (Zamora et al., 2004a).

La sobreexpressió d'hANT2 en cèl·lules HeLa és capaç de produir una intensificació del metabolisme glucolític (Figura 56), sense que això suposi canvis en l'estat energètic de la cèl·lula (Figura 57). En cèl·lules HepG<sub>2</sub>, la sobreexpressió d'hANT2 també produeix un augment del metabolisme glucolític, en detriment del metabolisme oxidatiu (Figura 63). D'acord amb el que està descrit sobre la capacitat del metabolisme glucolític d'induir la proliferació (DeBerardinis et al., 2008), i tenint en compte que hANT2 va ser identificada com un gen de resposta primerenca, marcador de la proliferació (Battini et al., 1987), ens vam plantejar si un augment d'hANT2 també és capaç d'augmentar el creixement cel·lular, d'una forma similar a un oncogen. En el nostre model experimental, la sobreexpressió d'hANT2 produeix un lleuger augment de la proliferació, tant en cèl·lules HeLa (Figura 55) com en HepG<sub>2</sub> (Figura 62). Tot i això, el fet que en aquests tipus cel·lulars, com en la majoria de cèl·lules d'origen tumoral, en els quals els nivells d'expressió d'hANT2 són molt elevats i el seu metabolisme glucolític molt important, sigui possible observar una intensificació del fenotip tumoral, posa de manifest la gran importància de la funció pròpia d'hANT2 en la regulació del metabolisme.



## Discussió

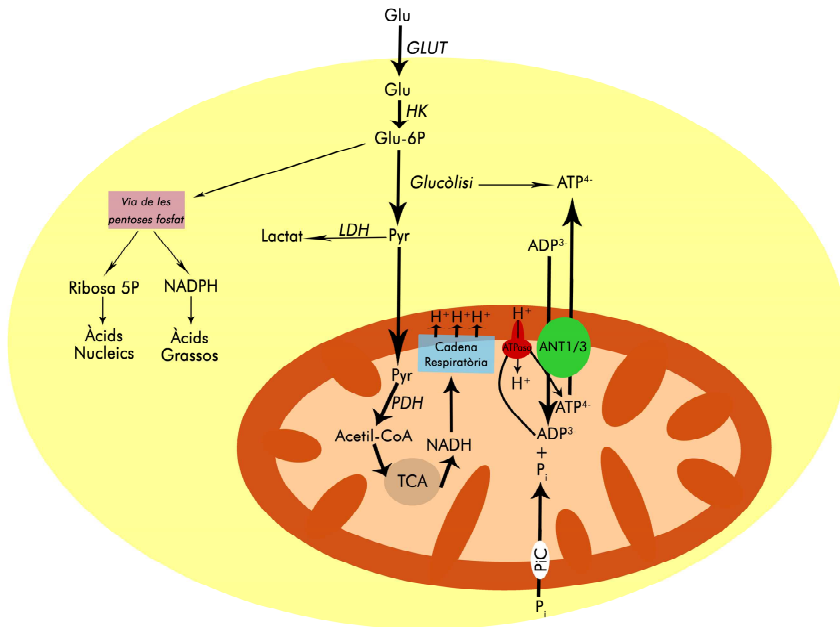
A més a més, el fet que la sobreexpressió heteròloga de l'hANT2 humana en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> o adipòcits 3T3-L1 de ratolí indueix clarament el metabolisme glucolític (Figures 65 i 69), confirma la capacitat intrínseca d'hANT2 per a induir canvis en el fenotip metabòlic de les cèl·lules.

Per altra banda, d'acord amb dades prèvies del grup on es demostra que la sobreexpressió d'hANT1 i d'hANT3, però no la d'hANT2, pot induir apoptosi en cèl·lules HeLa i 293HEK (Zamora et al., 2004a; Zamora et al., 2004b), ens vam plantejar estudiar els efectes de la seva sobreexpressió davant el tractament amb inductors de mort cel·lular. La sobreexpressió d'hANT2 confereix protecció a les cèl·lules HeLa quan són exposades a diferents estímuls apoptòtics, com l'estaurosporina o l'etopòsid (Figura 59). Aquesta protecció es tradueix amb un menor percentatge de cèl·lules IP positives i el manteniment del potencial de membrana mitocondrial i de l'ATP a nivells superiors en les cèl·lules que sobreexpressen hANT2 respecte a les cèl·lules control davant el tractament amb aquests compostos. A més, l'anàlisi per *western blot* (Figura 60) també confirma que hANT2 confereix a les cèl·lules una clara resistència a la mort cel·lular davant el tractament amb lonidamina o estaurosporina, disminuint l'activitat de la via apoptòtica, com demostra la disminució en l'alliberament del citocrom c i la baixa activació de la caspasa 9. Aquests resultats van en el mateix sentit que els publicats per altres grups on, d'acord amb el paper antiapoptòtic que se li havia atribuït a l'hANT2 (Belzacq et al., 2003; Chevrollier et al., 2005), el silenciament d'aquesta isoforma confereix sensibilitat a les cèl·lules tumorals davant estímuls apoptòtics (Le Bras M. et al., 2006; Jang et al., 2010a; Jang et al., 2012) i com això impedeix el creixement tumoral *in vitro* i *in vivo* (Jang et al., 2008b) i redueix la capacitat d'invasió i metàstasi de les cèl·lules canceroses (Jang et al., 2010b).

Per tant, la sobreexpressió de la isoforma hANT2 humana permet concloure que hANT2 és capaç per si sola d'induir el metabolisme glucolític i d'inhibir l'oxidatiu, augmentar la proliferació cel·lular en cèl·lules d'origen tumoral i conferir protecció davant estímuls apoptòtics en aquestes cèl·lules.

**POSSIBLES MODELS QUE EXPLIQUIN LA FUNCIO DIFERENCIAL DE LES ISOFORMES ANT.**

El fet que existeixi una regulació diferencial de l'expressió de les isoformes ANT fa pensar en l'existència de funcions/activitats diferents per a cada isoforma. La quiescència es relaciona amb el metabolisme oxidatiu, sent hANT1 i hANT3 les isoformes importants de les cèl·lules amb aquest tipus de metabolisme energètic, ja que serien les encarregades de dur a terme l'activitat clàssica de l'ANT, realitzant l'exportació de l'ATP mitocondrial, pel que la seva activitat està associada a OXPHOS (Figura 87). En canvi, la proliferació està associada a la glucòlisi, condicions en les quals hem vist que s'indueix hANT2.

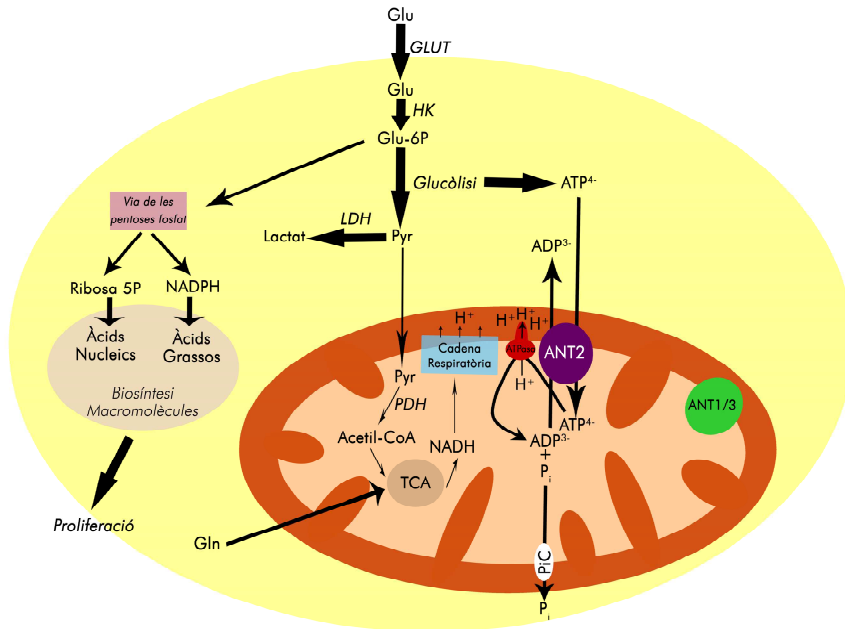


**Figura 87. Model de les funcions diferencials de les isoformes humanes d'ANT en cèl·lules oxidatives/no proliferants.**

Un dels efectes secundaris derivats del metabolisme glucolític i, per tant, de la manca d'activitat oxidativa, és la pèrdua de la generació del potencial de membrana, imprescindible per a la funcionalitat dels mitocondris (Vander Heiden

## Discussió

et al., 2009). És en aquest punt quan hANT2, a diferència de les altres isoformes, podria conferir un avantatge metabòlic a les cèl·lules amb elevada proliferació. S'ha postulat que la isoforma AAC3 de llevat, la qual només s'indueix en condicions anaeròbiques, proporciona ATP d'origen glucolític al mitocondri, per tal de mantenir una font de substrat que sostingui l'activitat inversa de la  $F_0F_1$ -ATPasa, responsable del bombeig de protons i del manteniment del  $\Delta\Psi_m$  (Visser et al., 1994). A més, AAC3 també contribuiria al manteniment del  $\Delta\Psi_m$  gràcies al transport electrogènic derivat de la captació d'ATP<sup>4-</sup> a canvi d'ADP<sup>3-</sup>. Per l'homologia entre l'AAC3 de llevat i l'hANT2 humana (Giraud et al., 1998), s'ha proposat que, en cèl·lules proliferants humanes, hANT2 podria actuar d'una forma similar a la seva homòloga de llevat, establint-se una estreta vinculació entre la glucòlisi i una hipotètica activitat translocasa inversa (Chevrollier et al., 2011) (Figura 88). A més, en cèl·lules de llevat silenciades per les seves 3 isoformes d'AAC, el que impedeix el seu creixement en condicions d'anaerobiosi, la sobreexpressió heteròloga de l'hANT2 humana, però no la d'hANT1 o hANT3, reverteix aquest fenotip i permet el seu creixement (Giraud et al., 1998), encara que altres estudis no confirmen aquest fet (De Marcos et al., 2002). En aquest mateix sentit, experiments *in vitro* centrats en estudiar l'activitat de les isoformes d'ANT no han mostrat evidències de què hANT2 disposi de cap característica cinètica especial que la diferenciï de les isoformes hANT1 i hANT3 i que pugui justificar aquest paper únic (De Marcos et al., 2002). D'igual manera que s'ha proposat a hANT2 com la responsable de realitzar el transport revers en situacions de glucòlisi, no hi ha cap dada que no permeti proposar hANT3, o hANT1, com responsables d'aquesta activitat. A més, aquest model no dóna resposta al paper que estaria jugant hANT3 en aquetes cèl·lules proliferants, on s'expressen tant hANT2 com hANT3 i, per tant, hi coexistirien els dos sentits de transport.



**Figura 88.** Model de les funcions diferencials de les isoformes humanes d'ANT en cèl·lules glucolítiques/no proliferants proposat per *Chevrollier et al., 2011*.

En vista d'aquestes dades conflictives, es podria pensar en un model alternatiu d'activitats diferencials que podrien explicar, d'una forma més senzilla, el fet que hANT2 estigui relacionada amb el metabolisme glucolític i hANT3 amb l'oxidatiu. Com hem vist, hANT3 es troba present de forma ubiqua i, a més a més, el seu silenciament produeix importants efectes sobre les cèl·lules proliferants. Per tant, la seva activitat és necessària per a qualsevol cèl·lula. El nostre model implica que hANT2 tindria molt poca activitat transportadora *in vivo*, com a conseqüència de possibles modificacions postraduccionals i/o interaccions amb altres proteïnes que modificarien la seva activitat. Llavors, l'activitat diferencial d'hANT2 seria d'inhibir, a través d'una interacció directa, l'activitat d'hANT3, la qual seria la isoforma capaç de realitzar el transport de nucleòtids en qualsevol dels dos sentits, en funció de les condicions cel·lulars. D'aquesta manera, l'expressió d'hANT2 en cèl·lules proliferants, com són les tumorals, comportaria una inhibició de l'activitat translocasa d'hANT3, limitant l'activitat del sistema OXPHOS amb la conseqüent inducció del metabolisme glucolític i de la proliferació (Figura 89), d'una manera

## Discussió

similar al que s'ha demostrat amb els estudis d'inhibició de la piruvat kinasa M2, que causa la derivació de la glucosa cap a vies anabòliques, controlant així la proliferació cel·lular (Christofk et al., 2008; Anastasiou et al., 2012). Per contra, en els teixits i cèl·lules on hANT2 no s'expressa, hANT3 seria capaç de realitzar la seva activitat amb total normalitat, garantint un correcte funcionament del metabolisme oxidatiu. Per tant, el quocient glucolític, és a dir, la proporció entre les quantitats relatives d'hANT2 i hANT3, sembla ser clau per a entendre el fenotip metabòlic d'un tipus cel·lular concret.

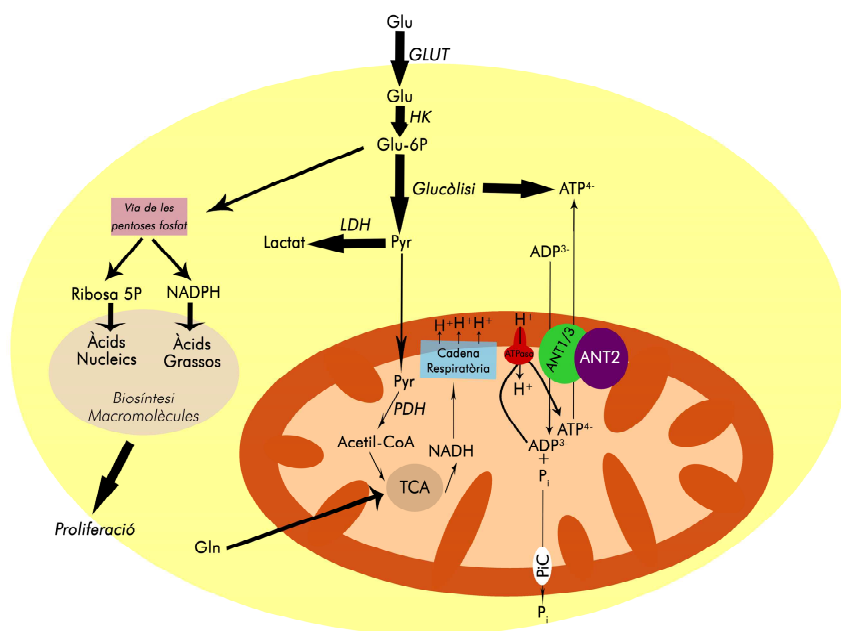


Figura 89. Model de les funcions diferencials de les isoformes humanes d'ANT en cèl·lules glucolítiques/no proliferants compatible amb les dades obtingudes en el present treball.

En aquest sentit, les nostres dades de silenciament mitjançant shRNA mostren que la manca d'hANT2 produeix un augment de l'oxidació, ja que es perdria l'efecte inhibidor sobre hANT3. Per contra, la manca d'hANT3 suposa una inducció del metabolisme glucolític (tal i com faria hANT2 inhibint hANT3) però alhora, una disminució dels nivells energètics, una disminució de la proliferació i una activació del programa de senescència, ja que l'activitat d'hANT3 seria

imprescindible per al correcte funcionament de la cèl·lula i que en aquestes condicions no podria tenir lloc. Paral·lelament, una sobreexpressió d'hANT2 suposaria una major inhibició de l'activitat translocasa d'hANT3 associada a OXPHOS (exportació d'ATP) i, obligaria a les cèl·lules a promoure el metabolisme glucolític, tal i com veiem en els nostres resultats. Fins i tot, aquesta activitat inhibidora d'hANT2 podria tenir lloc en sistemes heteròlegs com els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> o els adipòcits 3T3-L1 de ratolí, on la isoforma hANT2 humana inhibiria l'activitat translocasa de les isoformes de ratolí. És més, tenint en compte que, primer, nosaltres assumim que la isoforma mANT2 de ratolí és capaç de realitzar el transport de nucleòtids en qualsevol dels dos sentits, depenent de la situació en què es trobi la cèl·lula i, segon, que les conseqüències del seu silenciament són similars al de l'hANT3 humana, no és impossible pensar que la isoforma mANT2 de ratolí sigui l'equivalent funcional de l'hANT3 humana i no de l'hANT2, com les dades d'homologia de les seqüències i la nomenclatura ens podrien fer pensar.

No obstant, existeixen dades prèvies d'altres autors que no s'ajustarien a aquest model, concretament en el fet que nosaltres establim que hANT2 tindria poca activitat *in vivo*. Una primera dada és que, en mitocondris purificats de llevat *knockout* per les seves isoformes però que expressen de forma heteròloga les isoformes ANT humanes, s'ha vist que totes les isoformes tenen la mateixa activitat (De Marcos et al., 2002). Però aquestes dades obtingudes *in vitro* també juguen en contra de la hipòtesi del transport revers de l'hANT2 (Chevrollier et al., 2011), pel que aquesta alternativa és igualment plausible. Unes altres dades que podrien anar en contra del nostre model són les que fan referència a què el silenciament d'hANT2 en cèl·lules HeLa comporta una pèrdua d'activitat translocasa (Le Bras M. et al., 2006). Tanmateix, aquestes dades són poc fiables ja que les cèl·lules HeLa tenen una molt baixa activitat transportadora, normalment per sota del llindar de detecció de la majoria de mètodes, tal i com sabem per la nostra experiència.

## Discussió

Per tant, d'acord amb totes les dades que disposem, seria possible un model alternatiu en el que hANT2 actuaria com un inhibidor de l'activitat translocasa d'hANT3 en cèl·lules proliferants i, que per tant, seria la relació hANT2/hANT3 la que determinaria si una cèl·lula és oxidativa o glucolítica. No obstant, som conscients que degut a les múltiples interaccions que s'han descrit que la proteïna ANT és capaç de realitzar amb altres factors o proteïnes, no es pot descartar que aquesta regulació del tipus de metabolisme energètic en funció de la isoforma d'ANT, sigui conseqüència de la interacció específica amb algun element regulador independentment de l'activitat transportadora.

## **REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LES ISOFORMES ANT1, ANT2 I ANT3 HUMANES I ANT1 I ANT2 DE RATOLÍ PER PGC-1 $\alpha$ .**

En el present treball s'ha descrit la implicació de PGC-1 $\alpha$  en la regulació transcripcional de les diferents isoformes d'ANT, tant en cèl·lules humanes com de ratolí. PGC-1 $\alpha$  és un dels coactivadors transcripcionals més rellevants en la regulació de la biogènesi mitocondrial (Wu et al., 1999). PGC-1 $\alpha$  manca d'un domini d'unió al DNA pel que la seva activitat la duu a terme a través de la interacció de diversos factors de transcripció sobre promotors d'un extens número de gens nuclears codificants per proteïnes mitocondrials o relacionades, d'una forma més o menys directa, amb l'activitat mitocondrial. Entre aquets factors de transcripció hi trobem els NRFs (Wu et al., 1999), els ERRs (Mootha et al., 2004; Schreiber et al., 2004), MEF2 (Akimoto et al., 2005), els PPARs (Vega et al., 2000; Huss and Kelly, 2004), YY-1 (Cunningham et al., 2007) i receptors d'hormones (Weitzel et al., 2003), regulant principalment la biogènesi mitocondrial, la utilització de la glucosa, l'oxidació d'àcids grassos o els processos de detoxicació d'espècies oxidants. Per tal de realitzar aquesta sèrie d'activitats, PGC-1 $\alpha$  integra la informació provinent de múltiples vies de senyalització tan diverses com les dirigides per les hormones tiroïdals, la sintasa d'òxid nítric (NOS), la p38MAPK, els SIRT, la calcineurina, les kinases activades per calci-calmodulina (CaMKs), l'AMPK, les kinases dependents de ciclines (CDKs) o per l'estimulació  $\beta$ -

adrenèrgica (Scarpulla, 2008). L'expressió de PGC-1 $\alpha$  varia en funció de l'activitat oxidativa d'un teixit concret, trobant-se en gran quantitat en múscul cardíac o teixit adipós marró, o en menor mesura en múscul esquelètic o ronyons (Ventura-Clapier et al., 2008). A més, la seva expressió és induïda ràpidament d'acord amb les necessitats energètiques del teixit, com són les situacions d'exposició al fred (Giralt et al., 2011; Hondares et al., 2011), a l'exercici (Pilegaard et al., 2003) o al dejuni (Kersten et al., 1999).

El fet que ANT sigui una proteïna mitocondrial amb important activitat en l'obtenció de l'ATP, ens va conduir a considerar-la com una possible diana de la regulació de PGC-1 $\alpha$ . Durant la realització d'aquest treball, van aparèixer alguns treballs que vinculaven l'activitat d'ANT1 amb els nivells d'expressió de PGC-1 $\alpha$ , veient que una sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  evita l'apoptosi endotelial mitjançant un augment de l'activitat translocasa d'hANT1 (Won et al., 2010) o que un augment d'activitat de PGC-1 $\alpha$  s'associa amb una disminució de la tolerància cardíaca a la isquèmia per efecte d'una sobrerregulació d'mANT1 (Lynn et al., 2010). Però en cap dels dos casos els autors proposen cap model de regulació de l'expressió d'ANT.

Per tant, ens vam proposar esbrinar si PGC-1 $\alpha$  és un coactivador transcripcional de les isoformes d'ANT i amb quins factors de transcripció interacciona per a dur a terme aquesta regulació. Primerament varem comprovar si PGC-1 $\alpha$  regulava l'expressió transcripcional de les isoformes d'ANT, tant humanes com de ratolí. Efectivament, la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  indueix la transcripció de les isoformes humanes d'ANT en cèl·lules HeLa, tot i que l'efecte sobre hANT3 és inferior al de les altres dues (Figura 70A). En el cas de les isoformes de ratolí, la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  també indueix l'expressió d'mANT1 i mANT2 en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Figures 70B i 70D) i adipòcits 3T3-L1 (Figura 70C).



## Discussió

Una vegada vist que PGC-1 $\alpha$  regula l'expressió de les isoformes d'ANT, ens vam plantejar esbrinar quins factors de transcripció estaven implicats en aquesta regulació. El primer model de regulació que es va estudiar va ser el format per mTOR, YY-1 i PGC-1 $\alpha$ , el qual juga un important paper en la regulació de l'expressió de múltiples proteïnes mitocondrials en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Cunningham et al., 2007). Disposant d'aquesta informació, ens vam plantejar si mTOR-YY-1 també participa en la inducció de l'expressió de les isoformes d'ANT per part de PGC-1 $\alpha$  i si, donat el cas, existeix aquesta via de regulació mTOR-YY-1-PGC-1 $\alpha$  en altres línies cel·lulars a part de la muscular. Mitjançant l'ús de rapamicina, el qual és un inhibidor específic d'mTOR (Peng et al., 2002), hem pogut comprovar que aquest sistema sí actua en la regulació de l'expressió d'mANT1 i mANT2 per PGC-1 $\alpha$  en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, ja que la inhibició d'mTOR impedeix la inducció de l'expressió de les isoformes d'ANT per part de PGC-1 $\alpha$  (Figura 76).

En canvi, aquesta via de regulació no és funcional ni en cèl·lules HeLa (Figura 71) ni en adipòcits 3T3-L1 (Figura 83), ja que la rapamicina no evita l'efecte inductor de PGC-1 $\alpha$ , malgrat que nosaltres mateixos hem comprovat que mTOR sí participa de la regulació de l'expressió de l'hANT1 i hANT2 humanes en cèl·lules HeLa, ja que la rapamicina disminueix l'expressió basal d'aquestes dues isoformes (Figura 19), però ho deu fer independentment de PGC-1 $\alpha$ . La regulació d'hANT3 és diferent a la de les altres dues isoformes humanes ja que, per una banda, l'efecte de PGC-1 $\alpha$  sobre la seva expressió és molt dèbil i, per l'altra, el tractament amb rapamicina estimula la seva expressió. Per tant, sembla existir una especificitat en els mecanismes de regulació de l'expressió de les isoformes d'ANT depenent del tipus cel·lular.

Amb l'objectiu de cercar altres sistemes de regulació, vam incloure en l'estudi els PPARs i l'ERR- $\alpha$ . L'activitat dels PPARs se centra majoritàriament en la regulació de l'expressió de proteïnes involucrades en el transport i oxidació d'àcids grassos, tot i que també se'ls ha relacionat amb la regulació de la biogènesi mitocondrial en determinades situacions (Kersten et al., 2000). Així, mentre que

PPAR- $\alpha$  (Desvergne and Wahli, 1999; Vega et al., 2000) i PPAR- $\beta/\delta$  (Tanaka et al., 2003; Wang et al., 2004) juguen un paper molt determinant en la regulació de l'oxidació d'àcids grassos, PPAR- $\gamma$  no sembla intervenir-hi d'una manera tan directa en aquest procés (Gilde et al., 2003), quedant rellevada més aviat a la regulació de la diferenciació adipocitària (Tontonoz et al., 1994).

En cèl·lules HeLa, hem pogut comprovar com PPAR- $\gamma$ , mitjançant la seva activació amb l'agonista rosiglitazona (Tontonoz et al., 1994), no participa de la regulació transcripcional de les diferents isoformes d'ANT (Figura 72), ja que no produeix cap efecte, amb o sense combinació amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ . No obstant, sí que activa la transcripció d'altres proteïnes mitocondrials, com la subunitat de la citocrom c oxidasa COX4I1 o la subunitat de l'ATP-sintasa ATP5J, tal i com també s'ha vist en altres treballs (Rong et al., 2011). Així mateix, ni la sobreexpressió de PPAR- $\alpha$  ni la seva activació mitjançant l'ús del seu agonista Wy-14643, amb independència de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , tampoc induïx l'expressió de les isoformes humanes en cèl·lules HeLa (Figura 73), sinó que fins i tot exerceix un lleuger efecte repressor sobre l'expressió d'hANT2 i hANT3.

Així mateix, aquests dos PPARs ( $\alpha$  i  $\gamma$ ) tampoc són necessaris en la inducció de les isoformes d'ANT en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Figures 77 i 78). En canvi, l'activació mitjançant l'agonista GW501516 de PPAR- $\delta$ , produeix un efecte sumatori a la inducció de l'expressió d'mANT1 i mANT2 per part de PGC-1 $\alpha$  en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Figura 79). En aquest cas, la inducció d'mANT1 també té lloc per efecte de l'agonista sense necessitat de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ , mentre que en mANT2 no. Aquesta particularitat es podria explicar pel fet que mANT1 és la isoforma pròpia del múscul esquelètic (Levy et al., 2000) i pot existir una regulació més fina en aquesta isoforma per PPAR- $\delta$ , el qual és un important factor de transcripció implicat en la biogènesi mitocondrial conjuntament amb PGC-1 $\alpha$  en múscul (Hondares et al., 2007).

## Discussió

En adipòcits 3T3-L1, com ja hem vist, certs factors adipogènics com la insulina o la rosiglitazona són inductors de l'expressió d'mANT2 (Figura 29). Seguint aquest camí, vam estudiar el possible paper que podria estar jugant PPAR- $\gamma$ , receptor nuclear que lliga la rosiglitazona, en la inducció de l'expressió de les isoformes d'ANT per PGC-1 $\alpha$ . Malgrat que la rosiglitazona és un potent inductor de l'expressió d'mANT2, el seu efecte no és sumatori al obtingut amb la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  (Figura 84). A més, l'efecte de PGC-1 $\alpha$  no es veu afectat per la inhibició de PPAR- $\gamma$ . Per tant, podem dir que PPAR- $\gamma$  és un factor de transcripció positiu de l'expressió d'mANT2 però que actua de forma independent de PGC-1 $\alpha$ .

Aquestes dades coincideixen amb les d'altres autors que afirmen que, tot i que PPAR- $\gamma$  i PGC-1 $\alpha$  interaccionen en la coactivació transcripcional de multitud de gens del programa de diferenciació adipocitària (Tontonoz and Spiegelman, 2008), el qual també està associat a una activació de la biogènesi mitocondrial (Spiegelman et al., 2000), PPAR- $\gamma$  és capaç d'actuar independentment de PGC-1 $\alpha$  en la regulació transcripcional d'alguns d'ells, a través del *Mediator coactivator complex*, el qual és un complex multiproteic que actua connectant els factors de transcripció units al DNA amb la maquinària transcripcional (Malik and Roeder, 2005). Entre les diferents subunitats de *Mediator*, MED1/TRAP220/PBP/DRIP205 (Ge et al., 2008) i MED14 (Grontved et al., 2010) són les responsables del reconeixement i interacció amb PPAR- $\gamma$ .

Per tant, tot i que l'mANT2 de ratolí es tracti d'una proteïna mitocondrial que, fins al moment, no se l'hagi involucrat amb el programa de diferenciació adipocitària, la seva regulació pot estar dirigida per PPAR- $\gamma$  com a component de la maquinària funcional del mitocondri, la qual és imprescindible per a l'adipogènesi. En canvi, l'activació de PPAR- $\gamma$  mitjançant el tractament amb rosiglitazona produeix un efecte molt dèbil sobre l'expressió d'mANT1. Aquesta diferència es pot explicar pel fet que mANT2 és la isoforma que trobem associada a la diferenciació adipocitària, mentre que la importància d'mANT1 en aquestes cèl·lules és mínima, ja que és la isoforma pròpia de múscul i cor.

Per altra banda, ERR- $\alpha$  s'ha descrit com un important cofactor de PGC-1 $\alpha$  en la regulació de la transcripció de gens involucrats en la fosforilació oxidativa i la biogènesi mitocondrial (Villena and Kralli, 2008). Els nostres experiments d'inhibició d'ERR- $\alpha$  mitjançant l'ús de l'inhibidor específic XCT-790 (Busch et al., 2004) o a través del silenciament gènic d'ERR- $\alpha$  mitjançant RNA d'interferència ens han mostrat que el factor de transcripció ERR- $\alpha$  és imprescindible per a permetre la inducció transcripcional de les isoformes d'ANT per efecte de la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$ . Aquesta dependència de PGC-1 $\alpha$  vers ERR- $\alpha$  l'hem descrit en totes les línies cel·lulars estudiades. En la línia cel·lular humana HeLa, podem constatar com la inhibició d'ERR- $\alpha$  mitjançant XCT-790 suprimeix l'efecte inductor de PGC-1 $\alpha$  (Figura 75). En aquestes cèl·lules, la inhibició d'ERR- $\alpha$  sense la sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  produeix un efecte activador de la transcripció de les tres isoformes. Aquesta dualitat en l'activitat d'un factor de transcripció sobre la regulació de les isoformes d'ANT també ha estat observada en el cas d'hANT2, on els factors de transcripció Sp-1 poden actuar com a activadors o inhibidors depenent del lloc d'unió al promotor (Li et al., 1996a; Luciakova et al., 2000; Zaid et al., 2001) i en altres proteïnes del sistema OXPHOS, com el citocrom  $c_1$ , la subunitat  $\beta$  de l' $F_1$ -ATPasa o l'mtTFA (Zaid et al., 1999). Per tant, aquest doble paper d'ERR- $\alpha$  sobre la regulació de les isoformes d'ANT podria dependre del lloc d'unió, el qual podria condicionar la interacció amb altres elements de la maquinària transcripcional responsables de la repressió o de l'activació dels gens de les diferents isoformes d'ANT, com PGC-1 $\alpha$ .

En els miotubs  $C_2C_{12}$  (Figures 81 i 82) i en els adipòcits 3T3-L1 (Figures 85 i 86), ERR- $\alpha$  també és necessari en la inducció de l'expressió de les isoformes mANT1 i mANT2 de ratolí per PGC-1 $\alpha$ , ja que la seva inhibició o silenciament no permet l'augment transcripcional de les isoformes d'ANT. En el cas dels miotubs  $C_2C_{12}$ , la inhibició d'ERR- $\alpha$  amb XCT-790 disminueix l'expressió, tant de les isoformes d'ANT com d'altres proteïnes mitocondrials, com la subunitat COX411 de la citocrom c oxidasa, dades que van en el mateix sentit del que han descrit altres grups al voltant de la importància d'ERR- $\alpha$  en la regulació de la biogènesi mitocondrial (Schreiber et al., 2004).

## Discussió

Fins al moment, les úniques dades que relacionen ERR- $\alpha$  i ANT fan referència a què ERR- $\gamma$  i ERR- $\alpha$  poden actuar de forma directa en la regulació gènica de moltes proteïnes mitocondrials en múscul cardíac, entre les quals hi ha mANT1 (Dufour et al., 2007). Amb els presents experiments, podem afirmar que ERR- $\alpha$  és un factor de transcripció indispensable per a la coactivació transcripcional per PGC-1 $\alpha$  de totes les isoformes d'ANT i que aquesta activitat té lloc en tipus cel·lulars de llinatges molt diferents. A més, també hem establert que, en la inducció de les isoformes d'ANT per PGC-1 $\alpha$ , també coexisteixen altres sistemes de regulació de l'expressió mediats per altres factors de transcripció, com mTOR-YY-1 i PPAR- $\delta$  en el cas dels miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Figura 90).

L'anàlisi a nivell bioinformàtic que hem realitzat dels promotors de les diferents isoformes mostra l'existència, tant en les tres isoformes humanes com en les dues de ratolí, de possibles elements de resposta a estrògens (ERE) i elements de resposta al factor esteroidegènic 1 (SFRE), els quals són potencials llocs d'unió d'ERR- $\alpha$  (Vanacker et al., 1999a; Vanacker et al., 1999b), suggerint la possibilitat de regulació de les isoformes d'ANT per ERR- $\alpha$ .

No obstant, aquesta universalitat de PGC-1 $\alpha$  i ERR- $\alpha$  sobre la regulació transcripcional de les diferents isoformes d'ANT sobta amb les dades existents fins ara, ja que l'expressió de les isoformes d'ANT és altament dependent del teixit i de l'estat de proliferació o de desenvolupament. Per exemple, PGC-1 $\alpha$  regula l'expressió d'hANT1 en cèl·lules HeLa, on la importància d'aquesta isoforma es considera menor, ja que hANT1 només se l'havia relacionat en cèl·lules musculars i de cervell.

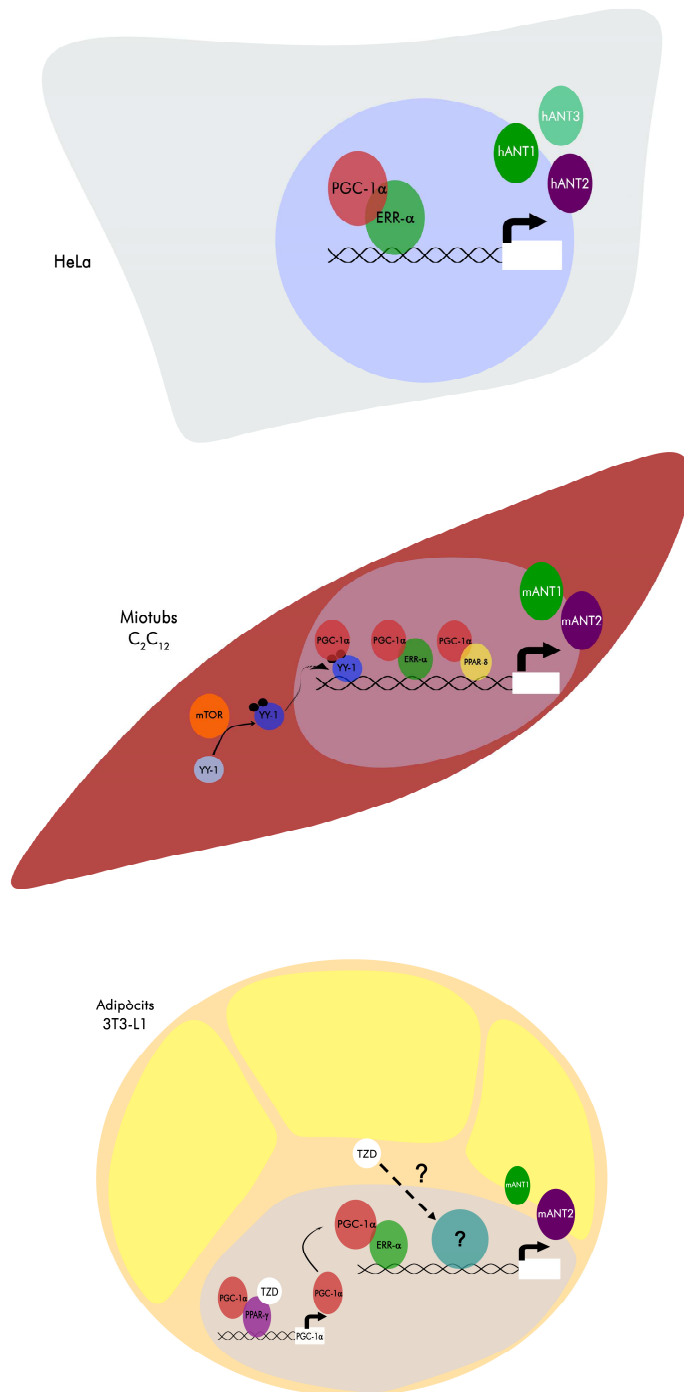


Figura 90. Models de la regulació de l'expressió de les isoformes d'ANT per PGC-1α en cèl·lules HeLa, adipòcits 3T3-L1 i miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

## Discussió

Així mateix, hem demostrat que l'expressió d'hANT2, que en principi ha estat descrita com la isoforma que depèn de proliferació i està associada al metabolisme glucolític, no es regula per proliferació en cèl·lules que han escapat del mecanisme d'aturada del creixement (*growth-arrest*), com són les cèl·lules HeLa o HepG<sub>2</sub>. Fins i tot, en aquestes cèl·lules, l'expressió d'hANT2 s'indueix per PGC-1 $\alpha$ , amb un comportament similar al que podria presentar qualsevol proteïna implicada en la fosforilació oxidativa.

En canvi, hANT3, l'expressió de la qual sempre s'ha considerat ubiqua, sí es regula en funció de la capacitat proliferativa en cèl·lules sense *growth-arrest*. A més, tal i com hem vist en la primera part d'aquest treball, l'expressió d'hANT3 augmenta en funció d'una estimulació del metabolisme oxidatiu i, per tant, es podria esperar que fos la isoforma més sensible a la regulació per PGC-1 $\alpha$ , però a la pràctica, és la isoforma que presenta una resposta més dèbil.

Pel que respecta a les isoformes de ratolí, l'expressió d'mANT1 i mANT2 es regulen tant en funció de la proliferació cel·lular com per PGC-1 $\alpha$ . mANT2 és la isoforma pròpia tant de cèl·lules en proliferació com de cèl·lules diferenciades de llinatge no muscular (on, en aquest cas, és mANT1 la isoforma majoritària), com els adipòcits 3T3-L1 i, per tant, la seva regulació segurament obeeix a les necessitats oxidatives de la cèl·lula en cada cas, ja que mANT2 assumiria les activitats que en humans es reparteixen hANT2 i hANT3, tal i com corroboren els resultats de silenciament de la isoforma d'mANT2 de ratolí en cèl·lules HIB-1B, on es desencadena un augment del metabolisme glucolític, amb conseqüències similars a les que tenen lloc amb el silenciament de l'hANT3 humana. En el segon cas, en cèl·lules madures en cultiu com els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> o els adipòcits 3T3-L1, tant mANT1 com mANT2 es comporten com qualsevol altra proteïna de la maquinària mitocondrial i es regulen per PGC-1 $\alpha$ .

En general, malgrat que les diferents isoformes d'ANT, tant les humanes com les de ratolí, tenen la capacitat de ser regulades per PGC-1 $\alpha$ , el fet que les isoformes es regulin de forma diferent *in vivo*, fa pensar que altres factors, com el tipus de metabolisme energètic o l'estat proliferatiu, són claus per a la regulació específica de cada isoforma.





## CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

1. En línies cel·lulars humanes, l'expressió de la isoforma hANT2 canvia en funció del metabolisme i la proliferació en cèl·lules que mantenen la capacitat d'aturar el seu creixement (*growth-arrest*), mentre que en línies que no conserven aquesta sensibilitat, és l'expressió de la isoforma hANT3 la que es modifica.
2. Els nostres resultats en línies cel·lulars humanes ens permeten definir el **quocient glucolític** com el quocient entre l'mRNA d'hANT2 i la suma dels mRNA d'hANT1 i hANT3. Aquest quocient està estretament lligat a canvis del metabolisme energètic de la cèl·lula, de manera que augmenta amb la glucòlisi i disminueix amb l'oxidació, independentment de si és l'expressió d'hANT2 o d'hANT3 la que varia.
3. En humans, el silenciament d'hANT2 comporta una disminució del metabolisme glucolític a favor de l'oxidatiu, mentre que el silenciament d'hANT3 disminueix el creixement de les cèl·lules alhora que promou el metabolisme glucolític.
4. En línies cel·lulars de ratolí de llinatge no muscular, l'expressió de la isoforma mANT2 es relaciona tant amb la proliferació com amb la diferenciació, indicant per tant, que aquesta isoforma desenvolupa les diferents funcions que en humans estan separades en hANT2 i hANT3.
5. En ratolins, el silenciament d'mANT1 augmenta l'oxidació mentre que el silenciament d'mANT2 promou el metabolisme glucolític i disminueix el creixement.

## Conclusions

6. El silenciament de l'hANT3 humana o de l'mANT2 de ratolí produeix un fenotip similar al de la senescència cel·lular, com demostra l'aturada de la proliferació cel·lular i l'activació de la resposta inflamatòria, via la inducció de les citokines TNF- $\alpha$ , IL6 i MCP-1, independentment de ROS. Aquest fenotip podria estar causat per la disminució de l'ATP cel·lular i per l'activació de l'AMPK- $\alpha$ .
7. La sobreexpressió de la isoforma hANT2 humana és capaç de promoure, per si sola, el metabolisme glucolític tant en línies cel·lulars altament glucolítiques i proliferatives de per sí, com les humanes HeLa i HepG<sub>2</sub>, com en línies oxidatives com els miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> o els adipòcits 3T3-L1 de ratolí, sense que això repercuteixi en l'estat energètic de les cèl·lules. A més, la sobreexpressió d'hANT2 confereix protecció davant la mort cel·lular induïda per estaurosporina, lonidamina o etopòsid.
8. Els nostres resultats estan d'acord en assumir que la isoforma hANT2 actuaria com un inhibidor de l'activitat translocasa d'hANT3 en cèl·lules proliferants.
9. La sobreexpressió de PGC-1 $\alpha$  indueix, tot i que de forma variable, l'expressió de totes les isoformes d'ANT en cèl·lules humanes i de ratolí. En tots els casos estudiats, aquesta inducció és totalment dependent d'ERR- $\alpha$ , tot i que en miotubs C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> també hi participen altres factors de transcripció com mTOR-YY-1 o PPAR- $\delta$ .





## BIBLIOGRAFIA





## BIBLIOGRAFIA

Abu-Elheiga,L., Matzuk,M.M., Abo-Hashema,K.A., and Wakil,S.J. (2001). Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291, 2613-2616.

Adrian,G.S., McCammon,M.T., Montgomery,D.L., and Douglas,M.G. (1986). Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell Biol.* 6, 626-634.

Akimoto,T., Pohnert,S.C., Li,P., Zhang,M., Gumbs,C., Rosenberg,P.B., Williams,R.S., and Yan,Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 19587-19593.

Alcala,S., Klee,M., Fernandez,J., Fleischer,A., and Pimentel-Muinos,F.X. (2008). A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene* 27, 44-54.

Anastasiou,D., Yu,Y., Israelsen,W.J., Jiang,J.K., Boxer,M.B., Hong,B.S., Tempel,W., Dimov,S., Shen,M., Jha,A., Yang,H., Mattaini,K.R., Metallo,C.M., Fiske,B.P., Courtney,K.D., Malstrom,S., Khan,T.M., Kung,C., Skoumbourdis,A.P., Veith,H., Southall,N., Walsh,M.J., Brimacombe,K.R., Leister,W., Lunt,S.Y., Johnson,Z.R., Yen,K.E., Kunii,K., Davidson,S.M., Christofk,H.R., Austin,C.P., Inglese,J., Harris,M.H., Asara,J.M., Stephanopoulos,G., Salituro,F.G., Jin,S., Dang,L., Auld,D.S., Park,H.W., Cantley,L.C., Thomas,C.J., and Vander Heiden,M.G. (2012). Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat. Chem. Biol.*

Andersson,U. and Scarpulla,R.C. (2001). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 3738-3749.

Asimakis,G.K. and Aprille,J.R. (1980). In vitro alteration of the size of the liver mitochondrial adenine nucleotide pool: correlation with respiratory functions. *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 307-316.

Atlante,A., Amadoro,G., Bobba,A., de,B.L., Corsetti,V., Pappalardo,G., Marra,E., Calissano,P., and Passarella,S. (2008). A peptide containing residues 26-44 of tau protein impairs mitochondrial oxidative phosphorylation acting at the level of the adenine nucleotide translocator. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1289-1300.

Attardi,G. and Schatz,G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 289-333.

Baines,C.P., Kaiser,R.A., Purcell,N.H., Blair,N.S., Osinska,H., Hambleton,M.A., Brunskill,E.W., Sayen,M.R., Gottlieb,R.A., Dorn,G.W., Robbins,J., and

## Bibliografia

Molkentin,J.D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* *434*, 658-662.

Baines,C.P., Kaiser,R.A., Sheiko,T., Craigen,W.J., and Molkentin,J.D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* *9*, 550-555.

Baines,C.P. and Molkentin,J.D. (2009). Adenine nucleotide translocase-1 induces cardiomyocyte death through upregulation of the pro-apoptotic protein Bax. *J. Mol. Cell Cardiol.* *46*, 969-977.

Balaban,R.S., Nemoto,S., and Finkel,T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* *120*, 483-495.

Barath,P., Albert-Fournier,B., Luciakova,K., and Nelson,B.D. (1999a). Characterization of a silencer element and purification of a silencer protein that negatively regulates the human adenine nucleotide translocator 2 promoter. *J. Biol. Chem.* *274*, 3378-3384.

Barath,P., Luciakova,K., Hodny,Z., Li,R., and Nelson,B.D. (1999b). The growth-dependent expression of the adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) gene is regulated at the level of transcription and is a marker of cell proliferation. *Exp. Cell Res.* *248*, 583-588.

Barath,P., Poliakova,D., Luciakova,K., and Nelson,B.D. (2004). Identification of NF1 as a silencer protein of the human adenine nucleotide translocase-2 gene. *Eur. J. Biochem.* *271*, 1781-1788.

Basso,E., Fante,L., Fowlkes,J., Petronilli,V., Forte,M.A., and Bernardi,P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* *280*, 18558-18561.

Batchelor,A.H., Piper,D.E., de la Brousse,F.C., McKnight,S.L., and Wolberger,C. (1998). The structure of GABPalpha/beta: an ETS domain-ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* *279*, 1037-1041.

Battini,R., Ferrari,S., Kaczmarek,L., Calabretta,B., Chen,S.T., and Baserga,R. (1987). Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated. *J. Biol. Chem.* *262*, 4355-4359.

Bauer,M.K., Schubert,A., Rocks,O., and Grimm,S. (1999). Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J. Cell Biol.* *147*, 1493-1502.

Bayley,J.P. and Devilee,P. (2012). The Warburg effect in 2012. *Curr. Opin. Oncol.* *24*, 62-67.

Belzacq,A.S., Vieira,H.L., Verrier,F., Vandecasteele,G., Cohen,I., Prevost,M.C., Larquet,E., Pariselli,F., Petit,P.X., Kahn,A., Rizzuto,R., Brenner,C., and Kroemer,G.

(2003). Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Res.* *63*, 541-546.

Bernardi,P., Vassanelli,S., Veronese,P., Colonna,R., Szabo,I., and Zoratti,M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.* *267*, 2934-2939.

Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363-366.

Betina,S., Gavurnikova,G., Haviernik,P., Sabova,L., and Kolarov,J. (1995). Expression of the AAC2 gene encoding the major mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled at the transcriptional level by oxygen, heme and HAP2 factor. *Eur. J. Biochem.* *229*, 651-657.

Beutner,G., Ruck,A., Riede,B., and Brdiczka,D. (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim. Biophys. Acta* *1368*, 7-18.

Bevilacqua,L., Seifert,E.L., Estey,C., Gerrits,M.F., and Harper,M.E. (2010). Absence of uncoupling protein-3 leads to greater activation of an adenine nucleotide translocase-mediated proton conductance in skeletal muscle mitochondria from calorie restricted mice. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 1389-1397.

Beyer,K. and Klingenberg,M. (1985). ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* *24*, 3821-3826.

Bhangoo,M.K., Tzankov,S., Fan,A.C., Dejgaard,K., Thomas,D.Y., and Young,J.C. (2007). Multiple 40-kDa heat-shock protein chaperones function in Tom70-dependent mitochondrial import. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3414-3428.

Blattler,S.M., Verdeguer,F., Liesa,M., Cunningham,J.T., Vogel,R.O., Chim,H., Liu,H., Romanino,K., Shirihai,O.S., Vazquez,F., Ruegg,M.A., Shi,Y., and Puigserver,P. (2012). Defective mitochondrial morphology and bioenergetic function in mice lacking the transcription factor Yin Yang 1 in skeletal muscle. *Mol. Cell Biol.* *32*, 3333-3346.

Block,M.R., Zaccai,G., Lauquin,G.J., and Vignais,P.V. (1982). Small angle neutron scattering of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein in detergent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *109*, 471-477.

Bogenhagen,D.F. (2011). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim. Biophys. Acta*.

## Bibliografia

Booth,F.W. and Thomason,D.B. (1991). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev.* *71*, 541-585.

Boulay,F. and Vignais,P.V. (1984). Localization of the N-ethylmaleimide reactive cysteine in the beef heart mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Biochemistry* *23*, 4807-4812.

Braissant,O., Foufelle,F., Scotto,C., Dauca,M., and 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*, 354-366.

Brand,M.D., Pakay,J.L., Ocloo,A., Kokoszka,J., Wallace,D.C., Brookes,P.S., and Cornwall,E.J. (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem. J.* *392*, 353-362.

Brandolin,G., Le,S.A., Trezeguet,V., Lauquin,G.J., and Vignais,P.V. (1993). Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* *25*, 459-472.

Brenner,C., Subramaniam,K., Pertuiset,C., and Pervaiz,S. (2011). Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer. *Oncogene* *30*, 883-895.

Brierley,G. and Green,D.E. (1965). COMPARTMENTATION OF THE MITOCHONDRION. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *53*, 73-79.

Brower,J.V., Lim,C.H., Han,C., Hankowski,K.E., Hamazaki,T., and Terada,N. (2009a). Differential CpG island methylation of murine adenine nucleotide translocase genes. *Biochim. Biophys. Acta* *1789*, 198-203.

Brower,J.V., Lim,C.H., Jorgensen,M., Oh,S.P., and Terada,N. (2009b). Adenine nucleotide translocase 4 deficiency leads to early meiotic arrest of murine male germ cells. *Reproduction.* *138*, 463-470.

Brower,J.V., Rodic,N., Seki,T., Jorgensen,M., Fliess,N., Yachnis,A.T., McCarrey,J.R., Oh,S.P., and Terada,N. (2007). Evolutionarily conserved mammalian adenine nucleotide translocase 4 is essential for spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* *282*, 29658-29666.

Brustovetsky,N. and Klingenberg,M. (1996). Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry* *35*, 8483-8488.

Brustovetsky,N., Tropschug,M., Heimpel,S., Heidkamper,D., and Klingenberg,M. (2002). A large Ca<sup>2+</sup>-dependent channel formed by recombinant ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemistry* *41*, 11804-11811.

- Budihardjo,I., Oliver,H., Lutter,M., Luo,X., and Wang,X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *15*, 269-290.
- Busch,B.B., Stevens,W.C., Jr., Martin,R., Ordentlich,P., Zhou,S., Sapp,D.W., Horlick,R.A., and Mohan,R. (2004). Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *J. Med. Chem.* *47*, 5593-5596.
- Caino,M.C., Meshki,J., and Kazanietz,M.G. (2009). Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. *Apoptosis.* *14*, 392-408.
- Cairns,R.A., Harris,I.S., and Mak,T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 85-95.
- Cam,H., Balciunaite,E., Blais,A., Spektor,A., Scarpulla,R.C., Young,R., Kluger,Y., and Dynlacht,B.D. (2004). A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol. Cell* *16*, 399-411.
- Cannon,B. and Nedergaard,J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* *84*, 277-359.
- Chae,H.J., Kang,J.S., Byun,J.O., Han,K.S., Kim,D.U., Oh,S.M., Kim,H.M., Chae,S.W., and Kim,H.R. (2000). Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol. Res.* *42*, 373-381.
- Chakrabarti,P., English,T., Shi,J., Smas,C.M., and Kandror,K.V. (2010). Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* *59*, 775-781.
- Chen,Q. and Ames,B.N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 4130-4134.
- Chevrollier,A., Loiseau,D., Chabi,B., Renier,G., Douay,O., Malthiery,Y., and Stepien,G. (2005). ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J. Bioenerg. Biomembr.* *37*, 307-316.
- Chevrollier,A., Loiseau,D., Reynier,P., and Stepien,G. (2011). Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 562-567.
- Chinopoulos,C., Gerencser,A.A., Mandi,M., Mathe,K., Torocsik,B., Doczi,J., Turiak,L., Kiss,G., Konrad,C., Vajda,S., Vereczki,V., Oh,R.J., and Adam-Vizi,V. (2010). Forward operation of adenine nucleotide translocase during FOF1-ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J.* *24*, 2405-2416.
- Christofk,H.R., Vander Heiden,M.G., Harris,M.H., Ramanathan,A., Gerszten,R.E., Wei,R., Fleming,M.D., Schreiber,S.L., and Cantley,L.C. (2008). The M2 splice

## Bibliografia

isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* *452*, 230-233.

Chung,A.B., Stepien,G., Haraguchi,Y., Li,K., and Wallace,D.C. (1992). Transcriptional control of nuclear genes for the mitochondrial muscle ADP/ATP translocator and the ATP synthase beta subunit. Multiple factors interact with the OXBOX/REBOX promoter sequences. *J. Biol. Chem.* *267*, 21154-21161.

Cillero-Pastor,B., Carames,B., Lires-Dean,M., Vaamonde-Garcia,C., Blanco,F.J., and Lopez-Armada,M.J. (2008). Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *58*, 2409-2419.

Cione,E., Pingitore,A., Genchi,F., and Genchi,G. (2010). Coenzyme A enhances activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 106-112.

Clay Montier,L.L., Deng,J.J., and Bai,Y. (2009). Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J. Genet. Genomics* *36*, 125-131.

Clayton,D.A. (2003). Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB. Life* *55*, 213-217.

Collado,M., Gil,J., Efeyan,A., Guerra,C., Schuhmacher,A.J., Barradas,M., Benguria,A., Zaballos,A., Flores,J.M., Barbacid,M., Beach,D., and Serrano,M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* *436*, 642.

Colombo,S.L., Palacios-Callender,M., Frakich,N., Carcamo,S., Kovacs,I., Tudzarova,S., and Moncada,S. (2011). Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 21069-21074.

Coppe,J.P., Patil,C.K., Rodier,F., Sun,Y., Munoz,D.P., Goldstein,J., Nelson,P.S., Desprez,P.Y., and Campisi,J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS. Biol.* *6*, 2853-2868.

Costantini,P., Belzacq,A.S., Vieira,H.L., Larochette,N., de Pablo,M.A., Zamzami,N., Susin,S.A., Brenner,C., and Kroemer,G. (2000). Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene* *19*, 307-314.

Cozens,A.L., Runswick,M.J., and Walker,J.E. (1989). DNA sequences of two expressed nuclear genes for human mitochondrial ADP/ATP translocase. *J. Mol. Biol.* *206*, 261-280.

Cui,H., Kong,Y., and Zhang,H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J. Signal. Transduct.* *2012*, 646354.

Cunningham,J.T., Rodgers,J.T., Arlow,D.H., Vazquez,F., Mootha,V.K., and Puigserver,P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* *450*, 736-740.

d'Adda di Fagagna F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 512-522.

Das,S., Wong,R., Rajapakse,N., Murphy,E., and Steenbergen,C. (2008). Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circ. Res.* *103*, 983-991.

De Marcos,L.C., Trezeguet,V., Dianoux,A.C., Brandolin,G., and Lauquin,G.J. (2002). The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry* *41*, 14412-14420.

de Marcos-Lousa,C., Sideris,D.P., and Tokatlidis,K. (2006). Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 259-267.

DeBerardinis,R.J., Lum,J.J., Hatzivassiliou,G., and Thompson,C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* *7*, 11-20.

DeBerardinis,R.J. and Thompson,C.B. (2012). Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell* *148*, 1132-1144.

Dejean,L.M., Martinez-Caballero,S., and Kinnally,K.W. (2006). Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell Death. Differ.* *13*, 1387-1395.

Deniaud,A., Brenner,C., and Kroemer,G. (2004). Mitochondrial membrane permeabilization by HIV-1 Vpr. *Mitochondrion.* *4*, 223-233.

Deniaud,E., Baguet,J., Mathieu,A.L., Pages,G., Marvel,J., and Leverrier,Y. (2006). Overexpression of Sp1 transcription factor induces apoptosis. *Oncogene* *25*, 7096-7105.

Desvergne,B., Michalik,L., and Wahli,W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev.* *86*, 465-514.

Desvergne,B. and Wahli,W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* *20*, 649-688.

Doerner,A., Pauschinger,M., Badorff,A., Noutsias,M., Giessen,S., Schulze,K., Bilger,J., Rauch,U., and Schultheiss,H.P. (1997). Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Lett.* *414*, 258-262.



## Bibliografia

Dolce,V., Scarcia,P., Iacopetta,D., and Palmieri,F. (2005). A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett.* *579*, 633-637.

Drgon,T., Sabova,L., Nelson,N., and Kolarov,J. (1991). ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *289*, 159-162.

Duee,E.D. and Vignais,P.V. (1965). [Exchange between extra- and intramitochondrial adenine nucleotides]. *Biochim. Biophys. Acta* *107*, 184-188.

Dufour,C.R., Wilson,B.J., Huss,J.M., Kelly,D.P., Alaynick,W.A., Downes,M., Evans,R.M., Blanchette,M., and Giguere,V. (2007). Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma. *Cell Metab* *5*, 345-356.

Dupont,P.Y. and Stepien,G. (2011). Computational analysis of the transcriptional regulation of the adenine nucleotide translocator isoform 4 gene and its role in spermatozoid glycolytic metabolism. *Gene* *487*, 38-45.

Ellison,J.W., Salido,E.C., and Shapiro,L.J. (1996). Genetic mapping of the adenine nucleotide translocase-2 gene (*Ant2*) to the mouse proximal X chromosome. *Genomics* *36*, 369-371.

Evans,M.J. and Scarpulla,R.C. (1989). Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J. Biol. Chem.* *264*, 14361-14368.

Feng,J., Lucchinetti,E., Enkavi,G., Wang,Y., Gehrig,P., Roschitzki,B., Schaub,M.C., Tajkhorshid,E., Zaugg,K., and Zaugg,M. (2010). Tyrosine phosphorylation by Src within the cavity of the adenine nucleotide translocase 1 regulates ADP/ATP exchange in mitochondria. *Am. J. Physiol Cell Physiol* *298*, C740-C748.

Filomeni,G., Desideri,E., Cardaci,S., Graziani,I., Piccirillo,S., Rotilio,G., and Ciriolo,M.R. (2010). Carcinoma cells activate AMP-activated protein kinase-dependent autophagy as survival response to kaempferol-mediated energetic impairment. *Autophagy*. *6*, 202-216.

Fiore,C., Trezeguet,V., Le,S.A., Roux,P., Schwimmer,C., Dianoux,A.C., Noel,F., Lauquin,G.J., Brandolin,G., and Vignais,P.V. (1998). The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* *80*, 137-150.

Freund,A., Orjalo,A.V., Desprez,P.Y., and Campisi,J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* *16*, 238-246.

Furuta,E., Okuda,H., Kobayashi,A., and Watabe,K. (2010). Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* *1805*, 141-152.

Gallerne,C., Touat,Z., Chen,Z.X., Martel,C., Mayola,E., Sharaf el,d.O., Buron,N., Le,B.M., Jacotot,E., Borgne-Sanchez,A., Lemoine,A., Lemaire,C., Pervaiz,S., and Brenner,C. (2010). The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 623-629.

Gasser,S.M., Daum,G., and Schatz,G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* *257*, 13034-13041.

Gavurnikova,G., Sabova,L., Kissova,I., Haviernik,P., and Kolarov,J. (1996). Transcription of the AAC1 gene encoding an isoform of mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by oxygen in a heme-independent manner. *Eur. J. Biochem.* *239*, 759-763.

Ge,K., Cho,Y.W., Guo,H., Hong,T.B., Guermah,M., Ito,M., Yu,H., Kalkum,M., and Roeder,R.G. (2008). Alternative mechanisms by which mediator subunit MED1/TRAP220 regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma-stimulated adipogenesis and target gene expression. *Mol. Cell Biol.* *28*, 1081-1091.

Gilde,A.J., van der Lee,K.A., Willemsen,P.H., Chinetti,G., van der Leij,F.R., van der Vusse,G.J., Staels,B., and van,B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ. Res.* *92*, 518-524.

Giralt,A., Hondares,E., Villena,J.A., Ribas,F., Diaz-Delfin,J., Giralt,M., Iglesias,R., and Villarroya,F. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype. *J. Biol. Chem.* *286*, 16958-16966.

Giraud,M.F. and Velours,J. (1997). The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho- yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1. *Eur. J. Biochem.* *245*, 813-818.

Giraud,S., Bonod-Bidaud,C., Wesolowski-Louvel,M., and Stepien,G. (1998). Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. *J. Mol. Biol.* *281*, 409-418.

Gleyzer,N., Vercauteren,K., and Scarpulla,R.C. (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol. Cell Biol.* *25*, 1354-1366.

Gonzalez,F. and Ashkenazi,A. (2010). New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* *29*, 4752-4765.

## Bibliografía

Grado,A., Manchado,C., Iglesias,R., Giralto,M., Villarroya,F., Mampel,T., and Vinas,O. (1998). Muscle/heart isoform of mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT1) is transiently expressed during perinatal development in rat liver. *FEBS Lett.* *427*, 213-216.

Graham,B.H., Waymire,K.G., Cottrell,B., Trounce,I.A., MacGregor,G.R., and Wallace,D.C. (1997). A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat. Genet.* *16*, 226-234.

Greiner,E.F., Guppy,M., and Brand,K. (1994). Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. *J. Biol. Chem.* *269*, 31484-31490.

Grontved,L., Madsen,M.S., Boergesen,M., Roeder,R.G., and Mandrup,S. (2010). MED14 tethers mediator to the N-terminal domain of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and is required for full transcriptional activity and adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* *30*, 2155-2169.

Hackenberg,H. and Klingenberg,M. (1980). Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate--adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry* *19*, 548-555.

Halestrap,A.P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell Cardiol.* *46*, 821-831.

Halestrap,A.P. and Brenner,C. (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr. Med. Chem.* *10*, 1507-1525.

Halestrap,A.P. and Davidson,A.M. (1990). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* *268*, 153-160.

Halestrap,A.P. and Pasdois,P. (2009). The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 1402-1415.

Halestrap,A.P., Woodfield,K.Y., and Connern,C.P. (1997). Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* *272*, 3346-3354.

Hammond,S.M., Bernstein,E., Beach,D., and Hannon,G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* *404*, 293-296.

Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hande,K.R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer* *34*, 1514-1521.
- Handschin,C., Lin,J., Rhee,J., Peyer,A.K., Chin,S., Wu,P.H., Meyer,U.A., and Spiegelman,B.M. (2005). Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell* *122*, 505-515.
- Hardie,D.G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* *25*, 1895-1908.
- Hardie,D.G. and Carling,D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* *246*, 259-273.
- Haworth,R.A. and Hunter,D.R. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* *195*, 460-467.
- Herzig,R.P., Scacco,S., and Scarpulla,R.C. (2000). Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* *275*, 13134-13141.
- Hodny,Z., Li,R., Barath,P., and Nelson,B.D. (2000). Sp1 and chromatin environment are important contributors to the formation of repressive chromatin structures on the transfected human adenine nucleotide translocase-2 promoter. *Biochem. J.* *346 Pt 1*, 93-97.
- Hoffmann,B., Stockl,A., Schlame,M., Beyer,K., and Klingenberg,M. (1994). The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *J. Biol. Chem.* *269*, 1940-1944.
- Holt,I.J., Lorimer,H.E., and Jacobs,H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* *100*, 515-524.
- Hondares,E., Pineda-Torra,I., Iglesias,R., Staels,B., Villarroya,F., and Giralt,M. (2007). PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *354*, 1021-1027.
- Hondares,E., Rosell,M., Diaz-Delfin,J., Olmos,Y., Monsalve,M., Iglesias,R., Villarroya,F., and Giralt,M. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J. Biol. Chem.* *286*, 43112-43122.
- Hoppeler,H., Vogt,M., Weibel,E.R., and Fluck,M. (2003). Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp. Physiol* *88*, 109-119.

## Bibliografia

Houten,S.M., Chegary,M., Te,B.H., Wijnen,W.J., Glatz,J.F., Luiken,J.J., Wijburg,F.A., and Wanders,R.J. (2009). Pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is synergistically induced by AMP-activated protein kinase and fatty acids. *Cell Mol. Life Sci.* *66*, 1283-1294.

Hunter,D.R. and Haworth,R.A. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* *195*, 453-459.

Huss,J.M. and Kelly,D.P. (2004). Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ. Res.* *95*, 568-578.

Jang,J.Y., Choi,Y., Jeon,Y.K., Aung,K.C., and Kim,C.W. (2008a). Over-expression of adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) induces apoptosis and tumor regression in vivo. *BMC. Cancer* *8*, 160.

Jang,J.Y., Choi,Y., Jeon,Y.K., and Kim,C.W. (2008b). Suppression of adenine nucleotide translocase-2 by vector-based siRNA in human breast cancer cells induces apoptosis and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res.* *10*, R11.

Jang,J.Y., Jeon,Y.K., Choi,Y., and Kim,C.W. (2010a). Short-hairpin RNA-induced suppression of adenine nucleotide translocase-2 in breast cancer cells restores their susceptibility to TRAIL-induced apoptosis by activating JNK and modulating TRAIL receptor expression. *Mol. Cancer* *9*, 262.

Jang,J.Y., Jeon,Y.K., and Kim,C.W. (2010b). Degradation of HER2/neu by ANT2 shRNA suppresses migration and invasiveness of breast cancer cells. *BMC. Cancer* *10*, 391.

Jang,J.Y., Kim,M.K., Jeon,Y.K., Joung,Y.K., Park,K.D., and Kim,C.W. (2012). Adenovirus adenine nucleotide translocator-2 shRNA effectively induces apoptosis and enhances chemosensitivity by the down-regulation of ABCG2 in breast cancer stem-like cells. *Exp. Mol. Med.* *44*, 251-259.

Jang,J.Y. and Lee,C.E. (2003). Mitochondrial adenine nucleotide translocator 3 is regulated by IL-4 and IFN-gamma via STAT-dependent pathways. *Cell Immunol.* *226*, 11-19.

Jang,J.Y. and Lee,C.E. (2006). IL-4-induced upregulation of adenine nucleotide translocase 3 and its role in Th cell survival from apoptosis. *Cell Immunol.* *241*, 14-25.

Jeon,S.M., Chandel,N.S., and Hay,N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* *485*, 661-665.

Jose,C., Hebert-Chatelain,E., Bellance,N., Larendra,A., Su,M., Nouette-Gaulain,K., and Rossignol,R. (2011). AICAR inhibits cancer cell growth and

triggers cell-type distinct effects on OXPHOS biogenesis, oxidative stress and Akt activation. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 707-718.

Kantrow,S.P. and Piantadosi,C.A. (1997). Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *232*, 669-671.

Kashiwaya,K., Hosokawa,M., Eguchi,H., Ohigashi,H., Ishikawa,O., Shinomura,Y., Nakamura,Y., and Nakagawa,H. (2009). Identification of C2orf18, termed ANT2BP (ANT2-binding protein), as one of the key molecules involved in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Sci.* *100*, 457-464.

Kehoe,S.M., Oka,M., Hankowski,K.E., Reichert,N., Garcia,S., McCarrey,J.R., Gaubatz,S., and Terada,N. (2008). A conserved E2F6-binding element in murine meiosis-specific gene promoters. *Biol. Reprod.* *79*, 921-930.

Keller,H., Dreyer,C., Medin,J., Mahfoudi,A., Ozato,K., and 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*, 2160-2164.

Kersten,S., Desvergne,B., and Wahli,W. (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature* *405*, 421-424.

Kersten,S., Seydoux,J., Peters,J.M., Gonzalez,F.J., Desvergne,B., and Wahli,W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest* *103*, 1489-1498.

Ketting,R.F., Fischer,S.E., Bernstein,E., Sijen,T., Hannon,G.J., and Plasterk,R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* *15*, 2654-2659.

Kim,H.S., Je,J.H., Son,T.G., Park,H.R., Ji,S.T., Pokharel,Y.R., Jeon,H.M., Kang,K.W., Kang,H.S., Chang,S.C., Kim,H.S., Chung,H.Y., and Lee,J. (2012). The hepatoprotective effects of adenine nucleotide translocator-2 against aging and oxidative stress. *Free Radic. Res.* *46*, 21-29.

Klingenberg,M. (1992). Structure-function of the ADP/ATP carrier. *Biochem. Soc. Trans.* *20*, 547-550.

Klingenberg,M. (1993). Dialectics in carrier research: the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *J. Bioenerg. Biomembr.* *25*, 447-457.

Klingenberg,M. (2008). The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 1978-2021.

Kokoszka,J.E., Waymire,K.G., Levy,S.E., Sligh,J.E., Cai,J., Jones,D.P., MacGregor,G.R., and Wallace,D.C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* *427*, 461-465.

## Bibliografia

- Kolarov,J., Kolarova,N., and Nelson,N. (1990). A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J. Biol. Chem.* *265*, 12711-12716.
- Kroemer,G., Galluzzi,L., and Brenner,C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* *87*, 99-163.
- Ku,D.H., Kagan,J., Chen,S.T., Chang,C.D., Baserga,R., and Wurzel,J. (1990). The human fibroblast adenine nucleotide translocator gene. Molecular cloning and sequence. *J. Biol. Chem.* *265*, 16060-16063.
- Kuilman,T., Michaloglou,C., Mooi,W.J., and Peeper,D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* *24*, 2463-2479.
- Lawson,J.E. and Douglas,M.G. (1988). Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and analysis of AAC2. *J. Biol. Chem.* *263*, 14812-14818.
- Le Bras M., Borgne-Sanchez,A., Touat,Z., El Dein,O.S., Deniaud,A., Maillier,E., Lecellier,G., Rebouillat,D., Lemaire,C., Kroemer,G., Jacotot,E., and Brenner,C. (2006). Chemosensitization by knockdown of adenine nucleotide translocase-2. *Cancer Res.* *66*, 9143-9152.
- Lee,J., Schriener,S.E., and Wallace,D.C. (2009). Adenine nucleotide translocator 1 deficiency increases resistance of mouse brain and neurons to excitotoxic insults. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 364-370.
- Lena,A., Rechichi,M., Salvetti,A., Vecchio,D., Evangelista,M., Rainaldi,G., Gremigni,V., and Rossi,L. (2010). The silencing of adenine nucleotide translocase isoform 1 induces oxidative stress and programmed cell death in ADF human glioblastoma cells. *FEBS J.* *277*, 2853-2867.
- Lenka,N., Basu,A., Mullick,J., and Avadhani,N.G. (1996). The role of an E box binding basic helix loop helix protein in the cardiac muscle-specific expression of the rat cytochrome oxidase subunit VIII gene. *J. Biol. Chem.* *271*, 30281-30289.
- Leone,T.C., Weinheimer,C.J., and Kelly,D.P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 7473-7478.
- Lerner,E., Shug,A.L., Elson,C., and Shrago,E. (1972). Reversible inhibition of adenine nucleotide translocation by long chain fatty acyl coenzyme A esters in liver mitochondria of diabetic and hibernating animals. *J. Biol. Chem.* *247*, 1513-1519.
- Leung,A.W., Varanyuwatana,P., and Halestrap,A.P. (2008). The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J. Biol. Chem.* *283*, 26312-26323.

- Levy,S.E., Chen,Y.S., Graham,B.H., and Wallace,D.C. (2000). Expression and sequence analysis of the mouse adenine nucleotide translocase 1 and 2 genes. *Gene* 254, 57-66.
- Li,K., Hodge,J.A., and Wallace,D.C. (1990). OXBOX, a positive transcriptional element of the heart-skeletal muscle ADP/ATP translocator gene. *J. Biol. Chem.* 265, 20585-20588.
- Li,K., Warner,C.K., Hodge,J.A., Minoshima,S., Kudoh,J., Fukuyama,R., Maekawa,M., Shimizu,Y., Shimizu,N., and Wallace,D.C. (1989). A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed. *J. Biol. Chem.* 264, 13998-14004.
- Li,R., Hodny,Z., Luciakova,K., Barath,P., and Nelson,B.D. (1996a). Sp1 activates and inhibits transcription from separate elements in the proximal promoter of the human adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) gene. *J. Biol. Chem.* 271, 18925-18930.
- Li,R., Hodny,Z., Zaid,A., Barath,P., and Nelson,B.D. (1999). AP-2 enhances Sp1-dependent activation of the growth-regulated human ATP/ADP translocator. *J. Biochem.* 126, 130-136.
- Li,R., Luciakova,K., and Nelson,B.D. (1996b). Expression of the human cytochrome c1 gene is controlled through multiple Sp1-binding sites and an initiator region. *Eur. J. Biochem.* 241, 649-656.
- Lin,J., Handschin,C., and Spiegelman,B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1, 361-370.
- Lin,J., Tarr,P.T., Yang,R., Rhee,J., Puigserver,P., Newgard,C.B., and Spiegelman,B.M. (2003). PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 30843-30848.
- Liu,R., Strom,A.L., Zhai,J., Gal,J., Bao,S., Gong,W., and Zhu,H. (2009). Enzymatically inactive adenylate kinase 4 interacts with mitochondrial ADP/ATP translocase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1371-1380.
- Lowry,C.V. and Zitomer,R.S. (1984). Oxygen regulation of anaerobic and aerobic genes mediated by a common factor in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 6129-6133.
- Luciakova,K., Barath,P., Poliakova,D., Persson,A., and Nelson,B.D. (2003). Repression of the human adenine nucleotide translocase-2 gene in growth-arrested human diploid cells: the role of nuclear factor-1. *J. Biol. Chem.* 278, 30624-30633.
- Luciakova,K., Hodny,Z., Barath,P., and Nelson,B.D. (2000). In vivo mapping of the human adenine nucleotide translocator-2 (ANT2) promoter provides support for regulation by a pair of proximal Sp1-activating sites and an upstream silencer element. *Biochem. J.* 352 Pt 2, 519-523.



## Bibliografia

Luciakova,K., Kollarovic,G., Barath,P., and Nelson,B.D. (2008). Growth-dependent repression of human adenine nucleotide translocator-2 (ANT2) transcription: evidence for the participation of Smad and Sp family proteins in the NF1-dependent repressor complex. *Biochem. J.* *412*, 123-130.

Lunardi,J. and Attardi,G. (1991). Differential regulation of expression of the multiple ADP/ATP translocase genes in human cells. *J. Biol. Chem.* *266*, 16534-16540.

Lunardi,J., Hurko,O., Engel,W.K., and Attardi,G. (1992). The multiple ADP/ATP translocase genes are differentially expressed during human muscle development. *J. Biol. Chem.* *267*, 15267-15270.

Luo,Z., Zang,M., and Guo,W. (2010). AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future. Oncol.* *6*, 457-470.

Lynn,E.G., Stevens,M.V., Wong,R.P., Carabenciov,D., Jacobson,J., Murphy,E., and Sack,M.N. (2010). Transient upregulation of PGC-1alpha diminishes cardiac ischemia tolerance via upregulation of ANT1. *J. Mol. Cell Cardiol.* *49*, 693-698.

Madesh,M. and Hajnoczky,G. (2001). VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell Biol.* *155*, 1003-1015.

Maga,G. and Hubscher,U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* *116*, 3051-3060.

Malik,S. and Roeder,R.G. (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 256-263.

Malorni,W., Farrace,M.G., Matarrese,P., Tinari,A., Ciarlo,L., Mousavi-Shafaei,P., D'Eletto,M., Di,G.G., Melino,G., Palmieri,L., Rodolfo,C., and Piacentini,M. (2009). The adenine nucleotide translocator 1 acts as a type 2 transglutaminase substrate: implications for mitochondrial-dependent apoptosis. *Cell Death. Differ.* *16*, 1480-1492.

Mandard,S., Muller,M., and Kersten,S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol. Life Sci.* *61*, 393-416.

Margulis, L. Origin of eukaryotic cells. 1970. New Haven, CT, Yale University Press.

Ref Type: Generic

Margulis, L. Symbiosis in cell evolution. 1981. San Francisco, CA, Freeman.

Ref Type: Generic

Marzo,I., Brenner,C., Zamzami,N., Susin,S.A., Beutner,G., Brdiczka,D., Remy,R., Xie,Z.H., Reed,J.C., and Kroemer,G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* *187*, 1261-1271.

- McIntyre,G.J. and Fanning,G.C. (2006). Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC. Biotechnol.* *6*, 1.
- McStay,G.P., Clarke,S.J., and Halestrap,A.P. (2002). Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem. J.* *367*, 541-548.
- Mills,K.A., Ellison,J.W., and Mathews,K.D. (1996). The Ant1 gene maps near Klk3 on proximal mouse chromosome 8. *Mamm. Genome* *7*, 707.
- Mitchell,P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *41*, 445-502.
- Moncada,S., Higgs,E.A., and Colombo,S.L. (2012). Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem. J.* *446*, 1-7.
- Mootha,V.K., Handschin,C., Arlow,D., Xie,X., St,P.J., Sihag,S., Yang,W., Altshuler,D., Puigserver,P., Patterson,N., Willy,P.J., Schulman,I.G., Heyman,R.A., Lander,E.S., and Spiegelman,B.M. (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 6570-6575.
- Murdock,D.G., Boone,B.E., Esposito,L.A., and Wallace,D.C. (1999). Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *J. Biol. Chem.* *274*, 14429-14433.
- Nadtochiy,S.M., Zhu,Q., Urciuoli,W., Rafikov,R., Black,S.M., and Brookes,P.S. (2012). Nitroalkenes confer acute cardioprotection via adenine nucleotide translocase 1. *J. Biol. Chem.* *287*, 3573-3580.
- Nasrin,N., Wu,X., Fortier,E., Feng,Y., Bare'O.C., Chen,S., Ren,X., Wu,Z., Streeper,R.S., and Bordone,L. (2010). SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 31995-32002.
- Nichol,D., Christian,M., Steel,J.H., White,R., and Parker,M.G. (2006). RIP140 expression is stimulated by estrogen-related receptor alpha during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *281*, 32140-32147.
- Notario,B., Zamora,M., Vinas,O., and Mampel,T. (2003). All-trans-retinoic acid binds to and inhibits adenine nucleotide translocase and induces mitochondrial permeability transition. *Mol. Pharmacol.* *63*, 224-231.
- Novgorodov,S.A., Gudz,T.I., Jung,D.W., and Brierley,G.P. (1991). The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *180*, 33-38.

## Bibliografia

Nury,H., Dahout-Gonzalez,C., Trezeguet,V., Lauquin,G., Brandolin,G., and Pebay-Peyroula,E. (2005). Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett.* *579*, 6031-6036.

Nykanen,A., Haley,B., and Zamore,P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* *107*, 309-321.

Pallet,N., Thervet,E., Le,C.D., Knebelmann,B., Nusbaum,P., Tomkiewicz,C., Meria,P., Flinois,J.P., Beaune,P., Legendre,C., and Anglicheau,D. (2005). Rapamycin inhibits human renal epithelial cell proliferation: effect on cyclin D3 mRNA expression and stability. *Kidney Int.* *67*, 2422-2433.

Palmieri,F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch.* *447*, 689-709.

Palmieri,F. and Pierri,C.L. (2010). Mitochondrial metabolite transport. *Essays Biochem.* *47*, 37-52.

Palmieri,L., Alberio,S., Pisano,I., Lodi,T., Meznaric-Petrusa,M., Zidar,J., Santoro,A., Scarcia,P., Fontanesi,F., Lamantea,E., Ferrero,I., and Zeviani,M. (2005). Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3079-3088.

Pande,S.V. and Blanchaer,M.C. (1971). Reversible inhibition of mitochondrial adenosine diphosphate phosphorylation by long chain acyl coenzyme A esters. *J. Biol. Chem.* *246*, 402-411.

Pardo,R., Enguix,N., Lasheras,J., Feliu,J.E., Kralli,A., and Villena,J.A. (2011). Rosiglitazone-induced mitochondrial biogenesis in white adipose tissue is independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *PLoS. One.* *6*, e26989.

Pebay-Peyroula,E., Dahout-Gonzalez,C., Kahn,R., Trezeguet,V., Lauquin,G.J., and Brandolin,G. (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* *426*, 39-44.

Pelicano,H., Martin,D.S., Xu,R.H., and Huang,P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* *25*, 4633-4646.

Peng,T., Golub,T.R., and Sabatini,D.M. (2002). The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol. Cell Biol.* *22*, 5575-5584.

Petronilli,V., Cola,C., and Bernardi,P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* *268*, 1011-1016.

Pfaff,E., Heldt,H.W., and Klingenberg,M. (1969). Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Kinetics of the adenine nucleotide exchange. *Eur. J. Biochem.* *10*, 484-493.

Pfaff,E. and Klingenberg,M. (1968). Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control. *Eur. J. Biochem.* *6*, 66-79.

Pfaff,E., Klingenberg,M., and Heldt,H.W. (1965). Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *104*, 312-315.

Pilegaard,H., Saltin,B., and Neufer,P.D. (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J. Physiol* *546*, 851-858.

Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* *92*, 829-839.

Queiroga,C.S., Almeida,A.S., Martel,C., Brenner,C., Alves,P.M., and Vieira,H.L. (2010). Glutathionylation of adenine nucleotide translocase induced by carbon monoxide prevents mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *J. Biol. Chem.* *285*, 17077-17088.

Radichev,I.A., Remacle,A.G., Sounni,N.E., Shiryaev,S.A., Rozanov,D.V., Zhu,W., Golubkova,N.V., Postnova,T.I., Golubkov,V.S., and Strongin,A.Y. (2009). Biochemical evidence of the interactions of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) with adenine nucleotide translocator (ANT): potential implications linking proteolysis with energy metabolism in cancer cells. *Biochem. J.* *420*, 37-47.

Ranhotra,H.S. (2009). Up-regulation of orphan nuclear estrogen-related receptor alpha expression during long-term caloric restriction in mice. *Mol. Cell Biochem.* *332*, 59-65.

Rasmussen,J.T., Rosendal,J., and Knudsen,J. (1993). Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. *Biochem. J.* *292 (Pt 3)*, 907-913.

Ravikumar,B., Sarkar,S., Davies,J.E., Futter,M., Garcia-Arencibia,M., Green-Thompson,Z.W., Jimenez-Sanchez,M., Korolchuk,V.I., Lichtenberg,M., Luo,S., Massey,D.C., Menzies,F.M., Moreau,K., Narayanan,U., Renna,M., Siddiqi,F.H., Underwood,B.R., Winslow,A.R., and Rubinsztein,D.C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* *90*, 1383-1435.

Reichert,A.S. and Neupert,W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet.* *20*, 555-562.

## Bibliografia

Rieusset,J., Touri,F., Michalik,L., Escher,P., Desvergne,B., Niesor,E., and Wahli,W. (2002). A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2628-2644.

Rigoulet,M., Yoboue,E.D., and Devin,A. (2011). Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. *Antioxid. Redox. Signal.* *14*, 459-468.

Rodic,N., Oka,M., Hamazaki,T., Murawski,M.R., Jorgensen,M., Maatouk,D.M., Resnick,J.L., Li,E., and Terada,N. (2005). DNA methylation is required for silencing of ant4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells* *23*, 1314-1323.

Rajo,G., Chamorro,M., Salas,M.L., Vinuela,E., Cuezva,J.M., and Salas,J. (1998). Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J. Virol.* *72*, 7583-7588.

Rong,J.X., Klein,J.L., Qiu,Y., Xie,M., Johnson,J.H., Waters,K.M., Zhang,V., Kashatus,J.A., Remlinger,K.S., Bing,N., Crosby,R.M., Jackson,T.K., Witherspoon,S.M., Moore,J.T., Ryan,T.E., Neill,S.D., and Strum,J.C. (2011). Rosiglitazone Induces Mitochondrial Biogenesis in Differentiated Murine 3T3-L1 and C3H/10T1/2 Adipocytes. *PPAR. Res.* *2011*, 179454.

Rotig,A. (2011). Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 1198-1205.

Runswick,M.J., Powell,S.J., Nyren,P., and Walker,J.E. (1987). Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein. *EMBO J.* *6*, 1367-1373.

Saab,R. (2011). Senescence and pre-malignancy: how do tumors progress? *Semin. Cancer Biol.* *21*, 385-391.

Sabova,L., Zeman,I., Supek,F., and Kolarov,J. (1993). Transcriptional control of AAC3 gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen, heme and ROX1 factor. *Eur. J. Biochem.* *213*, 547-553.

Scarpulla,R.C. (1997). Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* *29*, 109-119.

Scarpulla,R.C. (2002a). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1576*, 1-14.

Scarpulla,R.C. (2002b). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* *286*, 81-89.

Scarpulla,R.C. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* *88*, 611-638.

- Schiebel,K., Mertz,A., Winkelmann,M., Nagaraja,R., and Rappold,G. (1994). Localization of the adenine nucleotide translocase gene ANT2 to chromosome Xq24-q25 with tight linkage to DXS425. *Genomics* *24*, 605-606.
- Schlattner,U., Tokarska-Schlattner,M., and Wallimann,T. (2006). Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1762*, 164-180.
- Schleyer,M., Schmidt,B., and Neupert,W. (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur. J. Biochem.* *125*, 109-116.
- Schon,E.A. and Gilkerson,R.W. (2010). Functional complementation of mitochondrial DNAs: mobilizing mitochondrial genetics against dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* *1800*, 245-249.
- Schreiber,S.N., Emter,R., Hock,M.B., Knutti,D., Cardenas,J., Podvinec,M., Oakeley,E.J., and Kralli,A. (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 6472-6477.
- Schultz,B.E. and Chan,S.I. (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *30*, 23-65.
- Sherr,C.J. and DePinho,R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* *102*, 407-410.
- Shoshan-Barmatz,V., De,P., V, Zweckstetter,M., Raviv,Z., Keinan,N., and Arbel,N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects Med.* *31*, 227-285.
- Shug,A.L. and Shrago,E. (1973). Inhibition of phosphoenolpyruvate transport via the tricarboxylate and adenine nucleotide carrier systems of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *53*, 659-665.
- Sicheritz-Ponten,T., Kurland,C.G., and Andersson,S.G. (1998). A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae. *Biochim. Biophys. Acta* *1365*, 545-551.
- Siekevitz,P. and POTTER,V.R. (1955). Biochemical structure of mitochondria. II. Radioactive labeling of intra-mitochondrial nucleotides during oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *215*, 237-255.
- Skarka,L., Bardova,K., Brauner,P., Flachs,P., Jarkovska,D., Kopecky,J., and Ostadal,B. (2003). Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and adenine nucleotide translocase 1 genes in developing rat heart: putative involvement in control of mitochondrial membrane potential. *J. Mol. Cell Cardiol.* *35*, 321-330.

## Bibliografia

- Slim,R., Levilliers,J., Ludecke,H.J., Claussen,U., Nguyen,V.C., Gough,N.M., Horsthemke,B., and Petit,C. (1993). A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes X-inactivation. *Genomics* *16*, 26-33.
- Smith,C.P. and Thorsness,P.E. (2008). The molecular basis for relative physiological functionality of the ADP/ATP carrier isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *179*, 1285-1299.
- Solaini,G., Sgarbi,G., and Baracca,A. (2011). Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 534-542.
- Spiegelman,B.M., Choy,L., Hotamisligil,G.S., Graves,R.A., and Tontonoz,P. (1993). Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J. Biol. Chem.* *268*, 6823-6826.
- Spiegelman,B.M., Puigserver,P., and Wu,Z. (2000). Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *24 Suppl 4*, S8-10.
- Srinivasula,S.M., Datta,P., Fan,X.J., Fernandes-Alnemri,T., Huang,Z., and Alnemri,E.S. (2000). Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J. Biol. Chem.* *275*, 36152-36157.
- St-Pierre,J., Lin,J., Krauss,S., Tarr,P.T., Yang,R., Newgard,C.B., and Spiegelman,B.M. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 26597-26603.
- Stepien,G., Torroni,A., Chung,A.B., Hodge,J.A., and Wallace,D.C. (1992). Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* *267*, 14592-14597.
- Stockl,P., Hutter,E., Zwerschke,W., and Jansen-Durr,P. (2006). Sustained inhibition of oxidative phosphorylation impairs cell proliferation and induces premature senescence in human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* *41*, 674-682.
- Sugden,M.C. and Holness,M.J. (2003). Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *284*, E855-E862.
- Suzuki,Y., Imai,Y., Nakayama,H., Takahashi,K., Takio,K., and Takahashi,R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* *8*, 613-621.
- Taanman,J.W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* *1410*, 103-123.

Tahanian,E., Peiro,S., and Annabi,B. (2011). Low intracellular ATP levels exacerbate carcinogen-induced inflammatory stress response and inhibit in vitro tubulogenesis in human brain endothelial cells. *J. Inflamm. Res.* *4*, 1-10.

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., and 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*, 15924-15929.

Taylor,R.C., Cullen,S.P., and Martin,S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 231-241.

Thonberg,H., Fredriksson,J.M., Nedergaard,J., and Cannon,B. (2002). A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem. J.* *364*, 73-79.

Tontonoz,P., Hu,E., and Spiegelman,B.M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* *79*, 1147-1156.

Tontonoz,P. and Spiegelman,B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 289-312.

Trezeguet,V., Pelosi,L., Lauquin,G.J., and Brandolin,G. (2008). The mitochondrial ADP/ATP carrier: functional and structural studies in the route of elucidating pathophysiological aspects. *J. Bioenerg. Biomembr.* *40*, 435-443.

Tschopp,J. (2011). Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur. J. Immunol.* *41*, 1196-1202.

Vaamonde-Garcia,C., Riveiro-Naveira,R.R., Valcarcel-Ares,M.N., Hermida-Carballo,L., Blanco,F.J., and Lopez-Armada,M.J. (2012). Mitochondrial dysfunction increases the inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.*

van Waveren,C. and Moraes,C.T. (2008). Transcriptional co-expression and co-regulation of genes coding for components of the oxidative phosphorylation system. *BMC. Genomics* *9*, 18.

Vanacker,J.M., Bonnelye,E., Chopin-Delannoy,S., Delmarre,C., Cavailles,V., and Laudet,V. (1999a). Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR alpha (estrogen receptor-related receptor-alpha). *Mol. Endocrinol.* *13*, 764-773.

Vanacker,J.M., Pettersson,K., Gustafsson,J.A., and Laudet,V. (1999b). Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J.* *18*, 4270-4279.



## Bibliografia

- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* *324*, 1029-1033.
- Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol. Cell Biol.* *20*, 1868-1876.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc. Res.* *79*, 208-217.
- Villena, J.A. and Kralli, A. (2008). ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol. Metab* *19*, 269-276.
- Virbasius, J.V. and Scarpulla, R.C. (1991). Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol. Cell Biol.* *11*, 5631-5638.
- Visser, W., van der Baan, A.A., Batenburg-van der Vegte, W., Scheffers, W.A., Kramer, R., and van Dijken, J.P. (1994). Involvement of mitochondria in the assimilatory metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* cultures. *Microbiology* *140 (Pt 11)*, 3039-3046.
- Visser, W.F., van Roermund, C.W., Waterham, H.R., and Wanders, R.J. (2002). Identification of human PMP34 as a peroxisomal ATP transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *299*, 494-497.
- von, Z.T., Saretzki, G., Docke, W., and Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* *220*, 186-193.
- Walker, J.E. and Runswick, M.J. (1993). The mitochondrial transport protein superfamily. *J. Bioenerg. Biomembr.* *25*, 435-446.
- Wallace, D.C. (1989). Report of the committee on human mitochondrial DNA. *Cytogenet. Cell Genet.* *51*, 612-621.
- Wang, W., Yang, X., Lopez, d.S., I, Carling, D., and Gorospe, M. (2003). Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function. *J. Biol. Chem.* *278*, 27016-27023.
- Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS. Biol.* *2*, e294.
- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* *124*, 269-270.

- Warburg,O. (1956b). On the origin of cancer cells. *Science* *123*, 309-314.
- Weber,K., Ridderskamp,D., Alfert,M., Hoyer,S., and Wiesner,R.J. (2002). Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells. *Biol. Chem.* *383*, 283-290.
- Weitzel,J.M., Iwen,K.A., and Seitz,H.J. (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp. Physiol* *88*, 121-128.
- Wijmenga,C., Winokur,S.T., Padberg,G.W., Skraastad,M.I., Altherr,M.R., Wasmuth,J.J., Murray,J.C., Hofker,M.H., and Frants,R.R. (1993). The human skeletal muscle adenine nucleotide translocator gene maps to chromosome 4q35 in the region of the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus. *Hum. Genet.* *92*, 198-203.
- Won,J.C., Park,J.Y., Kim,Y.M., Koh,E.H., Seol,S., Jeon,B.H., Han,J., Kim,J.R., Park,T.S., Choi,C.S., Lee,W.J., Kim,M.S., Lee,I.K., Youn,J.H., and Lee,K.U. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha overexpression prevents endothelial apoptosis by increasing ATP/ADP translocase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 290-297.
- Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* *98*, 115-124.
- Xu,C., Bailly-Maitre,B., and Reed,J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest* *115*, 2656-2664.
- Yan,L.J. and Sohal,R.S. (1998). Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 12896-12901.
- Yang,Z., Cheng,W., Hong,L., Chen,W., Wang,Y., Lin,S., Han,J., Zhou,H., and Gu,J. (2007). Adenine nucleotide (ADP/ATP) translocase 3 participates in the tumor necrosis factor induced apoptosis of MCF-7 cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 4681-4689.
- Youle,R.J. and Strasser,A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 47-59.
- Zaid,A., Hodny,Z., Li,R., and Nelson,B.D. (2001). Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter. *Eur. J. Biochem.* *268*, 5497-5503.
- Zaid,A., Li,R., Luciakova,K., Barath,P., Nery,S., and Nelson,B.D. (1999). On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J. Bioenerg. Biomembr.* *31*, 129-135.

## Bibliografia

Zamora,M., Granell,M., Mampel,T., and Vinas,O. (2004a). Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Lett.* *563*, 155-160.

Zamora,M., Merono,C., Vinas,O., and Mampel,T. (2004b). Recruitment of NF-kappaB into mitochondria is involved in adenine nucleotide translocase 1 (ANT1)-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 38415-38423.

Zamora,M., Ortega,J.A., Alana,L., Vinas,O., and Mampel,T. (2006). Apoptotic and anti-proliferative effects of all-trans retinoic acid. Adenine nucleotide translocase sensitizes HeLa cells to all-trans retinoic acid. *Exp. Cell Res.* *312*, 1813-1819.

Zwerschke,W., Mazurek,S., Stockl,P., Hutter,E., Eigenbrodt,E., and Jansen-Durr,P. (2003). Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem. J.* *376*, 403-411.