



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulació posttraduccional de l'alanina aminotransferasa mitjançant mecanismes d'interacció proteïna-proteïna

Marina Giralt Lladós

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)

REGULACIÓ POSTTRADUCCIONAL DE L'ALANINA AMINOTRANSFERASA MITJANÇANT MECANISMES D'INTERACCIÓ PROTEÏNA-PROTEÏNA

Marina Giralt Lladós

2015



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOTECNOLOGIA

**REGULACIÓ POSTTRADUCCIONAL DE L'ALANINA
AMINOTRANSFERASA MITJANÇANT MECANISMES
D'INTERACCIÓ PROTEÏNA-PROTEÏNA**

Memòria presentada per Marina Giralt Lladós per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directors:

Autora:

Isabel Vázquez Baanante

Isidoro Metón Teijeiro

Marina Giralt Lladós

Marina Giralt Lladós

2015

*“Si vols arribar aviat, camina sol,
si vols arribar lluny, camina acompanyat.”*

proverbi africà

AGRAÏMENTS

Sembla mentida com passa el temps... Encara recordo quan vaig començar, en un raconet del laboratori, al costat de la pica. En aquella època érem uns quants al laboratori, i havíem de compartir el lloc com podíem. Es podria dir que he progressat, ja que al final de la tesi he tingut un lloc privilegiat, amb fàcil accés als aparells, i amb més superfície de la que podria abastir amb els dos braços. Però no només això ha canviat en aquests sis anys. Molta gent ha passat pel laboratori, i molts experiments s'han dut a terme. Les persones amb qui m'he anat trobant m'han ajudat a créixer, i els experiments (sobretot els que no han sortit com s'esperava) m'han ajudat a ser tenaç.

En aquest sentit voldria agrair especialment als directors de tesi, Dra. Isabel Vázquez i Dr. Isidoro Metón, per tot el suport que m'han donat aquests anys. Amb els seus coneixements m'han guiat i assessorat sempre que ho he necessitat, i han demostrat ésser unes grans persones, amb qui es pot parlar i discutir.

Els meus primers companys de laboratori em van ensenyar com funcionava tot per allà. Recordo aquella època amb especial nostàlgia. Vam treballar molt, però també ens ho vam passar molt bé. Amb la Ginny vaig passar poc temps, però em va guiar en alguns experiments inicials de biologia molecular.

El Diego i la Mari han estat els meus mentors, i la manera com treballa en el laboratori és un trosset de cada un. El Diego em va ensenyar a modelar el caràcter, i em va ajudar a fer-me valer. També vaig poder veure una altra manera de treballar, que més tard hem anomenat ciència *free-style*... Amb la Mari ens ho hem passat genial. És una persona molt empàtica, graciosa, i enormement treballadora i responsable. I que també et deixa fora de joc amb les seves preguntes sorprenents. Ella m'ha ensenyat tot el que sé de com treballar amb cultius cel·lulars, i m'he quedat amb molts dels seus truquets. Només he trobat a faltar treballar en algun projecte juntes, segurament hauria sortit quelcom interessant.

Amb la Lluç i el Vittorio vam compartir part del treball inicial amb llevats, i vam patir junts les interminables transfeccions, els grans erlenmeyers amb litres i litres de medi, i les infinites columnes de plaques de cultiu.

I com oblidar els grans companys que he tingut en aquest temps. L'Ivan és una persona molt professional, amb els objectius molt clars, metòdic i organitzat. És un gran entusiasta de la bona música i les sèries. En versió original. Sempre. Indiscutible. L'Albert va donar el contrapunt humorístic al grup, i hem pogut parlar de molts temes. Té un enorme coneixement del cultiu de peixos, de la història universal... i dels acudits dolents, que són els millors. L'Alberto, que al final s'ha doctorat abans que jo, ha après un munt de coses amb temps rècord. L'admiro molt per la seva tenacitat i ganes de treballar. El Jonás ens va sorprendre a tots amb el seu discurs polític. Hem compartit part dels estudis d'interacció, i m'ha ajudat molt en la última fase dels experiments.

També voldria mencionar a tota la gent de treballs dirigits, màsters, i treballs experimentals en general, a qui he guiat en algun moment o altre. Anna A., Anna P., Anna S., Loly, Anne, Irene, Anna F., Andrea. Sí, moltes Annes, espero no haver-me'n deixat cap. Més d'una sap què vol dir

tornar-se cega al microscopi confocal. Estic especialment agraïda a la Isadora, amb qui potser vaig passar més temps, i amb qui vam fer hipotètics plans de negoci futurs. I a la resta de gent que ha passat pel laboratori, amb qui no he compartit experiments però sí moltes estones: Fabio, Ana, Ahmad, Sedigheh, Aline, João i Carlos.

He de fer una menció especial a les desenes d'orades que s'han sacrificat enormement perquè el treball donés els seus fruits. I als milions de cèl·lules que han fet possible els diferents experiments. I ja que hi som, també voldran aparèixer els llevats, i els nostres amics els bacteris, que sempre estan per tot arreu. I hem de recordar també a Sseboya felis, la ceba que vam plantar amb la Mari però que mai va arribar a florir, a Peludochi I, el cactus desaparegut en estranyes circumstàncies, i a Peludochi II, el seu successor, que sense saber ben bé com, encara resisteix.

M'agradaria mostrar el meu aprecí a la resta de grups del departament, tant als directors de tesi, professors, com als companys. És un plaer creuar-se amb tots vosaltres pel passadís, i compartir la cua al microones i la cafetera. Fins i tot netejar la sala de cèl·lules!

Dono les gràcies també als tècnics de laboratori, Sílvia, Andrés i Quim. Ells fan possible que tinguem els aparells llestos per poder treballar, i els diferents recursos a punt. El personal administratiu, M. Carmen, Brugués i Assumpta, també ens ha fet la feina molt més fàcil. Sempre atentes a qualsevol pregunta que teníem, ens han ajudat amb tasques de gestió de comandes, i de diferents recursos personals.

A la meva amiga M. Àngels, amb qui he compartit les penes i glòries d'això que se'n diu "*fer un doctorat*". Quantíssimes converses hem tingut sobre el tema, en els bons i en els mals moments. Ens hem anat animant mútuament, i defensarem la tesi gairebé al mateix temps. Et desitjo molta sort en el teu gran dia!

I finalment, gràcies a la família. A la meva mare, germana, avi i iaia, que a l'inici em preguntaven "*Com va?*" i en els últims mesos "*Encara no has acabat? Però acaba, eh?*". M'han anat recordant els esforços que he fet durant aquests anys, i per què val la pena acabar el què es comença.

Estic especialment agraïda al Bernat. Ha estat un gran suport al llarg de tots aquests anys, intentant entendre què és una PCR, i per què no s'acaben mai els experiments. No oblidaré el seu gran *planning* per escriure la tesi en un mes: només vaig poder complir-lo parcialment, però em va ajudar moltíssim.

I a la Núria, la meva filla, amb qui he compartit l'escriptura de la memòria de la tesi.

Moltes gràcies a tots.

ÍNDEX

I. LLISTAT D'ABREVIATURES	I
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1 Metabolisme de carbohidrats en peixos.....	1
1.1.1 Peixos carnívors com a model d'intolerància a la glucosa	1
1.1.2 Regulació nutricional de la glicòlisi i gluconeogènesi en peixos	4
1.1.2.1 Regulació nutricional en situacions de dejú.....	5
1.1.2.2 Regulació nutricional en situacions d'alimentació amb alt contingut en carbohidrats	7
1.2 Metabolisme de proteïnes en peixos.....	9
1.2.1 Funcions dels aminoàcids.....	9
1.2.2 Digestió i absorció d'aminoàcids.....	11
1.2.3 Catabolisme d'aminoàcids. Origen de l'amoni excretat.....	12
1.2.3.1 Vies de desaminació	12
1.2.4 Gluconeogènesi a partir d'aminoàcids.....	14
1.3 Alanina aminotransferasa	16
1.3.1 Isoformes de l'ALT.....	19
1.3.2 Característiques cinètiques de l'ALT	22
1.3.3 Estructura i inhibidors	24
1.3.4 Regulació nutricional de l'expressió d'ALT.....	26
1.3.5 Regulació transcripcional de l'expressió gènica.....	28
1.3.6 Implicacions clíniques.....	29
1.3.6.1 Increment de l'activitat ALT en sèrum: causes hepàtiques.....	29
1.3.6.2 Increment de l'activitat ALT en sèrum: causes no hepàtiques.....	30
1.4 El sistema immunitari innat en peixos	32
1.4.1 Receptors de patrons de reconeixement.....	32
1.4.2 Molècules del complement.....	33
1.4.3 Pèptids antimicrobians.....	34
1.4.4 Citocines.....	35
1.4.5 Lectines	35
1.5 Secreció de proteïnes.....	37
1.5.1 Mecanisme de secreció de vesícules.....	39
1.5.1.1 Paper de les proteïnes de recobriment en la gemmació vesicular i la selecció de la càrrega: importància del pèptid senyal.....	40
1.5.1.2 Les proteïnes SNARE en la fusió vesicular.....	42
2. OBJECTIUS.....	47

3. MATERIALS I MÈTODES	51
3.1 Animals utilitzats en l'experimentació.....	51
3.1.1 Manipulació dels animals i presa de mostres	51
3.1.1.1 Passos preliminars: anestèsia dels peixos.....	53
3.1.1.2 Tractament amb injecció intraperitoneal.....	53
3.1.1.3 Sacrifici i presa de mostres	53
3.1.2 Administració de lipopolisacàrid	53
3.2 Oligonucleòtids.....	54
3.2.1 Oligonucleòtids per a clonatge a pGBKT7	54
3.2.2 Oligonucleòtids per a RACE.....	54
3.2.3 Oligonucleòtids per a clonatge a pGEM-T easy.....	55
3.2.4 Oligonucleòtids per a clonatge en vectors fluorescents	55
3.2.5 Oligonucleòtids per a clonatge a pcDNA3.....	56
3.2.6 Oligonucleòtids per a seqüenciació de vectors.....	56
3.2.7 Oligonucleòtids per a qRT-PCR.....	56
3.3 Plasmidis.....	57
3.3.1 Vectors comercials	57
3.3.2 Constructes obtinguts	58
3.4 Tècniques de biologia molecular.....	60
3.4.1 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	60
3.4.2 Purificació i quantificació de DNA	62
3.4.3 Electroforesi de DNA	62
3.4.4 Digestió de DNA per restricció enzimàtica.....	64
3.4.5 Conversió d'extrems de DNA protuberants en roms	64
3.4.5.1 Conversió d'extrems 5' protuberants en roms (fill-in).....	64
3.4.5.2 Conversió d'extrems 3' protuberants en roms (chew-back i fill-in)	65
3.4.6 Defosforilació de vectors.....	65
3.4.7 Hibridació d'oligonucleòtids.....	65
3.4.8 Lligació de DNA	66
3.4.9 Transformació de cèl·lules bacterianes.....	66
3.4.9.1 Soques utilitzades	66
3.4.9.2 Medis de cultiu	67
3.4.9.3 Obtenció de cèl·lules <i>E. coli</i> competents.....	67
3.4.9.4 Transformació per xoc tèrmic.....	67
3.4.10 Obtenció de DNA plasmídic.....	68
3.4.11 Concentració de DNA plasmídic.....	68

3.4.12	Seqüenciació de DNA	69
3.4.13	Anàlisi bioinformàtica i introducció de seqüències en bases de dades	69
3.4.14	Amplificació d'extrems de cDNA per RACE-PCR.....	70
3.4.14.1	<i>Disseny d'oligonucleòtids</i>	72
3.4.14.2	<i>Tractament de l'RNA amb fosfatasa alcalina per 5' RLM-RACE.....</i>	72
3.4.14.3	<i>Purificació de l'RNA</i>	72
3.4.14.4	<i>Tractament de l'RNA amb fosfatasa àcida</i>	73
3.4.14.5	<i>Lligació de l'adaptador 5' RACE.....</i>	73
3.4.14.6	<i>Transcripció inversa per 5' RLM-RACE.....</i>	73
3.4.14.7	<i>PCR extern per 5' RLM-RACE.....</i>	74
3.4.14.8	<i>PCR intern per 5' RLM-RACE</i>	74
3.4.14.9	<i>Transcripció inversa per 3'-RACE</i>	74
3.4.14.10	<i>PCR extern per 3' RLM-RACE.....</i>	75
3.4.15	RT-PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR).....	75
3.4.15.1	<i>Aïllament d'RNA</i>	76
3.4.15.2	<i>Transcripció inversa de l'RNA (RT).....</i>	76
3.4.15.3	<i>PCR quantitativa a temps real (qPCR)</i>	76
3.5	Tècniques de cultiu de llevats – assaig de doble híbrid	78
3.5.1	Soques de llevat utilitzades.....	79
3.5.2	Medis i solucions utilitzades.....	80
3.5.2	Tests previs a l'assaig de doble híbrid	81
3.5.2.1	<i>Test d'activació transcripcional del DNA-BD de fusió.....</i>	82
3.5.2.2	<i>Test de toxicitat del DNA-BD de fusió.....</i>	82
3.5.3	Construcció de la biblioteca de cDNA de fetge d'orada.....	82
3.5.4	Preparació de cèl·lules de llevat competents.....	83
3.5.5	Transformació de llevats a petita escala	83
3.5.6	Cribatge de la biblioteca per aparellament de llevats.....	84
3.5.6.1	<i>Transformació de la soca AH109 amb el cDNA de doble cadena (ds cDNA) i el vector pGADT7-Rec.....</i>	84
3.5.6.2	<i>Selecció dels transformants en plaques SDM/-Leu.....</i>	84
3.5.6.3	<i>Recollida dels transformants</i>	85
3.5.6.4	<i>Aparellament de la soca de la biblioteca (presa) amb la soca esquer.....</i>	85
3.5.6.5	<i>Selecció dels llevats diploides que expressen les proteïnes amb potencial d'interacció</i>	85
3.5.6.6	<i>Càlcul de l'eficiència de l'aparellament i el nombre de colònies cribades</i>	86
3.5.7	Anàlisi de les interaccions positives	86
3.5.7.1	<i>Recuperació de l'insert de cDNA de la biblioteca assajada</i>	86

3.6	Tècniques de cultiu de línies cel·lulars	87
3.6.1	Línies cel·lulars utilitzades	87
3.6.2	Medis i reactius	88
3.6.3	Arrencada, manteniment i congelació de cultius cel·lulars	88
3.6.3.1	<i>Arrencada del cultiu cel·lular</i>	88
3.6.3.2	<i>Manteniment del cultiu: tripsinització</i>	88
3.6.3.3	<i>Congelació del cultiu cel·lular</i>	89
3.6.4	Transfecció transitòria de cèl·lules.....	89
3.6.4.1	<i>Transfecció pel mètode del fosfat càlcic</i>	89
3.6.4.2	<i>Transfecció mitjançant l'agent de transfecció Turbofect</i>	90
3.6.5	Anàlisi de l'activitat enzimàtica en extractes cel·lulars	90
3.6.5.1	<i>Obtenció dels extractes cel·lulars</i>	90
3.6.5.2	<i>Assaig de β-galactosidasa</i>	91
3.6.6	Muntatge de cèl·lules per visualització en microscopi confocal	92
3.6.6.1	<i>Sembra</i>	92
3.6.6.2	<i>Recol·lecció</i>	92
3.6.6.3	<i>Muntatge al portaobjectes</i>	92
3.6.7	Detecció d'estructures subcel·lulars	93
3.6.7.1	<i>Marcatge subcel·lular amb rastrejadors</i>	93
3.6.7.2	<i>Marcatge subcel·lular amb anticossos: immunodetecció</i>	94
3.6.8	FRET.....	95
3.6.8.1	<i>Cromòfors utilitzats i metodologia general</i>	96
3.6.8.2	<i>Obtenció d'imatges en microscopi confocal</i>	96
3.6.8.3	<i>Tractament i anàlisi de les imatges</i>	97
3.7	Determinació d'activitats enzimàtiques i metabòlits.....	97
3.7.1	Obtenció d'extractes proteics de teixit hepàtic	97
3.7.2	Quantificació de proteïna segons el mètode Bradford	98
3.7.3	Determinació de l'activitat alanina aminotransferasa (ALT)	98
3.7.4	Determinació de l'activitat aspartat aminotransferasa (AST)	99
3.7.5	Determinació de l'activitat 6-fosfofructo-1-cinasa (PFK1)	99
3.7.6	Determinació de l'activitat piruvat cinasa (PK)	100
3.7.7	Determinació de l'activitat fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa)	101
3.7.8	Determinació de l'activitat 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6-PGDH)	102
3.7.9	Determinació de l'activitat glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH)	102
3.7.10	Determinació de glucosa en sèrum.....	102
3.7.11	Determinació de triglicèrids en sèrum	103

3.8	Tractament estadístic de les dades.....	103
4.	RESULTATS	107
4.1	Identificació de proteïnes que interaccionen amb cALT2 mitjançant la criba d'una biblioteca de cDNA d'orada utilitzant el sistema doble híbrid en llevat.....	107
4.1.1	Eficiència de la construcció de la biblioteca.....	108
4.1.2	Eficiència de l'aparellament	109
4.1.3	Identificació i anàlisi dels clons positius.....	110
4.2	Clonatge i caracterització de les proteïnes aïllades	112
4.2.1	Obtenció de la seqüència codificant dels clons positius	112
4.2.2	Caracterització de l'F-lectina	117
4.3	Localització subcel·lular de l'F-lectina, cALT1 i cALT2 en cèl·lules eucariotes	120
4.3.1	Localització en aparell de Golgi de l'F-lectina, cALT1 i cALT2.....	122
4.3.2	Localització en vesícules de secreció de l'F-lectina, cALT1 i cALT2	126
4.3.3	Efecte de la coexpressió d'F-lectina i cALT1 o cALT2 sobre la localització subcel·lular de cALT1 i cALT2 en cèl·lules SBL.....	130
4.4	Confirmació per la tècnica de FRET de la interacció entre F-lectina i les isoformes cALT1 i cALT2.....	132
4.4.1	Efecte de la coexpressió d'F-lectina i cALT1 o cALT2 sobre la localització subcel·lular de les tres proteïnes en cèl·lules SBL.....	142
4.4.1.1	<i>Efecte de la coexpressió d'F-lectina i cALT1 o cALT2 sobre la localització d'F-lectina i les isoformes de cALT a l'aparell de Golgi en cèl·lules SBL</i>	<i>142</i>
4.4.1.2	<i>Efecte de la coexpressió d'F-lectina i cALT2 sobre la localització d'F-lectina i cALT2 a vesícules de secreció en cèl·lules SBL.....</i>	<i>145</i>
4.5	Efecte de la sobreexpressió d'F-lectina sobre l'activitat de l'ALT citosòlica d'orada en cèl·lules SBL.....	147
4.6	Distribució tissular de l'expressió d'F-lectina, cALT1 i cALT2.....	149
4.7	Efecte de l'administració de lipopolisacàrid en orades	151
4.7.1	Efecte de l'administració de lipopolisacàrid sobre l'expressió d'F-lectina, i les diferents isoformes d'ALT.	151
4.7.2	Efecte de l'administració de lipopolisacàrid sobre el metabolisme intermediari.....	153
4.8	Efecte bactericida de cALT2 d'orada.....	156
5.	DISCUSSIÓ	161
6.	CONCLUSIONS	173
7.	REFERÈNCIES	177
8.	ANNEXOS	213

I. LLISTAT D'ABREVIATURES

293A	293 adherents, cèl·lules
6-PGDH	6-fosfogluconat deshidrogenasa
AAA	aglutinina d' <i>Anguilla anguilla</i>
AD	domini d'activació
ADP	adenosina difosfat
ALT	alanina aminotransferasa
AMP	adenosina monofosfat
AOA	aminooxiacetat
AST	aspartat aminotransferasa
ATF	factor activador de la transcripció
ATP	adenosina trifosfat
BBS	<i>BES-buffered saline</i>
BES	<i>N,N-Bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethane Sulfonic Acid</i>
BHA	hidroxibutilanisol
C3	component 3 del complement
cALT	alanina aminotransferasa citosòlica
CCLR	<i>cell culture lysis reagent</i>
cdNA	DNA complementari
CDS	regió codificant
ChIP	immunoprecipitació de cromatina
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> , cèl·lules
CIP	fosfatasa alcalina
CMV	citomegalovirus
CRD	dominis d'unió a carbohidrats
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNA-BD	domini d'unió al DNA
dNTP	desoxiribonucleòtids trifosfat
DO	<i>dropout</i>
ds cDNA	cDNA de doble cadena
DsRedmon	<i>Discosoma red fluorescent protein</i>
DTT	ditiotreitòl
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	reticle endoplasmàtic
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
FBPasa	fructosa 1,6-bisfosfatasa
FBS	sèrum fetal boví
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
G3PDH	gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa

G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
G6PDH	glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
GDH	glutamat deshidrogenasa
GK	glucocinasa
GLUT 1-4	transportadors de glucosa 1-4
GM130	<i>Golgi matrix protein 130</i>
GPasa	glucogen fosforilasa
GPT	glutamat piruvat transaminasa
HABP2	<i>hyaluronic acid binding protein 2</i>
HDL	lipoproteïnes d'alta densitat
HEK293	<i>human embryonic kidney 293</i> , cèl·lules
HepG2	<i>hepatocarcinoma G2</i> , cèl·lules
HK	hexocinasa
HNF	factor nuclear hepatocitari
Huh-7	<i>human hepatocarcinoma 7</i> , cèl·lules
IL	interleucina
IFN	interferó
IGF-I	<i>insuline-like growth factor-I</i>
IMP	inosina monofosfat
K_m	constant de Michaelis-Menten
KLF	<i>Krüppel-like factors</i>
LB	medi <i>Luria-Bertani</i>
LBP	proteïna d'unió a lipopolisacàrid
LDH	lactat deshidrogenasa
LPS	lipopolisacàrid
mALT	alanina aminotransferasa mitocondrial
MAPK	proteïna cinasa activada per mitògens
MASP	serina proteasa associada a MBL
MBL	lectina d'unió a mannososa
MCS	<i>multi-cloning site</i>
MD-2	proteïna de diferenciació mieloide 2
MDH	malat deshidrogenasa
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	RNA missatger
MS-222	metanosulfonat de tricaïna
NAD ⁺ /NADH	nicotinamida adenina dinucleòtid
NADP ⁺ /NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
NF-κB	factor nuclear κB
NOD	domini d'oligomerització d'unió a nucleòtids
NSF	factor sensible a N-etilmaleimida
OD	densitat òptica
ONP	O-nitrofenil
ONPG	O-nitrofenil-β-D-galactopiranòsid
PAMPs	patrons moleculars associats a patògens

PB	buffer de permeabilització
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PEP	fosfoenolpiruvat
PEPCK	fosfoenolpiruvat carboxicinas
PFK1	6-fosfofructo-1-cinasa
PFKFB	6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa
PGI	fosfoglucosa isomerasa
PK	piruvat cinasa
PLP	piridoxal-5-fosfat
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRR	receptors de patrons de reconeixement
QDO	<i>quadruple dropout</i>
qRT-PCR	RT-PCR quantitatiu
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RBP2	<i>retinol binding protein 2</i>
RIG-I	gen 1 induïble per àcid retinoic
RLM-RACE	<i>RNA ligase mediated RACE</i>
RNA	àcid ribonucleic
ROI	regió d'interès
ROX	6-carboxi-X-rodamina
RPS20	<i>ribosomal protein S20</i>
RT	transcripció inversa
SBL	<i>Sea bass larvae</i> , cèl·lules
SD	desviació estàndard
SDM	<i>synthetic defined media</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SNAP	proteïna soluble associada al factor sensible a N-etilmaleimida
SNARE	receptors SNAP
STX-6	<i>syntaxin-6</i>
TAE	tris-acetat-EDTA
TAP	pirofosfatasa àcida, fosfatasa àcida de tabac
TCA	àcid tricarbòxilic
TDO	<i>triple dropout</i>
TE	tris-EDTA
TGN	xarxa <i>trans</i> Golgi
TNF	factor de necrosi tumoral
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TPI	triosafosfat isomerasa
tRNA	RNA de transferència
UFC	unitats formadores de colònia
UTR	regió no traduïda
UV	ultravioleta

V_{\max}	velocitat màxima de reacció
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose medium</i>
YPDA	<i>yeast extract peptone dextrose adenine medium</i>
α -SNAP	proteïna soluble associada a NSF

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Metabolisme de carbohidrats en peixos

1.1.1 Peixos carnívors com a model d'intolerància a la glucosa

Els peixos carnívors no presenten un control estricte dels nivells de glucosa en sang (Polakof et al, 2012). En aquests organismes, l'estat d'hiperglicèmia es manté durant més temps que en mamífers, tant després de l'administració de glucosa com de l'alimentació amb dietes amb nivells elevats de carbohidrats (Palmer i Ryman, 1972; Baños et al, 1998; Legate et al, 2001; Couto et al, 2008). Aquest perfil metabòlic mimetitzava la diabetis tipus 2 en humans (Cowey i Walton, 1989; Wright et al, 1998; Moon et al, 2001). D'altra banda, els peixos omnívors, com ara la carpa (*Cyprinus carpio*), metabolitzen millor la glucosa que els peixos carnívors, tot i que aquesta capacitat és menor que la presentada pels mamífers (Furuichi i Yone, 1981).

Tot i que en peixos s'hagi descrit un ús limitat dels carbohidrats ingerits, conjuntament amb certa intolerància a la glucosa, diversos estudis mostren que els carbohidrats subministrats amb les dietes es poden utilitzar per substituir parcialment les proteïnes com a font d'energia. Els nivells òptims de substitució de proteïna per carbohidrats en aquestes dietes depenen de l'espècie, el tipus de carbohidrat i el tractament que ha rebut, i el contingut lipídic i proteic de la dieta. D'aquesta manera, per a cada espècie, el tipus i nivell òptim de substitució de proteïna o lípids per carbohidrats s'ha de determinar experimentalment (Furuichi i Yone, 1980; Wilson, 1994; Shiao, 1997; Hemre et al, 2001). El midó tractat (gelatinitzat, dextrinitzat, extrusionat) és un component de la dieta adient per a l'orada (*Sparus aurata*) (Georgopoulos i Conides, 1999; Venou et al, 2003; Fernández et al, 1996, 1998, 2007; Enes et al, 2010), i altres espècies de peixos (Bergot, 1979; Bergot i Breque, 1983; Jeong et al, 1991; Takeuchi et al, 1994; Wilson, 1994; Peres i Oliva-Teles, 2002; Kumar et al, 2010). Malgrat que l'orada és un peix carnívor, el seu metabolisme hepàtic és capaç d'adaptar-se a la substitució parcial de proteïnes per carbohidrats, obtenint taxes de creixement acceptables sempre que els nivells de carbohidrats no superin el 20 % de la composició de la dieta. Aquesta adaptació metabòlica promou canvis en l'activitat d'enzims clau en la glicòlisi, la gluconeogènesi, la via de les pentoses fosfat i el metabolisme d'aminoàcids (Fernández et al, 1998, 2007; Metón et al, 1999b).

Hi ha diverses hipòtesis que expliquen les bases moleculars que determinen la baixa habilitat dels peixos carnívors per utilitzar els carbohidrats. En un principi es va assumir que la

hiperglicèmia prolongada observada en els peixos després d'un test de glucosa i la incapacitat per utilitzar alts nivells de carbohidrats en la dieta era el resultat de baixos nivells d'insulina endògena (Palmer i Ryman, 1972; Wilson i Poe, 1987), però els nivells d'insulina en peixos són similars o fins i tot superiors als observats en mamífers (Mommsen i Plisetskaya, 1991; Plisetskaya, 1998). Tot i que en peixos s'ha observat un increment d'insulina en plasma després de l'administració de glucosa (Furuichi i Yone, 1982; Hilton et al, 1987; Enes et al, 2011), certs aminoàcids sembla que són capaços d'estimular la secreció d'insulina en peixos de manera més potent que la glucosa (Andoh i Nagasawa, 1998; Navarro et al, 2002; Andoh, 2007). L'activitat estimuladora dels diferents aminoàcids difereix entre espècies, així com també el fet que la insulina està implicada en la regulació dels nivells d'aminoàcids en sang (Ince i Thorpe, 1974, 1977, 1978; Inui et al, 1975; Murai i Ogata, 1990; Andoh, 2007). Els peixos també compten amb receptors d'insulina i IGF-I (de l'anglès *insulin-like growth factor-I*) (Gutiérrez i Plisetskaya, 1991; Gutiérrez et al, 1993; Drakenberg et al, 1993). Les propietats d'unió d'aquests receptors en diferents teixits i espècies de peixos han estat estudiades i, tot i les seves similituds amb els receptors d'insulina i IGF-I de mamífers, exhibeixen propietats d'unió diferents (Párrizas et al, 1995). La presència de receptors IGF-II/mannosa 6-fosfat es va detectar en embrions de peixos, d'estructura i especificitat pel lligand similars als trobats en mamífers (Méndez et al, 1991). No obstant això, la quantitat de receptors d'insulina en el múscul de peixos és inferior a la descrita per a mamífers (Gutiérrez et al, 1991).

L'absència de transportadors de glucosa funcionals (GLUTs) va ésser considerada una altra de les possibles causes d'intolerància a la glucosa en peixos. No obstant, han estat descrites diverses isoformes de transportadors de glucosa en peixos homòlogues a GLUT1, GLUT2, GLUT3 i GLUT4 de mamífers (Teerijoki et al, 2000, 2001; Krasnov et al, 2001; Capilla et al, 2002; Zhang et al, 2003; Hall et al, 2004, 2005, 2006; Díaz et al, 2007). La funcionalitat de GLUT2 en peixos ha estat verificada mitjançant la microinjecció d'un plasmidi d'expressió en ous de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*). Els embrions resultants exhibien un increment en l'activitat transportadora de glucosa (Krasnov et al, 2001). De manera similar, la caracterització funcional d'un GLUT4 de teixit adipós de salmó coho (*Onchorynchus kisutch*) es va demostrar en oòcits de *Xenopus laevis* i en adipòcits de truita, on tant la insulina com la glucosa van estimular l'absorció de glucosa i la translocació del transportador a la membrana plasmàtica (Capilla et al, 2004). No obstant, els transportadors de glucosa GLUT2 i GLUT4 en peixos es caracteritzen per presentar menor afinitat per la glucosa (Krasnov et al, 2001; Capilla et al, 2004), a més de presentar un baix nombre de receptors tipus GLUT4 en múscul (Wright et al, 1998).

La regulació de l'expressió d'enzims que controlen el flux de glucosa/glucosa-6-fosfat en el fetge de peixos també s'ha proposat com un factor per explicar la baixa habilitat per metabolitzar la glucosa (Cowey i Walton, 1989; Wilson, 1994; Panserat et al, 2002). En mamífers, la regulació per glucosa de la glucocinasa (GK, EC2.7.1.2) és necessària per mantenir valors normals de glicèmia, i la sobreexpressió de glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa, EC3.1.3.9) comporta una producció de glucosa hepàtica excessiva, resultant en intolerància a la glucosa i hiperglicèmia (O'Brien i Granner, 1996; Seoane et al, 1997; Trinh et al, 1998). Durant molt de temps, la incapacitat dels peixos carnívors per utilitzar carbohidrats s'havia descrit en part per la falta d'una activitat induïble de GK hepàtica (Nagayama i Ohshima, 1974; Cowey et al, 1977; Cowey i Walton, 1989; Steffens, 1989; Wilson, 1994). Tanmateix, els estudis bioquímics indiquen la presència d'activitat atribuïble a GK en fetge de salmó atlàntic (*Salmo salar*) i de cossos de Brockmann en halibut atlàntic (*Hippoglossus hippoglossus*) (Tranulis et al, 1996, 1997). A més, el nostre grup de recerca va aïllar el cDNA de la GK de fetge d'orada i en va estudiar la regulació de l'expressió gènica en funció de l'estat nutricional (Caseras et al, 2000, 2002), mentre que paral·lelament es van aïllar seqüències parcials de cDNA que codificaven per a la GK d'altres espècies (Panserat et al, 2000a). Els nivells de GK hepàtica en salmó atlàntic i orada són inferiors als observats en rates alimentades, però curiosament similars als descrits per a rates en dejú o diabètiques (Caseras et al, 2000). Aquests resultats indiquen que la GK és funcional en el fetge de peixos, tot i que les característiques cinètiques de la GK en aquests organismes puguin fer que sigui un enzim menys eficient per metabolitzar glucosa.

L'absència de regulació de l'expressió de la G6Pasa en el fetge de peixos va ésser proposada com un altre dels factors per explicar l'hiperglicèmia en aquests organismes (Panserat et al, 2000b). Aquest enzim contribueix a la regulació homeostàtica de la glucosa en sang catalitzant la desfosforilació de la glucosa-6-fosfat a glucosa, la reacció terminal de la gluconeogènesi i la glicòlisi (Arion et al, 1975, 1980; Nordlie et al, 1999; van de Werve et al, 2000). El nostre grup de recerca va clonar i caracteritzar la subunitat catalítica de la G6Pasa d'orada i la primera regió promotora d'una G6Pasa descrita en peixos i animals no mamífers (Metón et al, 2004a; Salgado et al, 2004). Com que la insulina gairebé no afecta l'activitat promotora de la G6Pasa en el fetge d'orada en absència de glucosa, es va proposar que la baixa capacitat de la insulina per reprimir la G6Pasa podria contribuir a la resistència a la insulina en els peixos carnívors (Salgado et al, 2004).

Es va demostrar que la regulació en l'expressió d'enzims que controlen el cicle de substrat glucosa/glucosa-6-fosfat es dona en el fetge d'orada. L'expressió hepàtica de la GK a nivell

d'mRNA i d'activitat enzimàtica disminueix dràsticament en orades en dejú, mentre que s'incrementa l'expressió de G6Pasa (Metón et al, 2004a). No es va observar la inducció de GK fins 4 hores després de la ingesta, aconseguint el seu màxim d'activitat a les 4-8 hores; d'altra banda, els nivells mínims d'mRNA de la G6Pasa s'assoleixen a les 4-15 hores del període postprandial (Caseras et al, 2002). Comparat amb rata, aquests resultats suggereixen que l'hiperglicèmia prolongada observada en peixos podria ésser deguda a una estimulació retardada de l'expressió de la GK. L'efecte de l'alimentació amb diferents dietes sobre l'expressió de la GK i la G6Pasa indica que el metabolisme intermediari hepàtic en peixos alimentats amb dietes pobres en proteïnes i riques en carbohidrats es veu forçat a utilitzar els carbohidrats de la dieta. Aquest fet es dona més aviat a través de la modulació dels nivells d'mRNA de la GK que no pas de l'expressió de la G6Pasa (Caseras et al, 2000, 2002; Metón et al, 2003a; Egea et al, 2007, 2008).

Moltes espècies de peixos presenten períodes prolongats de dejú en el seu medi natural, relacionats amb els períodes de migració i reproducció. En aquestes situacions, les variacions en els nivells de glucogen en fetge i múscul depenen en gran mesura de l'espècie estudiada, tot i que es necessiten períodes més llargs que en mamífers per observar un descens significatiu dels nivells de glucogen hepàtic en peixos (Nagai i Ikeda, 1971; Larsson i Lewander, 1973; French et al, 1983; García de Frutos et al, 1990; Hemre et al, 1990). En orada, el glucogen hepàtic tendeix a disminuir significativament després de 8 dies de dejú, i arriba als nivells mínims després de 20 dies (Baanante et al, 1991; García de Frutos et al, 1991; Metón et al, 1999b). Un període curt de dejú va causar una disminució significativa del contingut de glucogen en fetge i múscul en la truita irisada (Hickling i March, 1982) i en la truita de riu (*Salmo trutta fario*) (Navarro et al, 1992). Tanmateix, en anguila europea (*Anguilla anguilla*) sotmesa a dejú en condicions de laboratori, la concentració de glucogen en fetge no va disminuir fins a superar els 96 dies, i el glucogen muscular va mantenir-se en els seus nivells inicials després de 164 dies (Dave et al, 1975). La intolerància a la glucosa sembla estar relacionada amb la utilització preferent de lípids i proteïnes en lloc de glucogen com a font d'energia preferent per part dels peixos en condicions de dejú.

1.1.2 Regulació nutricional de la glicòlisi i gluconeogènesi en peixos

L'homeòstasi de la glucosa està principalment controlada en el fetge a través de dues rutes metabòliques, la glicòlisi i la gluconeogènesi. El catabolisme de glucosa es dona principalment a través de la glicòlisi, el cicle de Krebs (TCA) i la cadena respiratòria per obtenir ATP, o mitjançant el cicle de les pentoses fosfat, donant lloc a la producció de NADPH per a la

biosíntesi de lípids i ribosa-5-fosfat (necessària per a la síntesi de nucleòtids). L'excés de glucosa es pot emmagatzemar com a glucogen (glucogènesi) o pot ésser convertit en lípids. Sota condicions de dejú, els requeriments de glucosa es poden satisfer a partir de la degradació del glucogen a glucosa (glucogenolisi) o utilitzant precursors no glicosídics, com ara piruvat, lactat, glicerol, intermediaris del TCA o derivats del catabolisme d'aminoàcids, per generar glucosa (gluconeogènesi). Depenent dels requeriments cel·lulars, enzims reguladors específics modulen el flux net cap a la glicòlisi o la gluconeogènesi mitjançant tres cicles de substrat (Pilkis i Granner, 1992; Metón et al, 2003a,b, 2006), tal com s'exemplifica a la figura 1.

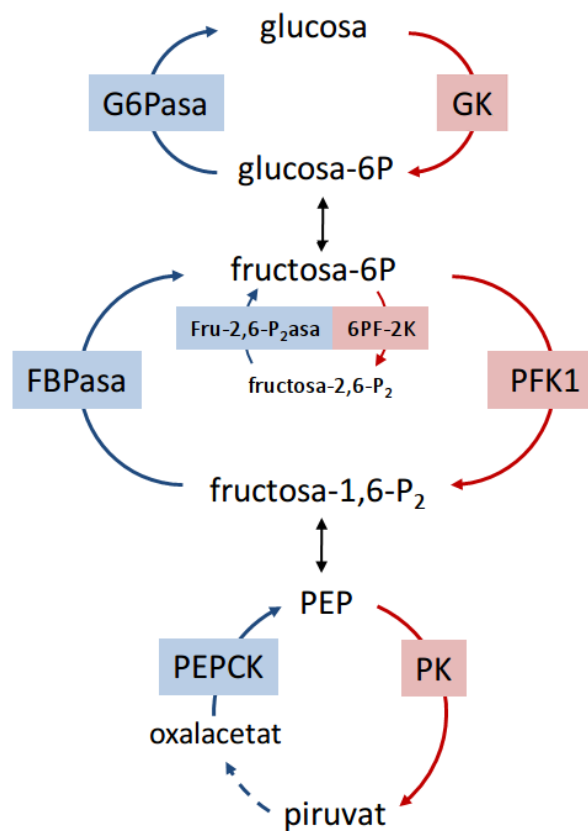


Figura 1. Cicles de substrat en la glicòlisi/gluconeogènesi. Els enzims implicats en els cicles de substrat de la via glicolítica (representada amb color vermell) són GK, PFK1 i PK, mentre que els implicats en la via gluconeogènica (representada amb color blau) són PEPCCK, FBPasa i G6Pasa. També es representa l'enzim bifuncional 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB), que controla els nivells de fructosa-2,6-bisfosfat.

1.1.2.1 Regulació nutricional en situacions de dejú

El manteniment de l'homeòstasi energètica en peixos durant el dejú està directament relacionat amb la capacitat del fetge per mobilitzar reserves energètiques, com ara lípids i glucogen, durant els primers estadis del dejú, i la posterior activació de la gluconeogènesi hepàtica i reducció de la taxa d'utilització de la glucosa.

Increment de la glucogenolisi. La forma activa de la glucogen fosforilasa (GPasa, EC2.4.1.1) incrementa en salmó atlàntic en dejú, donant lloc a la degradació de glucogen hepàtic (Sundby et al, 1991; Soengas et al, 1996). Peixos com ara el llobarro (*Dicentrarchus labrax*), l'orada, la truita irisada i la truita de riu mobilitzen el glucogen durant la fase inicial del dejú, disminuint significativament el contingut de glucogen hepàtic (García de Frutos et al, 1990; Navarro i Gutiérrez, 1995; Soengas et al, 1996, 2006; Metón et al, 2003a; Kirchner et al, 2005; Polakof et al, 2006, 2007; Pérez-Jiménez et al, 2007).

Increment de la gluconeogènesi. En truita irisada l'activitat fosfoenolpiruvat carboxicinas (PEPCK, EC4.1.1.32/38/49) incrementa significativament en resposta al dejú (Kirchner et al, 2003, 2008). En fetge d'orada el dejú provoca una disminució en l'expressió de l'enzim 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB, EC3.1.3.46) i un fort descens en els nivells de fructosa-2,6-P₂. Els baixos nivells de fructosa-2,6-P₂ donen lloc a la disminució de l'activitat 6-fosfofructo-1-cinasa (PFK1, EC2.7.1.11) i l'increment de l'activitat fructosa-1-6-bisfosfatasa (FBPasa, EC3.1.3.11), augmentant el flux gluconeogènic (García de Frutos et al, 1990; Metón et al, 1999b). En fetge d'orada i truita irisada l'activitat FBPasa incrementa i es manté elevada després de la realimentació a curt termini (2 dies), i en orada se'n restauren els valors inicials després de 21 dies de realimentació (Metón et al, 2003a; Kirchner et al, 2003, 2008). L'elevada activitat FBPasa a curt termini després de la realimentació podria estar relacionada amb la restauració del glucogen hepàtic a partir de compostos amb 3 àtoms de carboni per la via de la gluconeogènesi, tal com s'ha observat en rates (Pilkis i Granner, 1992). De fet, estudis en llobarro mostren que en peixos en dejú la meitat del glucogen s'ha sintetitzat per la via indirecta, mentre que en peixos realimentats aquesta és la via preferent (Viegas et al, 2012). Aquest fet evidencia l'ús limitat de la glucosa de la dieta per part dels peixos. Les situacions de dejú també incrementen l'expressió gènica i l'activitat de la G6Pasa en orada i truita irisada (Morata et al, 1982; Caseras et al, 2002; Kirchner et al, 2003; Metón et al, 2004a; Polakof et al, 2007). En orada va ésser suficient un dia de realimentació després del dejú per disminuir els nivells de G6Pasa fins als observats en orades alimentades (Metón et al, 2004a).

Disminució de la glicòlisi. El dejú promou un fort descens en l'mRNA i l'activitat de la GK en fetge d'orada i truita irisada (Caseras et al, 2000; Kirchner et al, 2003, 2005; Metón et al, 2004a; Soengas et al, 2006). D'altra banda, en llobarro el dejú a curt termini no va tenir efecte en l'activitat GK hepàtica (Pérez-Jiménez et al, 2007; Viegas et al, 2013). L'activitat hepàtica PFK1 i piruvat cinasa (PK, EC2.7.1.40) en truita irisada i orada disminueixen significativament en peixos sotmesos a dejú (Fideu et al, 1983; Bonamusa et al, 1992;

Metón et al, 1999b, 2003a; Kirchner et al, 2003). En orada la realimentació a curt termini no va ésser suficient per produir canvis significatius en l'activitat hepàtica PK. Els nutrients de la dieta després d'un període de dejú prolongat contribueixen a restaurar ràpidament els nivells de glucogen.

La restricció calòrica promou una disminució en l'activitat dels enzims implicats en la glicòlisi i en la via de les pentoses fosfat de manera similar a què succeeix en orades sotmeses a dejú (Metón et al, 1999a, 1999b; Caseras et al, 2000).

1.1.2.2 Regulació nutricional en situacions d'alimentació amb alt contingut en carbohidrats

Quan els peixos són alimentats amb dietes amb alt contingut en carbohidrats es produeixen canvis metabòlics que resulten en un aprofitament parcial dels carbohidrats disponibles.

Utilització de glucosa exògena. Tot i que els nivells de GK són pràcticament indetectables en peixos alimentats amb dietes amb baix contingut en carbohidrats (Caseras et al, 2002; Metón et al, 2004a), en espècies com ara l'orada, la truita irisada i la carpa comuna (*Cyprinus carpio*), després de la ingesta d'una dieta alta en carbohidrats, els nivells d'mRNA i d'activitat GK hepàtica es veuen fortament incrementats (Panserat et al, 2000b; Caseras et al, 2002; Capilla et al, 2003; Metón et al, 2004a). De la mateixa manera, s'observa un increment de l'expressió de PFKFB i PK en fetge de truita irisada i orada (García de Frutos et al, 1990; Metón et al, 1999b, 2000; Panserat et al, 2001c). L'alimentació d'orades amb dietes amb elevat contingut en carbohidrats va provocar un augment de l'activitat cinasa de la PFKFB i els nivells de fructosa-2,6-P₂, donant com a resultat un increment de la glicòlisi (García de Frutos et al, 1990). En anguila europea l'activitat PK també va incrementar després de l'administració d'una dieta rica en carbohidrats (Suárez et al, 1995). L'activitat PFK1 hepàtica es va veure augmentada en truita irisada i orada alimentades amb dietes amb alt contingut en carbohidrats (Fideu et al, 1983; Walton, 1986; Bonamusa et al, 1992; Metón et al, 1999b; Fernández et al, 2007).

Desregulació de la gluconeogènesi. En rata, l'expressió de PEPCK, FBPasa i G6Pasa, enzims clau en la gluconeogènesi, s'indueix en situacions de dejú i es reprimeix en l'alimentació amb dietes amb alt contingut de carbohidrats; en peixos, aquests enzims hepàtics no responen als nivells de carbohidrats en la dieta, i es mantenen elevats. S'ha suggerit que hi ha una producció alta i sostinguda de glucosa endògena en el fetge de peix deguda a una manca de regulació de la gluconeogènesi pels carbohidrats a la dieta (Tranulis et al, 1991;

Panserat et al, 2000c, 2001a,b,c; Caseras et al, 2002; Enes et al, 2006; Moreira et al, 2008; Kirchner et al, 2008). En orada, malgrat que els nivells de G6Pasa no sembla que es vegin afectats pels nivells de carbohidrats de la dieta, la seva expressió sí que es modula en resposta al dejú i després de l'alimentació (Metón et al, 2004a).

1.2 Metabolisme de proteïnes en peixos

1.2.1 Funcions dels aminoàcids

La majoria de les espècies de peixos són carnívores (Love, 1980) i la seva dieta natural consta d'un elevat contingut en proteïnes (Wilson, 2002). Els aminoàcids lliures corresponen a una petita proporció del total en l'organisme, i provenen majoritàriament de dues fonts, la dieta i el catabolisme de proteïnes corporals. En peixos, el catabolisme de proteïnes tissulars subministra menys del 50 % dels aminoàcids, raó per la qual els peixos són organismes fortament dependents de la proteïna de la dieta (Cowey i Luquet, 1983). El principal destí dels aminoàcids recau en la síntesi de proteïnes, i en menor mesura la síntesi d'hormones, purines, neurotransmissors i cofactors.

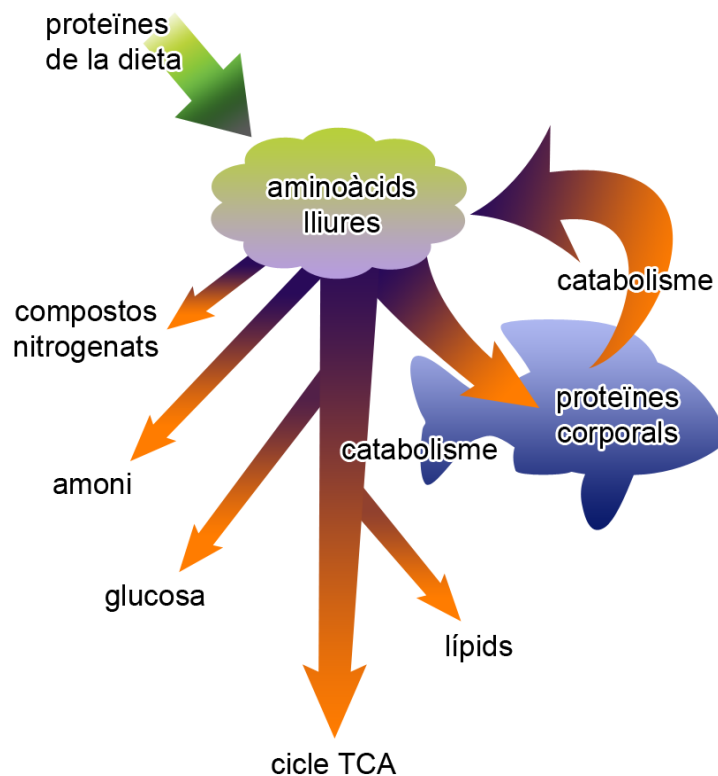


Figura 2. Principals vies del metabolisme d'aminoàcids i proteïnes. Els aminoàcids lliures de l'organisme (provinents majoritàriament de la dieta i del catabolisme de proteïnes endògenes) es destinen a la síntesi de proteïnes corporals, i en menor mesura d'altres compostos nitrogenats. L'excedent és catabolitzat en major part fins al cicle dels TCA, i una petita part es destina a l'emmagatzematge en forma de glucosa i lípids. Imatge adaptada de Dabrowsky i Guderley, 2002.

El següent destí dels aminoàcids és la producció d'energia. Aquests supleixen fins al 85 % dels requeriments energètics en peixos teleostis (van Waarde, 1983). Després de l'alimentació, el subministrament d'aminoàcids als teixits excedeix la seva capacitat de síntesi de proteïnes, i

l'excés és catabolitzat en el fetge, on s'utilitzarà com a substrat per proveir ATP per als processos biomecànics, sintètics i de transport (Atherton i Aitken, 1970; Beamish i Thomas, 1984). El procés de catabolisme d'un aminoàcid implica l'eliminació del grup amino, que en peixos teleostis serà excretat majoritàriament com a amoni, i la formació d'un α -cetoàcid. Aquest α -cetoàcid en determinades circumstàncies s'utilitza com a precursor per sintetitzar glucogen o triglicèrids (que s'utilitzen com a reserva de carbohidrats i lípids), però la major part s'oxidarà fins a CO_2 i H_2O a través de la conversió a intermediaris del TCA per produir energia (figura 2). L'oxidació directa dels aminoàcids de la dieta evita la despesa energètica que comporta la síntesi de molècules d'emmagatzematge, ja que l'excreció directa d'amoni com a producte final del metabolisme d'aminoàcids és energèticament més favorable que utilitzar energia, en convertir l'amoni en una forma menys tòxica.

L'excés de proteïna en la dieta respecte les demandes de creixement comporta un augment de la degradació d'aminoàcids i l'excreció de compostos nitrogenats, fet que resulta en l'eutrofització de les aigües a nivell local (Pearson i Black, 2001; Davenport et al, 2003). S'han aconseguit progressos en aquest sentit optimitzant la proporció de proteïna digerible enfront l'energètica. Un descens en aquesta proporció és extremadament eficient per millorar la utilització de proteïna i disminuir les pèrdues de nitrogen en la majoria de peixos en cultiu (Kaushik i Cowey, 1991; Cho i Bureau, 2001). L'augment dels nivells de lípids en la dieta també té efectes beneficiosos en termes d'aprofitament del nitrogen en la majoria de peixos (Lee i Putnam, 1973; Kaushik i Oliva-Teles, 1985; Hillestad i Johnsen, 1994; Vergara et al, 1996, Satoh et al, 2004). Quan la dieta és deficient en lípids, una major proporció de la proteïna és metabolitzada per obtenir energia, provocant una major excreció d'amoni i la retenció de menys nitrogen per al creixement (Atherton i Aitken, 1970; Wood, 1993). Els carbohidrats de la dieta no són una bona font d'energia, ja que fins i tot si es posen a disposició carbohidrats digeribles, la glucosa absorbida es metabolitza amb dificultat i de manera limitada (Moon 2001; Panserat i Kaushik, 2002). En canvi, existeix una elevada capacitat de gluconeogènesi a partir dels aminoàcids exògens (Bever et al, 1981). En el cas particular de l'orada, la substitució de proteïna de la dieta per midó de blat de moro gelatinitzat fins un 18 % permet un bon aprofitament de la proteïna per a creixement (Fernández et al, 2007).

En peixos, els aminoàcids indueixen la secreció d'insulina de manera més eficient que la pròpia glucosa, tot i que l'efecte difereix en funció de l'espècie de peix estudiada. L'arginina, per exemple, és un potent agent insulinoatròpic en llenguado barfin, anguila europea i salmó coho (Andoh, 2007; Ince i Thorpe, 1997; Plisetskaya et al, 1991).

D'altra banda, els aminoàcids són reguladors del flux metabòlic i es consideren molècules de senyalització. En peixos marins, particularment durant estadis embriogènics, els aminoàcids proveeixen estabilitat en l'osmolaritat dels fluids corporals, i s'utilitzen com a substrats per a la síntesi de proteïnes i el catabolisme aeròbic (Ronnestad i Fyhn, 1993; Ronnestad et al, 1993; Sivaloganathan et al, 1998). A més, la composició dels aminoàcids lliures canvia depenent del teixit, freqüència i temps després de l'alimentació, temperatura i salinitat (Carter et al, 1994; Tantikitti i March, 1995; Knapp i Wieser, 1981; Dabrowski et al, 1996; Auerswald et al, 1997). En estudis realitzats en hepatòcits primaris de truita irisada es va observar que els aminoàcids incrementaven l'expressió d'enzims del metabolisme glucídic i en disminuïen l'expressió dels involucrats en el metabolisme proteic. A més, es va demostrar que l'habilitat de la insulina per estimular l'expressió de gens glicolítics resulta major en presència d'aminoàcids (Lansard et al, 2010).

1.2.2 Digestió i absorció d'aminoàcids

La proteòlisi s'inicia a l'estómac amb la pepsina, i la hidròlisi dels pèptids continua al lumen de l'intestí per l'acció de la tripsina, quimiotripsina i leucina aminopeptidasa. En peixos herbívors aquests enzims actuen a un pH òptim, com en mamífers (Sabapathy i Teo, 1995). Els aminoàcids s'absorbeixen a l'intestí com a aminoàcids lliures o com a dipèptids. La hidròlisi dels dipèptids es dona immediatament després del transport (Reshkin i Ahearn, 1991). El nivell més alt d'aminoàcids lliures en plasma s'assoleix a les 12 hores després de la ingesta, i després torna als valors basals (Murai et al, 1987; Navarro et al, 1997).

Els nivells d'aminoàcids en la dieta promouen canvis en els mecanismes de transport intestinal dels peixos. Les K_m dels transportadors d'aminoàcids en peixos herbívors i omnívors són menors que en carnívors, adaptant-se a un menor nivell d'aminoàcids en l'intestí (Ferraris i Ahearn, 1984). L'entrada dels aminoàcids a la sang es duu a terme a través de la membrana basolateral de les cèl·lules intestinals a través de, com a mínim, tres transportadors d'aminoàcids (Reshkin et al, 1988; Collie i Ferraris, 1995). L'alanina, la lisina i la fenilalanina són substrats de transportadors independents de sodi; la prolina i el glutamat ho són transportats de transportadors dependents de sodi, i la glicina utilitza el gradient de sodi i potasi (Reshkin et al, 1988).

Els aminoàcids són alliberats de la sang a la majoria de cèl·lules com a aminoàcids lliures. El recanvi d'aminoàcids en plasma de peixos és relativament alt comparat amb el d'altres vertebrats (Bever et al, 1981). Aquest fet es deu principalment a l'eficiència dels

transportadors d'aminoàcids, suggerint la importància metabòlica dels aminoàcids en els peixos.

1.2.3 Catabolisme d'aminoàcids. Origen de l'amoni excretat.

El fetge dels peixos és el principal òrgan de catabolisme d'aminoàcids i això explica les altes concentracions d'aminoàcids lliures presents en aquest teixit (van den Thillart i van Raaij, 1995). Els aminoàcids són un substrat oxidatiu més important que els lípids en el fetge (French et al, 1981), i la seva taxa d'oxidació excedeix la del seu paper en altres vies, com la gluconeogènesi. En salmó atlàntic, la taxa d'oxidació de l'alanina excedeix la taxa d'incorporació a glucosa més de 10 vegades (Mommsen et al, 1985), i en hepatòcits de tonyina, l'alanina s'oxida 5 vegades més ràpidament que el lactat (Buck et al, 1992). Això és degut a què l'excés d'aminoàcids que sobrepassa els requeriments de la dieta no pot ésser emmagatzemat, i és desaminat i oxidat al cicle de TCA o convertit en greixos i carbohidrats (Ballantyne, 2001; Stone et al, 2003).

El catabolisme d'aminoàcids resulta en la producció d'amoni en peixos, i s'estima que el fetge és el responsable del 50-70 % d'aquesta producció (van den Thillart i van Raaij, 1995). El contingut de proteïna de la dieta és el principal factor que influeix en la producció d'amoni (Beamish i Thomas, 1984; Carvalho et al, 2010). Els nivells d'amoni incrementen després de la ingesta (Brown i Cameron, 1991; Bucking i Wood, 2008; Carvalho et al, 2010), i en peixos alimentats a sacietat, la producció d'amoni és més de 10 vegades superior a la de peixos en dejú (Guerin-Ancey, 1976; Kaushik i Oliva-Teles, 1985). Els peixos teleostis, com ara l'orada, són amoniotèlics, és a dir, són capaços d'excretar l'amoni directament a l'aigua a través de les brànquies (Wilkie 1997, 2002; Weihrauch et al, 2009). Aproximadament un 50 % del nitrogen procedent d'aminoàcids de la dieta se secreta en les següents 24 hores (Ip et al, 2004c; Lim et al, 2004), tot i que en condicions mediambientals adverses alguns peixos redueixen la seva taxa de producció d'amoni provinent del catabolisme d'aminoàcids (Ip et al, 2001, 2004a,b; Lim et al, 2001).

1.2.3.1 Vies de desaminació

L'amoni es produeix a través de les vies de desaminació dels aminoàcids: la transdesaminació, la desaminació directa dels aminoàcids i el cicle dels nucleòtids purina (figura 3). Els passos limitants en cada procés (distribució subcel·lular i transport de l'aminoàcid al compartiment on es troba l'enzim) determinen el catabolisme dels aminoàcids. En peixos, el glutamat és principalment desaminat per produir amoni, mentre

que en mamífers es transamina a aspartat (Walton i Cowey, 1977; Campbell i Vorhaben, 1983), i la via de desaminació que segueix depèn de l'espècie. El glutamat és oxidat a través de la glutamat deshidrogenasa (GDH, EC1.4.1.3) en fetge de carpí daurat (*Carassius auratus*) (van Waarde i Henegouwen, 1982), truita irisada (Walton i Cowey, 1977), llobarro (Peres i Oliva-Teles, 2006) i bagre jundià (*Rhamdia quelen*) (Bibiano Melo et al, 2006). En mitocondris de fetge de truita i peix gat, el 40 % del glutamat és transaminat a aspartat, mentre que la resta és desaminat (Campbell i Vorhaben, 1983). Estudis en besuc de la taca (*Pagellus bogaraveo*) mostren que un suplement de glutamat en la dieta disminueix l'activitat desaminativa de la GDH (Figueiredo-Silva et al, 2010). De manera similar, estudis realitzats en orades alimentades amb dietes suplementades amb glutamina, glutamat i albúmina mostren una regulació afectada diferencialment per la composició de la dieta, de manera que l'activitat oxidativa de la GDH incrementa al subministrar-los dietes suplementades amb glutamina i albúmina, mentre que l'activitat reductora de la GDH disminueix amb el suplement de glutamina i glutamat (Caballero et al, 2015).

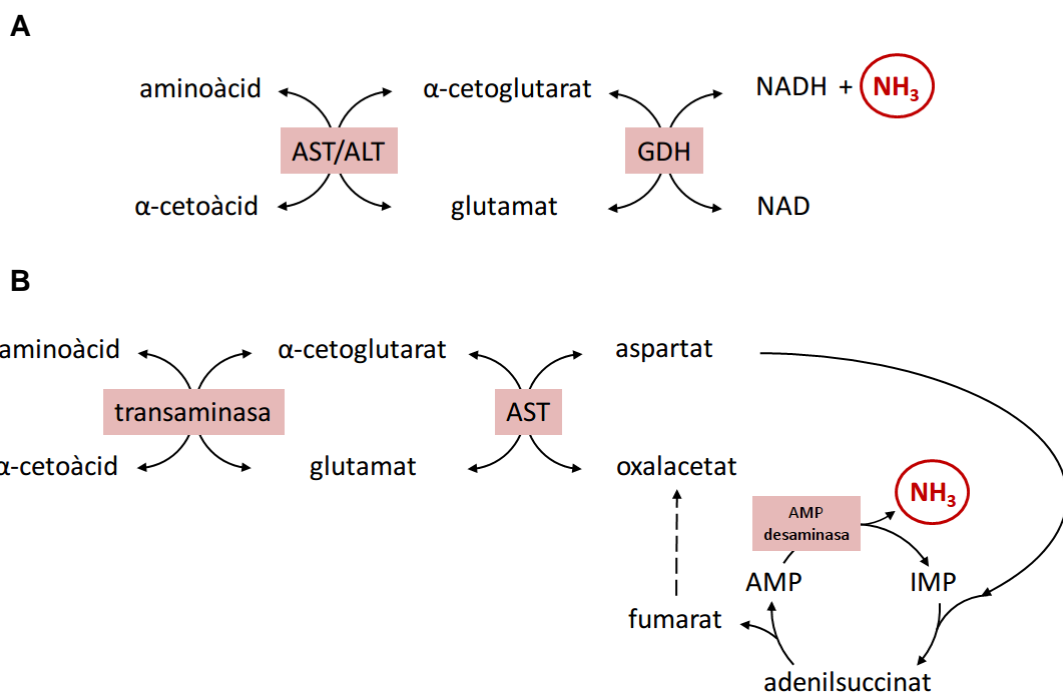


Figura 3. Producció d'amoni a partir d'aminoàcids. Es representen les dues vies majoritàries de desaminació, la transdesaminació (A) i el cicle de nucleòtids purina (B).

Transdesaminació. La via majoritària de desaminació d'aminoàcids és la transdesaminació. Consisteix en una reacció on el grup amino de l'aminoàcid és transferit a α -cetoglutarat per formar glutamat, i aquest serà desaminat posteriorment per la GDH (Braunstein, 1957). Aquest procés es duu a terme principalment al fetge, on aquestes activitats enzimàtiques són més elevades, encara que també es troben en altres teixits, com ara l'intestí, el ronyó i el múscul (van den Thillart i van Raaij, 1995; Anderson et al, 2002). Les dues transaminases més importants quantitativament en el fetge de peixos són l'aspartat aminotransferasa (AST; EC2.6.1.1) i l'alanina aminotransferasa (ALT; EC2.6.1.2). La GDH és un enzim mitocondrial en peixos, i és activat al·lostèricament per ADP, AMP i leucina, i inhibit per ATP i GTP. Durant els períodes en què els nivells d'ATP són baixos i els d'ADP alts, la desaminació oxidativa dels aminoàcids serà major. La leucina activa preferentment la direcció d'aminació (Jurss i Bastrop, 1995).

Desaminació directa. La desaminació directa d'aminoàcids específics involucra enzims com ara la histidinasas, l'asparaginasas, la serina deshidratasa, la treonina deshidratasa i la glutaminasa, així com la mateixa GDH. Exceptuant la GDH, les activitats i distribució d'aquests enzims en teixits de peix és insuficient per a considerar-los contribuents importants en la producció d'amoni (van Waarde, 1983).

Cicle de nucleòtids de purina. La reacció s'inicia amb la una transaminació, que donarà lloc a la formació de glutamat. El glutamat serà transaminat per l'AST, resultant en la formació d'aspartat. Aquest pot incorporar-se al cicle dels nucleòtids de purina reaccionant amb l'inosina monofosfat (IMP) per formar adenilsuccinat. L'adenilsuccinat pot formar AMP amb l'alliberació de fumarat, que pot ésser a la vegada convertit a oxalacetat a través del cicle de TCA. L'AMP desaminasa utilitza AMP per formar de nou IMP, alliberant amoni en el procés (Lowenstein, 1972). El cicle de nucleòtids purina té un paper important regulant la càrrega energètica de la cèl·lula controlant els nivells d'AMP. L'AMP desaminasa és considerada l'enzim clau de la via, i es troba en nivells elevats al múscul esquelètic blanc (Kaletha et al, 1991; Raffin et al, 1993; Lushchak et al, 1998, 2008).

1.2.4 Gluconeogènesi a partir d'aminoàcids

El fetge és un òrgan important per a la gluconeogènesi en peixos, amb els aminoàcids com a font majoritària de carboni. Com en el cas dels mamífers, la gluconeogènesi a partir de l'alanina és quantitativament la més important en peixos (French et al, 1981), encara que les taxes de síntesi de glucosa a partir d'aminoàcids en hepatòcits aïllats de truita segueix l'ordre: serina > asparagina > alanina > glicina > prolina > valina (French et al, 1981). Aquest fet

suggereix la possibilitat de què la serina sigui més important que l'alanina per a la gluconeogènesi en peixos, tot i que no s'ha establert una correlació d'aquest resultat *in vivo*, i els nivells de serina en plasma són baixos (Suarez i Mommsen, 1987). Segons l'espècie, la importància de la gluconeogènesi a partir d'aminoàcids depèn de la disponibilitat de lactat. La recuperació de períodes d'anòxia o d'exercici requereix la síntesi de glucogen a partir de lactat (Hochachka i Somero, 1984). Les taxes de gluconeogènesi a partir d'aminoàcids en hepatòcits de truita són menors que les taxes a partir de lactat com a font de carboni (French et al, 1981); d'altra banda, en hepatòcits de bonítol ratllat (*Katsuwonus pelamis*), la gluconeogènesi a partir d'alanina supera la del lactat (Buck et al, 1992).

1.3 Alanina aminotransferasa

El pas inicial en la degradació de la majoria d'aminoàcids, un cop arribats al fetge, consisteix en l'eliminació dels grups α -amino, catalitzada per transaminases. En la transaminació, es transfereix el grup amino de l'aminoàcid a l' α -cetoglutarat, deixant el corresponent α -cetoàcid anàleg de l'aminoàcid i glutamat. L'efecte de les reaccions de transaminació és transferir el grup amino de diversos aminoàcids a α -cetoglutarat per formar L-glutamat, i utilitzar-lo posteriorment com a donant de grups amino per a altres rutes biosintètiques o d'excreció. La majoria de transaminases són enzims específics per a l' α -cetoglutarat com a acceptor de grups amino, però difereixen en la seva especificitat per l'aminoàcid. Els diferents enzims s'anomenen en funció del donant del grup amino.

Les reaccions catalitzades per les transaminases són reversibles, i presenten un mateix grup prostètic, el piridoxal-5-fosfat (PLP), i un mecanisme de reacció similar, del tipus *Ping-Pong Bi-Bi*.

El PLP funciona com un transportador intermediari de grups amino en el centre actiu de l'enzim. Experimenta transformacions reversibles entre la forma piridoxal fosfat, que pot acceptar un grup amino, i la forma piridoxamina fosfat, que pot cedir el seu grup amino a un α -cetoàcid. El piridoxal fosfat està generalment unit de manera covalent al lloc actiu de l'enzim a través d'una base de Schiff, entre el seu propi grup carbonil i el ϵ -amino d'un residu de lisina de l'enzim. El PLP és la forma activa de la piridoxina o vitamina B6, i és freqüentment descrit com el coenzim més versàtil de la natura. Nombrosos enzims que catalitzen reaccions de síntesi, catabolisme i interconversió d'aminoàcids requereixen el PLP com a coenzim (Snell, 1990; Leklem, 1991).

Les reaccions amb un mecanisme d'acció de tipus *Ping-Pong Bi-Bi* consisteixen en la unió d'un dels substrats al centre actiu de l'enzim, seguit de la unió del segon substrat una vegada el primer producte ha sortit del centre actiu (figura 4). El primer substrat reacciona, i a continuació el producte ha d'abandonar el centre actiu abans que s'hi pugui unir el segon substrat. D'aquesta manera, l'aminoàcid entrant s'uneix al lloc actiu, cedeix el seu grup amino al PLP i surt en forma d' α -cetoàcid. A continuació s'uneix l' α -cetoàcid entrant, accepta el grup amino de la piridoxamina fosfat, i surt en forma d'aminoàcid. (Lehninger et al, 2000).

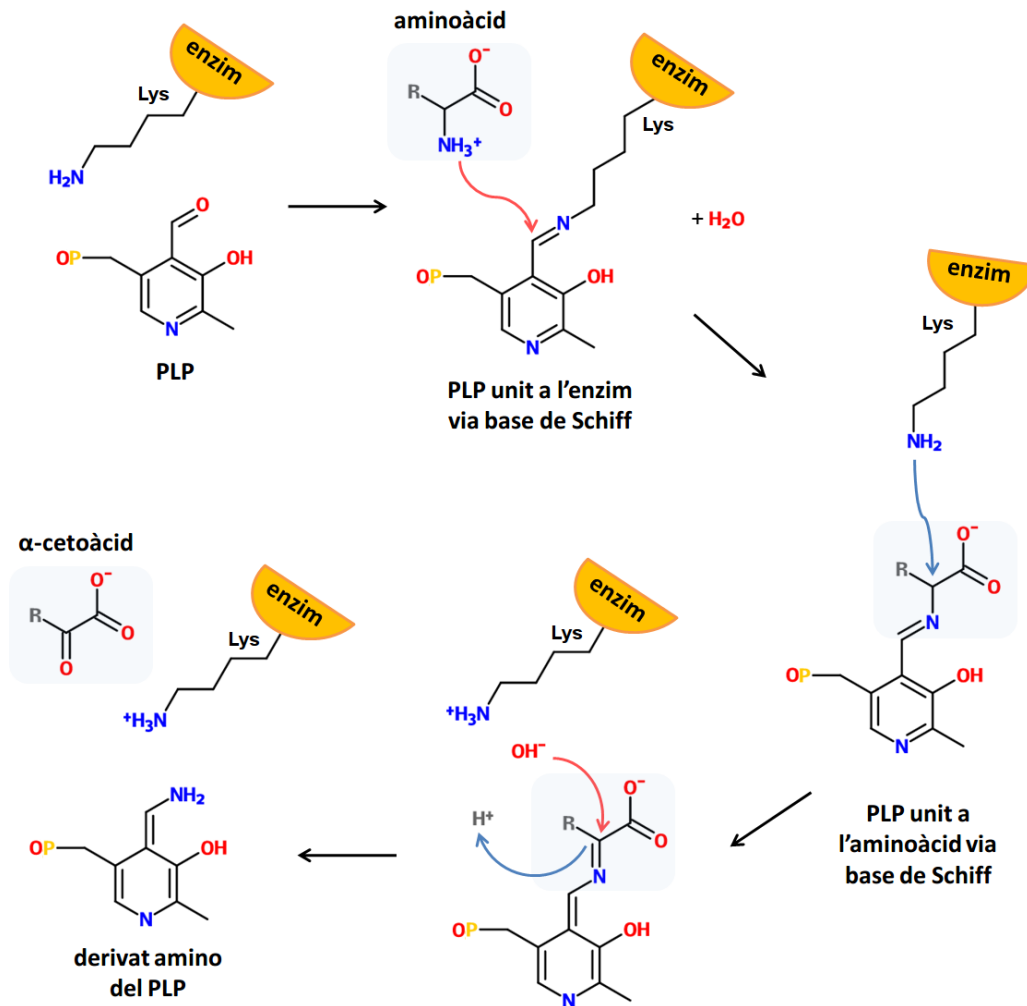


Figura 4. Reacció esquemàtica del mecanisme de transaminació. Implicació del coenzim PLP. A l'inici de la reacció, el PLP es troba unit com a base de Schiff al grup amino d'un residu de lisina del centre actiu de l'enzim. La unió entre el PLP i l'enzim es trenca i el PLP forma una base de Schiff amb el grup amino de l'aminoàcid lliure. El residu de lisina de l'enzim que es troba ara lliure, captura un hidrogen de l'aminoàcid en forma de protó, la qual cosa origina que l'electró que queda s'incorpori a l'anell del PLP. S'origina una base de Schiff entre el carboni i el nitrogen, que posteriorment s'hidrolitza per donar lloc a l' α -cetoàcid i el derivat amino de la base de Schiff.

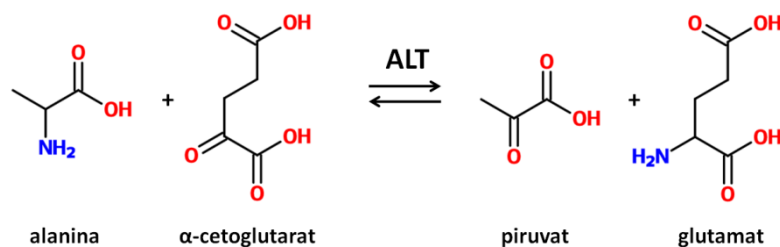


Figura 5. Reacció catalitzada per l'enzim ALT. L'ALT transfereix de manera reversible el grup amino de l'alanina a l' α -cetoglutarat per formar piruvat i glutamat.

L'alanina aminotransferasa, també coneguda com a glutamat piruvat transaminasa (GPT, EC 2.6.1.2), catalitza la reacció reversible de transferència del grup α -amino de l'alanina al grup

ceto de l' α -cetoglutarat per formar piruvat i glutamat (figura 5). Utilitza com a coenzim el PLP. (Welch, 1972).

L'ALT esdevé un nexa d'unió entre el metabolisme de carbohidrats i d'aminoàcids, ja que intervé en la conversió d'aquests quatre metabòlits (figura 6). L'alanina és reconeguda com l'aminoàcid més efectiu com a precursor de la gluconeogènesi hepàtica (Yamamoto et al, 1974; MacDonald et al, 1976; Rémésey et al, 1978). L'alanina és també l'aminoàcid que s'allibera principalment pel múscul esquelètic durant el dejú. Originada per transferència del grup α -amino del glutamat al piruvat, l'alanina formada passa al torrent sanguini i és recollida pel fetge. Un cop al fetge, s'utilitza per generar glucosa a partir del piruvat, en una reacció inversa catalitzada per l'ALT. Es constitueix d'aquesta manera l'anomenat cicle glucosa-alanina (Felig, 1973). Aquest cicle també és important durant l'exercici intens, quan el múscul esquelètic funciona de manera anaeròbica, produint no només amoni a partir de la degradació de proteïnes, sinó també grans quantitats de piruvat derivat de la glicòlisi. L'ALT també pot tenir un paper important en la síntesi del glutamat, un important neurotransmissor en el cervell (Peng et al, 1991). En peixos, l'alanina i l'aspartat són els principals precursors gluconeogènics i substrats energètics (Li et al, 2009). En diferents òrgans de peixos, l'alanina és un donant de nitrogen per al metabolisme d'aminoàcids (Mommsen et al, 1980).

A banda del seu paper en el metabolisme d'aminoàcids i en l'equilibri energètic en situacions de dejú i exercici intens, l'ALT podria estar implicada en processos immunològics. L'expressió de l'ALT de la família dels *Amphioxus* (anomenada AmphiALT) s'indueix en presència de lipopolisacàrid (LPS), una molècula característica de la paret bacteriana de gram-negatiu (Lun et al, 2006). Posteriorment, s'ha demostrat que la proteïna recombinant AmphiALT inhibeix el creixement d'*Escherichia coli* i en causa la seva lisi per interacció amb l'LPS (Jing i Zhang, 2011). De manera similar, es va observar un increment significatiu en l'activitat ALT en rates tractades amb LPS (Kim i Kim, 2002) i en ratolins infectats amb el patogen oportunista *Aeromonas hydrophila* (Brenden i Huizinga, 1986).

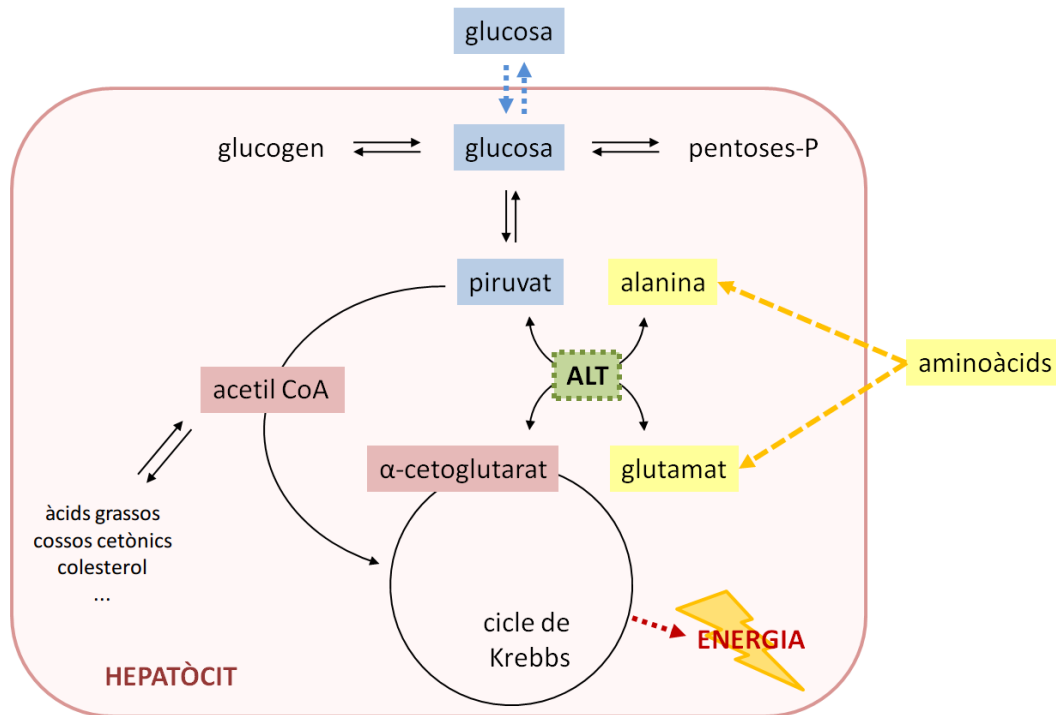


Figura 6. L'ALT representa un nexe d'unió molecular entre el metabolisme de carbohidrats, d'aminoàcids i l'energètic. En peixos carnívors, on la dieta natural és rica en proteïnes i pobra en carbohidrats, els aminoàcids constitueixen la major font d'energia. Les cèl·lules del fetge utilitzen els aminoàcids com a font d'energia, ja sigui directament per l'oxidació dels esquelets carbonats, o indirectament mitjançant la conversió de l'esquelet carbonat en glucosa. Els aminoàcids es poden utilitzar també en la síntesi de greixos (Jürss i Bastrop, 1995).

1.3.1 Isoformes de l'ALT

L'ALT és un enzim altament conservat durant l'evolució dels organismes procarïotes i eucariotes (Brown i Voelker, 1980; Metón et al, 2004b; Miyashita et al, 2007; García-Campusano et al, 2009). Els primers estudis bioquímics en mamífers varen indicar la presència d'isoformes ALT solubles en citoplasma i mitocondris. Mitjançant tècniques cromatogràfiques es va reportar la separació de dues activitats ALT (Katunuma et al, 1962; Takeda et al, 1964). Utilitzant la centrifugació diferencial d'homogenats de fetge de rata es va mostrar que la major part de l'activitat ALT es trobava al citosol, mentre que tan sols un 10 – 20 % de l'activitat total estava present a la fracció mitocondrial (Hopper i Segal, 1964; Swick et al, 1965).

En vertebrats s'han reportat les seqüències de cDNA que codifiquen per a isoenzims ALT d'humans, ximpanzé comú (*Pan troglodytes*), bou (*Bos taurus*), rata (*Rattus norvegicus*), ratolí (*Mus musculus*), gos (*Canis lupus familiaris*), granota (*Xenopus laevis*), amfiox asiàtic (*Branchiostoma belcheri*), peix zebra (*Danio rerio*), salmó (*Salmo salar*), i orada (Sohocki et al, 1997; Klein et al, 2002; Yang et al, 2002; Jadhao et al, 2004; Metón et al, 2004b; Rajamohan et al, 2006; Steinke et al, 2006; Anemaet et al, 2008; Zimin et al, 2009; Leong et al, 2010; Kim et al,

2011; Jing i Zhang, 2011). Dues isoformes ALT, ALT1 i ALT2, codificades per gens diferents, s'han clonat a partir d'humà, ratolí i rata (Sohocki et al, 1997; Yang et al, 2002; Jadhao et al, 2004; Yang et al, 2009). El gen ALT1 humà fou clonat a partir de la seqüència citosòlica de l'ALT hepàtica (Ishiguro et al, 1991b) i es troba situat al cromosoma 8q24.3 (Sohocki et al, 1997). Es va clonar un altre isoenzim ALT humà, ALT2 (Yang et al, 2002), i es va situar al cromosoma 16q12.1. El processament alternatiu d'ALT2 pot donar lloc a una proteïna de 523 aminoàcids (ALT2_1) o, degut a un codó alternatiu, una proteïna més curta de 423 aminoàcids (ALT2_2). Mitjançant detecció per *Western blot* es va demostrar posteriorment que ALT2 presenta una localització mitocondrial (Glinghammar et al, 2009).

Els isoenzims ALT1 i ALT2 **humans** presenten diferent distribució tissular, suggerint un paper dependent de teixit pels isoenzims ALT. Estudis de *Northern blot* indiquen que l'ALT1 humana s'expressa majoritàriament en ronyó, i en nivells moderats en fetge, múscul i cor. L'ALT2 humana es troba preferentment en múscul, greix, ronyó i cervell, i en menor mesura en fetge i glàndula mamària (Yang et al, 2002). Els anàlisis per *Western blot* indiquen que ALT1 s'expressa majoritàriament en fetge, múscul esquelètic, ronyó i en menor quantitat en cor, mentre que ALT2 ho fa en cor i múscul esquelètic. Mitjançant estudis immunohistoquímics s'ha observat expressió d'ALT1 en hepatòcits i cèl·lules epitelials derivades dels túbuls renals i la glàndula salival, mentre que ALT2 es troba a l'escorça de la glàndula adrenal, cossos neuronals, miòcits cardíacs, fibres de múscul esquelètic i pàncrees endocrí. Addicionalment, assajos d'immunoprecipitació demostren que ALT1 és la isoforma predominant en fetge humà, i la que contribueix de manera més important als nivells basals circulants d'activitat ALT en humans (Lindblom et al, 2007).

Les isoformes de **ratolí** corresponents a les isoformes ALT humanes ALT1 i ALT2 van ésser clonades posteriorment (Jadhao et al, 2004). Els gens *alt1* i *alt2* murins es van localitzar als cromosomes 15 i 8 respectivament. El missatger murí ALT1 s'expressa principalment en fetge, i en menor proporció en teixit adipós blanc, intestí i còlon. D'altra banda, l'mRNA d'ALT2 s'expressa en quantitats elevades en múscul, fetge i teixit adipós blanc, i en nivells moderats en cervell i ronyó. L'expressió d'ALT1 i ALT2 de ratolí en *E. coli* confirmaren que els cDNAs murins d'ALT1 i ALT2 codifiquen enzims funcionals.

Les isoformes de **rata** corresponents a les isoformes ALT humanes ALT1 i ALT2 es van clonar uns anys més tard (Yang et al, 2009). Estudis de qRT-PCR mostraren que ALT1 es troba àmpliament distribuïda en els teixits analitzats, presentant una major expressió en intestí prim i fetge, en menor mesura en teixit adipós marró, teixit adipós blanc, cor, múscul i còlon, i en baixa quantitat en ronyó i cervell. L'expressió d'ALT2 és més restringida i presenta major

expressió en múscul i fetge, seguidament en teixit adipós blanc i cervell, i en menor quantitat en cor, ronyó i còlon. Els experiments de *Western blot* corroboraren el patró de distribució dels estudis previs d'expressió. La proteïna ALT1 és present de forma majoritària en intestí, múscul, fetge i teixit adipós blanc i marró, mentre que ALT2 es troba fonamentalment en fetge, múscul, i en menor proporció en cervell i teixit adipós. En fetge de rates mascle hi ha 4 vegades més proteïna ALT2 que en femelles, éssent l'activitat ALT un 30 % més elevada. En fetge de rates sotmeses a dejú es va indicar l'existència de dues isoformes citosòliques d'ALT, de masses moleculars corresponents a 17.7 i 112.2 KDa (Vedavathi et al, 2004).

El cDNA d'ALT1 de **gos** va ésser expressat en *E. coli* amb una cua d'histidines a l'extrem N-terminal (Rajamohan et al, 2006). L'activitat de l'enzim recombinant ALT1 purificat fou de 229.81 U/mg de proteïna, unes 38 vegades superior a l'activitat total soluble en els lisats d'*E. coli* control, fet que confirma que el cDNA clonat codifica una proteïna funcional. La determinació per RT-PCR dels nivells de missatger d'ALT1 en teixits canins revelaren que s'expressa de forma predominant en cor, fetge, greix, cervell, intestí i ronyó. Una anàlisi d'immunoblot amb anticossos específics va mostrar que ALT1 és present al fetge, i que tant ALT1 com ALT2 es detecten al múscul (Miyazaki et al, 2009).

El nostre grup va reportar el clonatge i la localització subcel·lular de dos isoenzims ALT a partir de fetge d'**orada**, anomenats cALT i mALT, corresponents a les isoformes citosòlica i mitocondrial, respectivament (Metón et al, 2004b). La isoforma mALT presenta una regió N-terminal que conté un pèptid senyal de direcció a mitocondri, i va ésser la primera seqüència reportada per a una ALT mitocondrial en animals. Posteriorment es va clonar una tercera isoforma, cALT2, de localització citosòlica, generada per processament alternatiu del gen cALT (Anemaet et al, 2008). Les isoformes citosòliques cALT1 i cALT2 es diferencien per la presència en cALT2 d'un exó extra de 85 pb, que inclou un nou inici de traducció que dóna lloc a 23 aminoàcids addicionals a l'extrem N-terminal de l'enzim. Aquest pèptid N-terminal presenta una regió rica en asparagines, que podria estar involucrada en processos d'interacció proteïna-proteïna. En relació a la distribució tissular, estudis d'RT-PCR semiquantitatiu en teixits d'orades alimentades indiquen que cALT1 s'expressa majoritàriament en fetge, cervell, múscul esquelètic, intestí i ronyó. D'altra banda, cALT2 es troba en nivells moderats en intestí, ronyó, fetge, i en menor quantitat en cervell i múscul esquelètic. La major expressió de cALT2, però, es troba en teixits on cALT1 és pràcticament indetectable, com el cor, brànquies i melsa (Anemaet et al, 2008). Estudis de qRT-PCR indiquen que la isoforma mitocondrial s'expressa majoritàriament en ronyó, en menor mesura en fetge i intestí, i de manera minoritària en brànquies, cor, cervell, múscul esquelètic, teixit adipós i melsa (Salgado et al, 2012).

1.3.2 Característiques cinètiques de l'ALT

L'activitat ALT es pot mesurar en la direcció de formació de glutamat a partir d'alanina i α -cetoglutarat (reacció directa) o bé en la direcció de formació d'alanina des de glutamat i piruvat (reacció inversa).

Estudis cinètics d'ALT de fetge de rata indiquen valors de K_m estimats per a l'alanina i l' α -cetoglutarat de 34 mM i 1.1 mM, respectivament. Considerant la reacció inversa, la K_m per al glutamat i el piruvat fou de 15 mM i 0.9 mM, respectivament (Hopper i Segal, 1964). Per a l'ALT purificada a partir de cor de porc, els valors de K_m per a l'alanina i l' α -cetoglutarat van ésser de 28 mM i 0.4 mM, respectivament (Saier i Jenkins, 1967a,b).

L'enzim mitocondrial obtingut a partir de fetge de porc va presentar un valor de K_m per a l'alanina d'1.9 mM (DeRosa et al, 1979), més d'un ordre de magnitud inferior al reportat per a l'enzim citosòlic, corresponent a 34 mM (DeRosa i Swick, 1975). La K_m per a l' α -cetoglutarat, d'altra banda, va ésser similar per a ambdós enzims. La inhibició per L-glutamat i piruvat fou descrita per a l'ALT mitocondrial aïllada de ronyó i fetge de porc (DeRosa et al, 1979), encara que no pas per l'ALT citosòlica.

Estudis posteriors van reportar les característiques cinètiques de les isoformes ALT1, ALT2 i ALT2_2 recombinants humanes expressades en *E. coli*. Mentre que la isoforma ALT2_2 no va mostrar activitat enzimàtica, les isoformes ALT1 i ALT2 recombinants presentaren una activitat semblant, d'aproximadament 81,000 U/L per mg de proteïna total. Considerant la reacció directa, ALT1 va mostrar una K_m de més del doble per a l'alanina que ALT2 (70 mM, respecte 15 mM), mentre que per a l' α -cetoglutarat, ALT-1 va mostrar una K_m unes tres vegades inferior a l'observada per ALT2 (0.4 mM respecte 1.2 mM). Per a la reacció inversa, ALT1 presenta una K_m major per al piruvat (1 mM) i una K_m menor per al glutamat (6.7 mM), comparat amb ALT2, que va exhibir una K_m de 0.3 mM per al piruvat i de 30 mM per al glutamat (Glinghammar et al, 2009).

En dues espècies de peixos d'aigua dolça, *Clarias batrachus* i *Labeo rohita*, s'han estimat les constants de Michaelis per a l'ALT citoplasmàtica purificada a partir de fetge. Les K_m per a l'alanina foren de 18.5 mM i 23.55 mM, i de 0.29 mM i 0.33 mM per l' α -cetoglutarat, respectivament (Srivastava et al, 2004).

L'expressió de les isoformes citosòliques cALT1 i cALT2 d'orada en *Saccharomyces cerevisiae* va permetre la seva caracterització cinètica (Anemaet et al, 2008). Els valors de K_m per a l'alanina i l' α -cetoglutarat són similars per a ambdues isoformes, essent de 1.82 mM i 2.21 mM per a l'alanina i de 0.048 mM i 0.051 mM per a l' α -cetoglutarat, respectivament. No obstant, la V_{max}

de la reacció directa de cALT2 és 250 vegades superior a la trobada per a cALT1. Les diferències més significatives en quant a K_m es van trobar front als substrats que intervenen en la reacció inversa. cALT2 presenta major afinitat pel glutamat i el piruvat que cALT1; essent els valors de K_m estimats per al glutamat i el piruvat de 4.53 mM i 0.154 mM per a la cALT2 i de 15.91 mM i 0.690 mM per a la cALT1. A la reacció inversa, cALT2, a diferència de cALT1, presenta inhibició a alta concentració de substrat, essent les K_i per al glutamat 34.9 mM i 36.5 mM per al piruvat. L'anàlisi de la relació d'activitat directa/inversa duta a terme amb extractes de llevats que sobreexpressen cadascuna de les isoformes mostraren que cALT2 catalitza preferentment la conversió d'alanina a piruvat. Addicionalment, estudis de mutagènesi dirigida demostraren que els residus 3 a 13 de cALT2 són essencials per dictar a l'enzim la preferència del sentit de la reacció que catalitza, de tal forma que en eliminar aquesta regió, cALT2 es comporta com a cALT1. Per altra banda, la deleció dels aminoàcids 14 a 23 de cALT2, regió on es troba un domini poliasparagina, no fa canviar el comportament de l'enzim respecte a la preferència en el sentit de la reacció a catalitzar. Posteriorment, es va expressar en *S. cerevisiae* la isoforma mitocondrial mALT (Salgado et al, 2012). Els valors de K_m per a l'alanina i l' α -cetoglutarat van ésser de 2.22 mM i 0.21 mM respectivament, valors molt similars als obtinguts per a cALT1 i cALT2 en la reacció directa. Quant a la reacció inversa, els valors de K_m estimats per als substrats glutamat i piruvat van ésser de 11.30 mM i 0.32 mM, respectivament. Aquests valors són més propers als obtinguts per a la isoforma cALT1, on s'observa també una baixa afinitat per al glutamat. Això, i el fet que la relació V_{max}/K_m sigui major per a l'alanina que per al glutamat, suggereix que mALT catalitza preferentment la reacció directa enfront la inversa.

La majoria d'estudis cinètics de l'ALT es van dur a terme amb l'enzim purificat d'extractes citosòlics i mitocondrials aïllats de diversos teixits. Els resultats obtinguts no són aparentment concordants en quant al sentit de la reacció que catalitza cadascuna de les isoformes. Aquest fet podria ésser degut en part a la presència en el citosol d'isoformes homòlogues a cALT1 i cALT2 d'orada. De fet, diversos estudis han suggerit la presència de diverses isoformes ALT en mamífers. Estudis posteriors en rata van permetre purificar i caracteritzar dues isoformes ALT citosòliques en fetge de rates sotmeses a dejú (Vedavathi et al, 2004). Ambdós enzims mostraren especificitat de substrat per a l'L-alanina amb valors de K_m de 0.51 mM i 1.14 mM, i de 0.12 i 0.17 mM per l' α -cetoglutarat, respectivament. Experiments d'isoelectroenfocament duts a terme amb l'ALT citosòlica purificada de fetge de rata i humà resulten en la separació de 3 i 4 bandes. Així mateix, s'ha reportat la presència d'una isoforma d'ALT2 produïda per ensamblament alternatiu del gen ALT2 humà (Lindblom et al, 2007). El desconeixement de la concentració dels quatre metabòlits que participen de la reacció catalitzada per ALT en

cadascun dels compartiments cel·lulars en les diferents situacions nutricionals, la manca d'estudis de metabolòmica i la possible presència d'isoformes fins ara no caracteritzades, dificulten encara la interpretació dels resultats.

1.3.3 Estructura i inhibidors

La primera informació que es va tenir a nivell d'estructura d'ALT va ésser el lloc d'unió del PLP al centre actiu de l'enzim, que es va aconseguir per homologia amb la zona d'unió del PLP determinada per a l'enzim AST mitjançant cristal·lografia per raigs X. La majoria dels aminoàcids importants que s'uneixen per enllaços d'hidrogen al PLP identificats en l'AST estan conservats en l'estructura de l'ALT. El lloc d'unió a PLP en l'ALT de fetge de rata correspon a la Lys³¹³. En l'ALT de fetge de rata la seqüència de residus compresa entre Gln³⁰³ i Arg³²² coincideix amb la seqüència de 20 residus al voltant del lloc d'unió a PLP en l'ALT de cor de rata (Tanase et al, 1979) amb l'excepció d'un únic residu, on la Tyr³¹⁵ està substituïda per una Phe. Això suggereix que la seqüència al voltant del lloc d'unió a PLP és altament conservada en l'ALT. Malgrat la baixa homologia amb l'AST, la majoria dels aminoàcids crucials per establir ponts d'hidrogen amb el PLP en ambdues formes citosòlica i mitocondrial de l'AST, també es conserven en l'ALT citosòlica de rata. La topologia de l'estructura secundària que envolta el lloc d'unió a PLP en l'AST, amb una estructura amb 7 fulles plegades β i vuit hèlixs intercalades, revelades per cristal·lografia de raigs X (Jansonius et al, 1984), probablement deuen estar conservades en l'ALT de fetge de rata.

L'enzim actiu, amb un pes molecular de 114000 Da, és un homodímer compost per dues subunitats idèntiques d'uns 55000 Da (Ishiguro et al, 1991a). La determinació de la seqüència i composició d'aminoàcids de l'enzim ALT citosòlic purificat de fetge de rata va indicar que cada subunitat consta de 495 aminoàcids i que està acetilada a l'extrem N-terminal.

Estudis recents duts a terme mitjançant la cristal·lització de la proteïna ALT d'ordi (*Hordeum vulgare*) corroboren que l'ALT es troba en forma de dímer d'aproximadament 106 KDa, comprès de dues subunitats de 53 KDa i uns 480 aminoàcids. L'estructura consta d'un braç N-terminal (residus 3 a 223), un domini petit $\alpha\beta$ (residus 24 a 64 i 356 a 481), dominat per hèlixs, i un domini gran $\alpha\beta\alpha$ (residus 65 a 355). El centre actiu, que forma un adducte amb PLP a la zona descrita anteriorment per a les altres isoformes, es troba entre aquests dos dominis. La superposició entre aquesta estructura i l'estructura determinada per a l'ALT2 humana mostra que les diferències estructurals entre ambdues estructures es troben a l'extrem N-terminal (Duff et al, 2012).

S'ha descrit que l'ALT pot ésser modificada posttraduccionalment per glicació amb glucosa o altres monosacàrids. Es va mostrar que l'ALT citosòlica de cor de porc era inhibida per sucres, essent l'ordre d'inhibició D-glucosa < D-fructosa < D-ribosa < D,L-gliceraldehid (Beranek et al 2001). De la mateixa manera, prèviament es va descriure un efecte inhibidor de l'activitat AST per glicació (Okada et al, 1994, 1997).

Per altra banda, estudis d'inhibició, de modificació d'aminoàcids i espectroscòpics amb l'ALT de rata mostraren que el PLP i els grups -SH lliures estan directament involucrats en la catàlisi enzimàtica. Antagonistes del PLP, com la hidroxilamina i l'aminooxiacetat (AOA), i compostos reactius amb grups sulfhidril, com el p-hidroxibenzoat i el clorur de mercuri, inhibiren completament l'activitat dels enzims. El glutarat i el maleat inhibiren del 65 al 80 % l'activitat, mentre que l'L-ascorbat, o-fenantrolina i EDTA mostraren una menor o absència d'inhibició (Vedavathi et al, 2004).

Estudis realitzats en el nostre grup indiquen que l'activitat ALT de fraccions citosòliques i mitocondrials obtingudes de fetge d'orada queda fortament inhibida per concentracions superiors a 10^{-2} mM d'AOA. L'anàlisi *in vivo* de l'activitat ALT en els extractes citosòlics hepàtics d'orades tractades amb AOA mostra un decrement en l'activitat ALT hepàtica després de 6 hores, però no s'observa inhibició en els extractes mitocondrials. Malgrat l'AOA inhibeix l'mALT *in vitro*, aquest fet suggereix que l'AOA no és capaç d'entrar a les mitocòndries i inhibir mALT. Estudis a llarg termini incorporant AOA a la dieta van comportar la inhibició de manera significativa de l'ALT hepàtica en orades, sense afectar en els nivells de proteïna (González et al, 2012). Aquest punt és consistent amb el fet que l'AOA actua a través de la formació d'un adducte amb el cofactor PLP (Yang et al, 2008).

Diversos estudis han reportat que l'ALT mitocondrial és més inestable que no pas la citosòlica. La inestabilitat de la isoforma mitocondrial de fetge de rata va dificultar els esforços per purificar-la (Swick et al, 1965). L'ús de trehalosa durant l'extracció va millorar l'estabilitat de l'mALT, mentre que els inhibidors de proteases no van tenir cap efecte (Mukorah et al, 1998). Estudis recents també posen de manifest aquesta característica, mostrant que l'ALT2 humana recombinant és més sensible a la temperatura que ALT1, tot i que mostra una major estabilitat en presència de glicerol (Liu et al, 2009). De fet, la major estabilitat d'ALT2 en glicerol ja s'havia reportat anteriorment (Swick et al, 1965). La presència d'alanina, 100 mM, va ajudar a millorar l'estabilitat d'ALT2. L'ALT2 és més estable en plasma que no pas en sèrum (Glinghammar et al, 2009).

1.3.4 Regulació nutricional de l'expressió d'ALT

L'activitat ALT de fetge de **rata** és molt sensible a diferents tractaments nutricionals i hormonal. Estudis en animals diabètics o sotmesos a dejú, i després de l'administració de cortisol o la ingesta de dietes amb un alt contingut de proteïna, van evidenciar que l'activitat ALT es veu incrementada en situacions gluconeogèniques (Rosen et al, 1959, 1963). A més, els agonistes β -adrenèrgics, com ara l'epinefrina, la norepinefrina i el glucagó, indueixen l'activitat ALT en fetge de rata (Begum i Datta, 1991, 1992). En fetge de mamífers, el dejú prolongat produeix un increment de l'activitat citosòlica ALT, però no així en la mitocondrial (Swick et al, 1965).

L'anàlisi de l'expressió d'ALT1 i ALT2 en fetge de **ratolins** obesos va indicar que l'expressió d'ALT2 incrementava unes dues vegades, mentre que els nivells d'ALT1 no canviaven (Jadhao et al, 2004), assenyalant l'ALT2 com a responsable de l'increment de l'activitat ALT en sèrum de ratolins que presenten esteatosi. Posteriorment, es va mostrar que ratolins amb esteatosi hepàtica induïda mitjançant alimentació amb una dieta deficient en metionina i colina presentaven un increment en l'activitat ALT sèrica (Liu et al, 2009). L'increment de l'activitat ALT en sèrum era degut a l'increment en sèrum d'ALT1 (1.7 vegades) i ALT2 (1.9 vegades). En fetge, tant l'mRNA com les proteïnes ALT1 i ALT2 incrementaren unes 2 i 5 vegades respectivament. L'increment de l'expressió hepàtica observada per a ALT1 i ALT2 es dona de manera simultània i es correlaciona amb els increments de l'activitat ALT en sèrum, i no estaria relacionada amb la presència de dany o mort cel·lular.

ALT i AST són quantitativament les aminotransferases més importants en fetge de **peixos** teleostis (Cowey i Walton, 1989). En fetge d'orada es va trobar que l'activitat ALT disminuïa després d'un període de dejú perllongat, mentre que l'activitat AST mostrava una lleugera tendència a augmentar (Metón et al, 1999b). L'efecte del dejú prolongat en les activitats ALT i AST en altres espècies de peixos no mostra un patró clar. Alimentar els peixos amb una dieta amb alt contingut proteic incrementa les activitats AST i ALT en fetge d'orada (Metón et al, 1999b; Fernández et al, 2007). Estudis posteriors utilitzant dietes amb proporcions variables de proteïna corroboren que les majors expressions de cALT1 i cALT2 es donen en els grups d'animals alimentats amb dietes d'alt contingut de proteïna i baix contingut en carbohidrats, confirmant l'ALT com a bon biomarcador de l'ús de la proteïna de la dieta en orada (González et al, 2015). En salmó atlàntic (*Salmo salar*), l'AST no depèn del tipus de font d'energia subministrada al peix, mentre que les dietes amb alt contingut en proteïna promouen l'increment de l'activitat ALT hepàtica (Fynn-Aikins et al, 1995). També s'observà un increment en l'activitat ALT en truita irisada alimentada amb dietes proteiques (Lupiáñez et al, 1989). En

aquesta espècie, l'activitat ALT s'adapta moderadament a canvis en la dieta mentre que l'AST no varia (Sánchez-Muros et al, 1998). Les activitats ALT i AST incrementaren quan es va augmentar el contingut de proteïnes de la dieta en *Mugil capito* (Alexis i Papaparaskeva-Papoutsoglou, 1986). En alimentar peixos no carnívors, bagres juvenils (*Rhamdia quelen*), amb dietes hiperproteiques, l'activitat hepàtica ALT va incrementar en un 30 % i es van duplicar els nivells d'AST comparat amb els peixos alimentats amb dietes amb baix contingut en proteïnes (Bibiano Melo et al, 2006). Un estudi comparatiu entre l'esturió adriàtic (*Acipense naccarii*) i la truita de riu mostra que l'activitat ALT en fetge de peixos sotmesos a un dejú perllongat incrementa en la truita més que en l'esturió, i ho fa majoritàriament durant els primers dies de dejú (Pérez-Jiménez et al, 2012). Estudis d'expressió de les isoformes citosòlica i mitocondrial en llobarro van mostrar que en dejú incrementen els nivells d'mRNA i d'activitat ALT citosòlica, mentre que els nivells mitocondrials no es veuen afectats (Viegas et al, 2014). D'altra banda, en dentó (*Dentex dentex*), la inhibició de l'activitat ALT en fetge de peixos en dejú sembla ésser deguda a una estratègia protectora per prevenir l'excessiva oxidació de proteïna corporal (Furné et al, 2012).

El període de reproducció va modificar la tendència anual de canvis en l'activitat ALT i altres enzims clau involucrats en la glicòlisi i la gluconeogènesi en fetge d'orada (Gómez-Milán et al, 2007).

El nostre grup va analitzar la regulació nutricional i hormonal dels isoenzims citosòlics cALT1 i cALT2 en fetge d'orada mitjançant RT-PCR semiquantitatiu (Anemaet et al, 2008). El dejú promou una disminució significativa dels nivells d'mRNA de cALT1, mentre que l'expressió de cALT2 incrementa 2.5 vegades. La realimentació va permetre a curt termini la recuperació dels nivells de cALT2. Addicionalment, es va analitzar l'expressió dels nivells d'mRNA de cALT1 i cALT2 després de la ingesta en peixos alimentats cada 24 hores. L'expressió de cALT1 és màxima entre les 2-8 h després de la ingesta, mentre que els nivells d'expressió de cALT2, entre les 4-8 h, eren un 75 % més baixos que els observats en els peixos abans de la ingesta. En relació a l'estudi de l'efecte de la glucosa i la insulina en l'expressió de cALT1 i cALT2 en fetge d'orada, s'ha observat que, 6 hores després de l'administració de glucosa o d'insulina, els nivells de cALT2 van disminuir entre 2 i 3 vegades, mentre que els nivells de cALT1 no van variar en cap cas. D'altra banda, es va estudiar l'efecte del tractament amb estreptozotocina, un compost que origina necrosi de cèl·lules β -pancreàtiques i que és àmpliament utilitzat per generar animals diabètics (Wilson i Leiter, 1990). Després de 22 h, les orades tractades presentaven uns nivells hepàtics d'mRNA de cALT2 3 vegades superiors respecte els peixos control, mentre que l'expressió de cALT1 mostrava una tendència a disminuir. A partir

d'aquests resultats, es va concloure que l'expressió hepàtica de cALT2 incrementa en situacions gluconeogèniques, mentre que la de cALT1 és predominant durant el període postprandial per a la utilització dels nutrients de la dieta (Anemaet et al, 2008).

Estudis recents de silenciament de l'expressió de les isoformes cALT1 i cALT2 d'orada *in vivo* indiquen que, en el fetge dels animals on les isoformes citosòliques d'ALT es troben silenciades, s'estimula el flux glicolític. També s'observa una tendència a incrementar la fase oxidativa de la via de les pentoses fosfat, com a resultat de la mobilització de carbohidrats provocada per la baixa activitat d'ALT (González et al, 2015).

Pel que fa a la regulació de la isoforma mitocondrial d'ALT d'orada, anàlisis de qRT-PCR mostraren una reducció de l'expressió de l'mRNA d'mALT en ronyó d'orades sotmeses a dejú. Després de tractar les orades amb estreptozotocina, els nivells d'mRNA de la isoforma mALT van ésser significativament menors, mentre que el tractament amb insulina no va tenir efectes sobre mALT. Aquest fet suggereix que l'expressió d'mALT en ronyó podria estar implicada en l'oxidació d'aminoàcids amb finalitat energètica (Salgado et al, 2012).

1.3.5 Regulació transcripcional de l'expressió gènica

Els estudis sobre el control de l'expressió d'ALT a nivell transcripcional són escassos. En **ratolins**, la deficiència del factor de transcripció KLF15 redueix els nivells d'mRNA d'ALT1, mentre que els nivells d'ALT2 no es veuen afectats (Gray et al, 2007). De la mateixa manera, el tractament amb un shRNA contra KLF15 va produir en ratolins una disminució significativa en els nivells d'mRNA d'ALT1 hepàtic (Takashima et al, 2010). Malgrat tot, no s'ha pogut demostrar si l'acció de KLF15 és resultat d'un efecte directe sobre el promotor d'ALT1.

El tractament d'hepatòcits primaris **humans** amb àcid fenofíbric, un agonista de PPAR α , va incrementar l'expressió d'ALT1. Experiments de transfecció de cèl·lules Huh-7 amb els promotors humans ALT1 i ALT2, i assajos posteriors d'EMSA i CHIP van confirmar la unió al promotor ALT1 de PPAR α i PPAR γ , exercint un efecte activador de la transcripció, mentre que el promotor ALT2 no es va veure afectat (Thulin et al, 2008). Recentment, el nostre grup ha clonat i caracteritzat el promotor d'ALT2 humà. Els estudis demostren que ATF4 és capaç de transactivar el promotor d'ALT2 però no el d'ALT1. Experiments amb línies cel·lulars hepàtiques HepG2 i Huh-7 sotmeses a restricció d'aminoàcids i estrès a nivell de reticle endoplasmàtic suggereixen un rol específic d'ALT2 en la resposta inicial a l'estrès metabòlic mediada per ATF4 (Salgado et al, 2014).

El nostre grup va clonar i caracteritzar el promotor del gen cALT en **orada**, i va mostrar que tant p300 com c-Myb el transactiven. Els nivells d'mRNA de p300 i c-Myb incrementen en

peixos en dejú, fet que contribueix a l'activació de la transcripció de cALT2. Els peixos tractats amb insulina mostren una disminució de l'expressió de p300 i c-Myb, mentre que el tractament amb estreptozotocina comporta un augment dels nivells de p300 i una disminució dels nivells de c-Myb (Anemaet et al, 2010). Posteriorment es va clonar el promotor d'mALT i es va mostrar que HNF4 α era capaç de transactivar-lo. Assajos de qRT-PCR van evidenciar que HNF4 α era clau per al control transcripcional d'mALT en ronyó d'orades sotmeses a dejú i tractament amb estreptozotocina (Salgado et al, 2012).

1.3.6 Implicacions clíniques

L'anàlisi de l'activitat ALT en sèrum és un assaig bioquímic fàcilment disponible i econòmic, utilitzat rutinàriament en clínica (Kim et al, 2008). Nivells elevats d'ALT s'associen a situacions clíniques d'hepatitis virals i tòxiques, però també a la distròfia muscular i altres malalties musculars (Schwartz, 1971; Giannini et al, 2005). Nivells lleus o moderadament incrementats d'ALT s'observen en trastorns metabòlics, com ara l'obesitat, hiperlipidèmia o diabetis mellitus (Clark et al, 2003). Aquest fet ha dut a concloure que la mesura d'ALT no només es pot utilitzar per detectar la incidència, desenvolupament i pronòstic de malalties hepàtiques amb símptomes clínics evidents, sinó també proveir d'una referència de l'estat de salut general durant una revisió mèdica (Pratt i Kaplan, 2000; Kim et al, 2008; Ruhl i Everhart, 2012; Liu et al, 2014).

1.3.6.1 Increment de l'activitat ALT en sèrum: causes hepàtiques

Hepatitis virals. L'activitat ALT és un indicador de dany hepàtic en pacients amb hepatitis viral aguda o crònica (Rehermann i Nascimbeni, 2005), i és la primera causa d'ALT elevada en poblacions d'arreu del món (Pratt i Kaplan, 2000; Pendino et al, 2005; Chen et al, 2007). Respecte la infecció pel virus de l'hepatitis B, l'increment d'ALT s'observa en el procés de resposta immunològica citolítica i durant l'eliminació del virus (Liaw i Chu, 2009), tot i que hi ha estudis on pacients infectats amb el virus amb fibrosi i inflamació mostraven nivells d'ALT normals (Lai et al, 2007).

Consum d'alcohol. El consum excessiu d'alcohol és una altra de les causes que incrementa l'activitat ALT en la població. Tot i que el consum d'alcohol a curt termini i a dosis baixes no eleva els nivells d'ALT, hi ha diferències ètniques en les conseqüències de l'abús de consum (Wickramasinghe et al, 1995; Gunji et al, 2010).

Medicació. El tractament amb acetaminofen, amb o sense associació a hidromorfona, morfina o oxicodona, causa nivells elevats d'ALT (Pratt i Kaplan, 2000). Les estatines provoquen un suau augment dels nivells d'ALT, tot i que l'augment s'atribueix a la reducció del colesterol en els hepatòcits més que no pas disfunció o dany hepàtic (Cohen et al, 2006; Ford et al, 2011).

Consum de cafè. El consum de cafè podria ésser un factor protector enfront l'augment de l'activitat ALT, a causa de l'efecte antioxidant de la cafeïna (Lee et al, 2000; Ruhl i Everhart, 2005).

Fetge gras no alcohòlic. És en realitat un espectre de manifestacions clíniques i patològiques que van des del fetge gras a l'esteatosi hepàtica (Marchesini et al, 2003). Considerada com una manifestació del síndrome metabòlic al fetge, és una de les causes de l'ALT moderadament elevada (Giannini et al, 2005; Liangpunsakul i Chalasani, 2005).

Hepatitis autoimmune. Els nivells d'ALT són un indicador dels efectes del tractament immunosupressor, del diagnòstic i pronòstic de supervivència, i es consideren un marcador no invasiu crucial de la inflamació en pacients amb hepatitis autoimmune (Miyake et al, 2005, 2006; Fabbri i Lenzi, 2013).

1.3.6.2 Increment de l'activitat ALT en sèrum: causes no hepàtiques

Síndrome metabòlic. Els nivells elevats d'ALT sense causa aparent s'han atribuït al síndrome metabòlic (Clark et al, 2003; Liangpunsakul i Chalasani, 2005). El síndrome metabòlic presenta una sèrie de desordres, com ara la intolerància a la glucosa, obesitat, dislipidèmia i hipertensió. L'augment d'ALT causat per síndrome metabòlic és suau i negligible, tot i que augmenta de manera progressiva i acumulativa seguint una tendència lineal (Saito et al, 2009; Yun et al, 2010). Respecte les lipoproteïnes, els nivells d'ALT mostren una associació significativa amb les lipoproteïnes de densitat mitjana i amb l'apolipoproteïna B (Lorenzo et al, 2013). Aquesta associació sembla ésser independent dels efectes de la resistència a insulina i de la malaltia del fetge gras en els pacients on l'ALT es mostra elevada (Gunji et al, 2010; Yun et al, 2010). L'índex de massa corporal i la circumferència de cintura, que representen els components centrals de l'obesitat en el síndrome metabòlic, estan estretament vinculats a l'increment d'ALT (Ioannou et al, 2006; Liu et al, 2012), tot i que el mecanisme subjacent encara és desconegut. Una possible explicació és que l'obesitat, i més concretament el greix abdominal, està potencialment involucrat en les deposicions de teixit adipós visceral on es produeixen àcids grassos

hepatotòxics (Falck-Ytter et al, 2001; Ruhl i Everhart, 2003). A més, l'associació entre l'obesitat i nivells elevats d'ALT està modulada per la resistència a insulina (Vozarova et al, 2002; Park et al, 2012).

Malaltia celíaca i dany muscular. Nivells elevats crònics d'ALT es donen en desordres d'origen no hepàtic com ara en malalts celíacs o amb necrosi muscular. El mecanisme intrínsec en celíacs encara es desconeix (Jacobsen et al, 1990; Bardella et al, 1995), mentre que l'augment d'ALT en pacients amb necrosi muscular pot ésser degut al dany muscular (Janssen et al, 1989; Nathwani et al, 2005).

Hemocromatosi. És una causa poc comuna d'ALT elevada en la població, on la sobrecàrrega de ferro és la causa principal de dany hepàtic (Powell et al, 1998).

Malalties cardiovasculars. Hi ha certa controvèrsia en l'associació entre nivells d'ALT elevats i malalties cardiovasculars. Mentre que hi ha estudis que n'avalen la relació (Schindhelm et al, 2007; Goessling et al, 2008), n'hi ha d'altres que no (Monami et al, 2008; Emdin et al, 2009; Olynyk et al, 2009). La presència de participants amb infeccions hepàtiques virals i abús d'alcohol (Wang i Kao, 2010), a més de l'heterogenicitat en edat, gènere i ètnia (Adibi et al, 2007; Lioudaki et al, 2011; Schooling et al, 2012), podrien ésser la causa dels resultats aparentment contradictoris d'aquests estudis. En qualsevol cas, sembla que els nivells d'ALT no són el millor indicador per detectar la incidència d'aquestes malalties en la població.

1.4 El sistema immunitari innat en peixos

La majoria dels coneixements sobre la composició, funció i modulació del sistema immunitari es basen en treballs realitzats en mamífers (Zhu et al, 2013). No obstant això, des del punt de vista evolutiu, els peixos, i en concret els teleostis, ocupen una posició clau en el coneixement de la resposta immunitària innata i adaptativa, ja que són la primera classe de vertebrats que posseeixen els elements d'ambdues respostes. Una gran varietat d'espècies de teleostis s'ha afegit al repertori d'animals model per comprendre les funcions bàsiques de diversos components de la resposta immunitària (Whyte, 2007).

Recentment, i com a conseqüència de la introducció del peix zebra (*Danio rerio*) com a organisme model, i dels avanços en la tecnologia de seqüenciació del genoma i de la bioinformàtica, s'ha descobert la funció de gens associats a la immunitat en peixos (Lieschke i Trede, 2009; Van Muiswinkel, 2008). A més, citocines, molècules del complement, lectines, immunoglobulines i molècules de superfície s'han descrit i caracteritzat en diverses espècies de peixos (Zhu et al, 2013).

El rol principal del sistema immunitari innat és el d'ésser la primera línia de defensa contra els organismes patògens i contra qualsevol partícula forana, independentment d'exposicions prèvies al mateix material, fins que el sistema immunitari adaptatiu sigui capaç i suficient per encarregar-se'n (Fearon i Locksley, 1996; Janeway i Travers, 1997). De fet, els components de la resposta immunitària innata es troben molt conservats evolutivament en espècies que no posseeixen els elements de resposta adaptativa propis dels vertebrats (Vasta i Lambris, 2002). En peixos, la resposta immunitària innata es considera un component essencial per a què l'organisme pugui donar resposta a l'agressió externa (Dixon i Stet, 2001; Holland i Lambris, 2002), donat que la resposta immunitària adaptativa es troba limitada en el repertori d'anticossos, maduració de l'afinitat, memòria i lenta proliferació de limfòcits (Magnadóttir, 2006).

1.4.1 Receptors de patrons de reconeixement

El sistema immunitari innat utilitza receptors de patrons de reconeixement (PRR), codificats en la línia germinal, capaços de reconèixer i unir-se als patrons moleculars associats a patògens (PAMPs), com ara LPS, peptidoglicans o lectines (Bols et al, 2001; Ellis, 2001; Fujita, 2002; Medzhitov i Janeway, 2002). Fins ara s'han caracteritzat diversos PRR en diferents espècies (incloent-hi humans, rosegadors, ocells i peixos teleostis), com poden ésser els receptors de

tipus Toll (TLR), els receptors del gen 1 induïble per àcid retinoic (RIG-I), els receptors amb dominis d'oligomerització d'unió a nucleòtids (NOD), i els receptors de lectines.

Els TLR són els principals inductors del sistema immunitari innat. Inicien la transducció del senyal intracel·lular que resultarà en l'expressió de gens involucrats en inflamació, resposta antiviral i maduració de cèl·lules dendrítiques. Cada tipus de TLR activa una via específica de resposta enfront microorganismes, entre les quals es troben l'activació del factor nuclear κ B (NF- κ B) amb la resultant producció de citocines antiinflamatòries, o la inducció de la producció d'interferó (IFN) de tipus 1 (Gerlier i Lyles, 2011; Kawai i Akira, 2005, 2011; Kumar et al, 2011). Fins ara, s'han descrit 10 TLR en humans, i 12 en ratolins, mentre que en teleostis se'n troben fins a 17, alguns dels quals són únics en peixos (Palti, 2011). Els TLR caracteritzats en teleostis han demostrat tenir diferents característiques i major diversitat en comparació amb els mamífers (Baoprasertkul et al, 2007; Palti, 2011; Sangrador-Vegas et al, 2000; Wu et al, 2008; Yang i Su, 2010).

Els receptors tipus RIG-I són els responsables de la detecció de l'RNA viral citoplasmàtic, i la cascada de senyalització que activen acaba amb la producció de citocines proinflamatòries i IFN tipus 1 (Eisenächer i Krug, 2011). Diversos membres de la família dels receptors tipus RIG-I s'han clonat en teleostis (Chang et al, 2011; Rajendran et al, 2012b), tot i que els mecanismes específics involucrats en aquesta via encara no estan clars en peixos.

Els receptors tipus NOD utilitzen dos mecanismes per dur a terme la seva funció: activen les vies de senyalització de NF- κ B i MAPK; activen la caspasa-1, que provoca la secreció d'interleucina (IL) 1b i la mort cel·lular programada (Ogura et al, 2006; Wilmanski et al, 2008). Membres d'aquesta família de receptors s'han descobert en teleostis, mostrant resposta a patògens específica en diferents teixits (Laing et al, 2008; Rajendran et al, 2012a).

1.4.2 Molècules del complement

El sistema del complement consisteix en més de 30 proteïnes secretades o de membrana, on les seves interaccions juguen un paper essencial en la lluita contra patògens. Hi ha tres maneres diferents d'activar el complement a la superfície dels patògens invasors: la via clàssica, la via de les lectines i la via alternativa. La via clàssica s'inicia amb la unió d'un anticòs a la superfície cel·lular, mentre que la via alternativa s'activa directament per virus, bacteris o fongs, i és independent d'anticòs. La via de les lectines, enlloc d'ésser activada per anticossos, s'inicia amb la unió d'un complex proteic consistent en una lectina d'unió a manosa (MBL) i una serina proteasa associada a MBL (MASP), als residus de manosa de la superfície cel·lular dels bacteris (Holland i Lambris, 2002).

Encara que la iniciació de cada procés depèn d'elements diferents, els tres condueixen als trencament proteolític del component 3 del complement (C3) per formar un fragment bioactiu, que mediarà la majoria de les activitats biològiques: opsonització de l'agent invasor, reclutament de cèl·lules fagocítiques i formació de complexos de desestabilització de membrana dels patògens (Gros et al, 2008). A més, algunes molècules del complement poden tenir importància en la immunitat adaptativa, la memòria immunològica, i fins i tot en la regeneració de teixits i creixement de tumors (Carroll i Iseman, 2012; DeAngelis et al, 2006; Markiewski et al 2008; Qu et al, 2009).

El sistema del complement ha arribat al seu major nivell de complexitat en els vertebrats, com a resultat de la pressió de selecció positiva iniciada en la història evolutiva dels teleostis (Meng et al, 2012). Les molècules del complement s'han investigat en la majoria d'espècies de teleostis, on funcionen a baixes temperatures i títols molt superiors que en mamífers (Boshra et al, 2006; Melillo et al, 2015). A més, C3 es troba present en diferents isoformes, independentment de la duplicació del genoma del teleosti. Així, trobem dues isoformes en el llobarro (Mauri et al, 2001), vuit en peix zebra (Forn-Cuni et al, 2014), o cinc en orada (Sunyer et al, 1997). Les isoformes difereixen en paràmetres fisicoquímics i en els llocs funcionals, fet que suggereix que els dona l'habilitat d'unir-se a diferents superfícies d'activació del complement (Sunyer et al, 1998).

Encara que homòlegs de MBL s'han caracteritzat en diferents teleostis, com ara membres de la família de la carpa (Vitvet et al, 2000; Nakao et al, 2006), el turbot (Zhang et al, 2010) el peix gat (Zhang et al, 2011), la truita irisada (Kania et al, 2010) i una altra espècie de truita (*Schizothorax richardsonii*) (Goel et al, 2015), encara falten evidències per confirmar l'existència de la via de les lectines en peixos.

1.4.3 Pèptids antimicrobians

Els pèptids antimicrobians són àmpliament presents en plantes, invertebrats i vertebrats. Des del descobriment del primer pèptid antimicrobià (Steiner et al, 1981), més de 1000 nous pèptids s'han anat afegint contínuament a les bases de dades. L'ampli espectre de molècules en peixos teleostis és similar al trobat en mamífers, i fa pensar que funcionen com la primera línia de resposta antimicrobiana (Zhu et al, 2013). Els mecanismes antibacterians dels pèptids antimicrobians es basen en la unió selectiva a la membrana bacteriana, formant canals transmembrana i destruint la integritat de la membrana, o bé l'entrada directa dins el bacteri per interactuar amb dianes intracel·lulars, i així interferir amb el creixement i metabolisme bacterià. Ambdós mecanismes conduiran a la mort del bacteri (Wimley, 2010).

Els pèptids antimicrobians s'han trobat en teixits d'algunes espècies de teleostis, com ara el mucus, el fetge i les brànquies (Cole et al, 1997; Fernandes i Smith, 2002; Zhang et al, 2004; Bao et al, 2005; Park et al, 2005). La majoria dels grups de pèptids antimicrobians estudiats en peixos inclouen les defensines (Zhu i Gao, 2013; Marel et al, 2012), les NK-lisines (Wang et al, 2006a,b) i l'hhepcidina (Ren et al, 2006; Chen et al, 2007; Bo et al, 2011), tot i que se n'ha documentat molts d'altres. Un estudi en bacallà (Bergsson et al, 2005) va identificar polipèptids catiònics bactericides (histones i proteïnes ribosomals), a més d'una gran varietat de components antimicrobians sense identificar.

1.4.4 Citocines

Les citocines són una família de proteïnes de baix pes molecular que són secretades per l'activació de cèl·lules del sistema immunitari en resposta a diversos patògens (Salazar-Mather i Hokeness, 2006). Les citocines poden ésser secretades per macròfags, limfòcits, granulòcits, cèl·lules dendrítiques, mastòcits i cèl·lules epidèrmiques, i es poden dividir en IFN, IL, factors de necrosi tumoral (TNF) i quimiocines (Savan i Sakai, 2006). En la immunitat innata, els macròfags poden secretar diferents IL, TNF i quimiocines, indispensables per a què es reclutin macròfags, neutròfils i limfòcits als teixits infectats i s'activi l'eliminació del patogen (Svanborg et al, 1999). Mentrestant, les citocines alliberades pels fagòcits en els teixits indueixen les proteïnes de fase aguda i promouen la migració de cèl·lules dendrítiques (DeVries et al, 1999).

Malgrat la baixa identitat entre les seqüències, els peixos posseeixen un repertori de citocines similar al trobat en mamífers (Plouffe et al, 2005). Diferents homòlegs de citocines s'han clonat en diverses espècies de peixos, entre les quals es troben el TNF- α i TNF- β (Savan et al, 2005), IL-1b, IL-2, IL-4 i IL-6, entre d'altres ILs (Zou et al, 1999; Fujiki et al, 2000; Bird et al, 2005a,b; Li et al, 2007), IFN- γ (Igawa et al, 2006) i diverses quimiocines. En orada es troben descrites les citocines TNF- α (García Castillo et al, 2002), IL-1b (Pelegrín et al, 2001), IL-6 (Castellana et al, 2008), IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 i IL-34 (Pérez-Cordón, 2014), entre d'altres.

1.4.5 Lectines

Les lectines són un grup de proteïnes d'unió a sucres, capaces d'unir-se específicament als carbohidrats que es troben presents en les estructures de biomembranes a través dels dominis d'unió a carbohidrats (CRD), independentment d'enzims i immunoglobulines. La combinació de diferents CRD en una mateixa lectina, conjuntament amb altres dominis, permet no només el reconeixement de carbohidrats de possibles patògens, sinó també de la superfície de cèl·lules immunocompetents (Kilpatrick, 2002, Gupta, 2012).

Es troben presents en gairebé tots els éssers vivents, incloent-hi virus, bacteris, fongs, plantes i animals. En animals, la seva habilitat per unir-se als sucres terminals de glicoproteïnes i glicolípidis les converteix en importants receptors de patrons de reconeixement, i són capaces d'induir l'opsonització i fagocitosis dels agents invasors, activar les plaquetes, iniciar el sistema del complement i potenciar l'activitat de cèl·lules *natural killer* (Yu, 2003; Osorio i Reis e Sousa, 2011), a més de regular diverses funcions de la resposta immune adaptativa (van Vliet et al, 2008). S'han identificat en animals un total de 15 famílies, depenent de l'afinitat al carbohidrat que presentin. S'ha demostrat l'existència de C-lectines, galectines, F-lectines, lectines d'unió a ramnosa i intelectines en diverses espècies de peixos (Vasta et al, 2011).

1.5 Secreció de proteïnes

El sistema de secreció de membrana permet a la cèl·lula regular l'alliberament de proteïnes, carbohidrats i lípids sintetitzats *de novo* cap a la superfície cel·lular. Aquest sistema inclou diferents orgànuls, com ara el reticle endoplasmàtic (ER), l'aparell de Golgi i la membrana plasmàtica) i el sistema de transport tubulovesicular, que s'encarrega de mediar el transport intracel·lular entre les diferents membranes. El transport de membrana d'aquest sistema flueix en rutes altament organitzades. El conjunt de molècules destinades a la secreció, o càrrega secretora, se sintetitzen i acoblen a l'ER, i es transporten seguidament a l'aparell de Golgi per al seu processament i maduració. Quan arriba a la xarxa *trans* Golgi (TGN), la càrrega secretora s'empaqueta en transportadors que es mouen pel citoplasma fins a fusionar-se amb la superfície cel·lular (Lippincott-Schwartz et al, 2000). A la figura 7 es mostra una visió general del sistema de secreció.

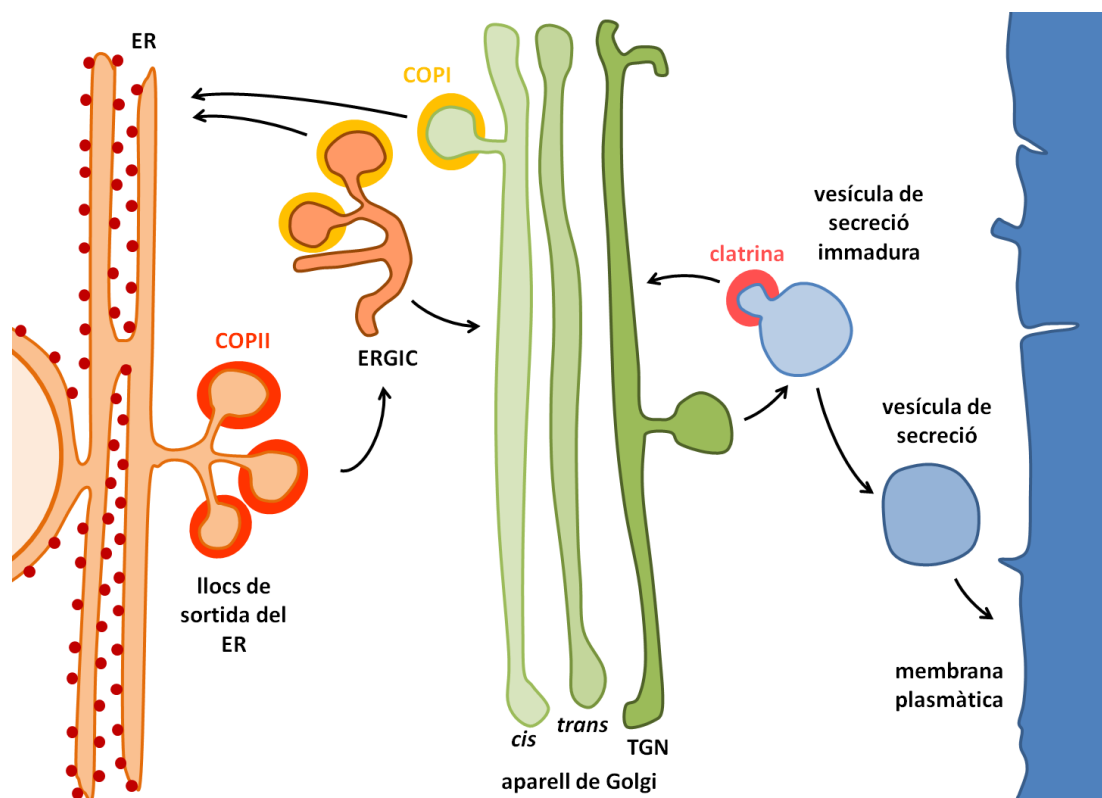


Figura 7. Visió general del sistema de secreció. La càrrega secretora parteix dels llocs de sortida de l'ER marcats amb les proteïnes de recobriment COPII, i forma l'ERGIC, que posteriorment es fusionarà a la zona *cis*-Golgi. La càrrega serà transportada pels diferents compartiments de l'aparell de Golgi fins al TGN, d'on s'escindirà per formar les vesícules de secreció, que seran conduïdes i fusionades a la membrana plasmàtica. La representació mostra també dues vies de reciclatge, mediades per les proteïnes de recobriment COPI i clatrina. Els diferents passos s'indiquen amb fletxes negres. Les principals proteïnes de recobriment implicades en el transport es mostren en taronja fosc (COPII), taronja clar (COPI) i rosa (clatrina), en les seves suposades localitzacions. Imatge adaptada de Bonifacino i Glick, 2004.

Estudis morfològics clàssics en cèl·lules fixades han permès entendre l'organització i distribució de les estructures que conformen el sistema secretor de membrana (Palade, 1975), mentre que estudis genètics i bioquímics han donat una visió dels mecanismes moleculars de regulació del procés (Schekman i Orci, 1996; Rothman i Wieland, 1996).

L'ER és el punt de sortida de les vies de secreció. És el compartiment intracel·lular més gran, amb una xarxa interconnectada de membranes tubulars i cisternes, que s'estenen des de la membrana nuclear. Entre les seves funcions es troben el plegament de proteïnes, el seu acoblament i degradació, metabolisme de lípids, compartimentació del nucli i transport de membrana (Lippincott-Schwartz et al, 2000). Després de la traducció, les proteïnes sintetitzades es troben amb les proteïnes xaperones, encarregades de les reaccions necessàries per al plegament, maduració i oligomerització de les noves proteïnes (Helenius et al, 1992). L'ER juga un paper molt important en el control de qualitat de les proteïnes que es transporten per a la via de secreció, ja que les proteïnes que es troben plegades o acoblades de manera incorrecta es retenen o degraden en aquest compartiment (Hammond i Helenius, 1995). Les proteïnes sintetitzades correctament que van destinades a la via secretora se separen selectivament de les proteïnes residents a l'ER. La càrrega secretora s'ordena i es reparteix de manera activa en els llocs de sortida de l'ER gràcies a l'acció de proteïnes de recobriment (o coberta), que alhora seran les encarregades de la formació de les invaginacions de la membrana i la posterior vesícula (Novick et al, 1981; Barlowe et al, 1993; Kuge et al, 1994). Aquestes vesícules de nova formació a la sortida de l'ER (anomenades estructures pre-Golgi) tenen una existència transitòria, ja que després de dirigir-se a l'aparell de Golgi i fusionar-s'hi per deixar anar la càrrega secretora, els seus components són reciclats cap a l'ER (Tang et al, 1995; Klumperman et al, 1998).

L'aparell de Golgi ocupa una posició central en les vies de secreció. És el lloc on les proteïnes i lípids es modifiquen i classifiquen, i actua com a un filtre per separar les proteïnes i lípids que s'han de retenir a l'ER i aparell de Golgi d'aquelles que s'han d'alliberar a la membrana plasmàtica. Els intermediaris de transport, com les estructures pre-Golgi, alliberen la càrrega provinent de l'ER únicament a la cara *cis* de l'aparell de Golgi, una xarxa tubular molt elaborada. La càrrega secretora es mou a través de les diferents cisternes enriquides en enzims que processen glicoproteïnes i glicolípid fins al TGN, on són empaquetades i destinades a la membrana plasmàtica (Lippincott-Schwartz et al, 2000). D'aquesta manera, la cara *cis* de Golgi és el lloc on els intermediaris pre-Golgi es fusionen, i la cara *trans* representa les últimes

cisternes on s'empaqueten les proteïnes i els lípids que se secretaran en els intermediaris de transport post-Golgi (Mironov et al, 1997; Pelham, 1998).

En arribar a la TGN, les proteïnes i lípids són empaquetats en intermediaris de transport que es mouran pel citoplasma fins a fusionar-se amb la superfície cel·lular o amb altres compartiments del sistema endosomal. Aquest procés involucra la classificació en diferents vies (Keller i Simons, 1997): els transportadors post-Golgi poden ésser estructures tubulars irregulars tan grans com la meitat de la mida de les cisternes de Golgi, i també petites vesícules. Els diferents tipus de vesícules dependran de les molècules transportadores que els conformen (Nakata et al, 1998; Polishchuk et al, 2000; Kreitzer et al, 2000). La formació dels transportadors post-Golgi es dóna en dominis discrets de la membrana de Golgi, i implica l'elongació d'aquesta membrana en túbuls, que posteriorment es desprendran per formar un transportador post-Golgi (Hirschberg et al, 1998).

Els transportadors post-Golgi es mouen a través dels microtúbuls fins a la membrana plasmàtica, s'hi fusionen i integren completament, mentre que el contingut és dispersat fora de la cèl·lula (Schmoranzler et al, 2000; Toomre et al, 2000).

1.5.1 Mecanisme de secreció de vesícules

Gràcies als estudis genètics i bioquímics de les vies de secreció s'ha pogut detallar els mecanismes moleculars involucrats en el transport selectiu de càrrega entre orgànuls. Aquest transport és mediat per vesícules que s'escindeixen d'un compartiment i es fusionen a un altre. La gemmació de la vesícula donant i la selecció de la càrrega es duu a terme gràcies a les proteïnes de recobriment, mentre que la seva destinació i fusió a la vesícula acceptora depèn d'una maquinària que inclou els SNARE o receptors de SNAP (proteïna soluble associada al factor sensible a N-etilmaleimida) (figura 8). La regulació d'aquests dos aspectes del transport vesicular assegura una transferència de la càrrega tot preservant la identitat de l'orgànul. Els processos de gemmació i fusió són iteratius en els diferents passos de transport consecutius fins que la càrrega arriba a la seva destinació, dins o fora de la cèl·lula. Per equilibrar aquest moviment de càrrega, els components de la maquinària de transport tornen de la vesícula acceptora a la donant mitjançant mecanismes de transport retrògrad, també mediat per transport vesicular (Bonifacino i Glick, 2004).

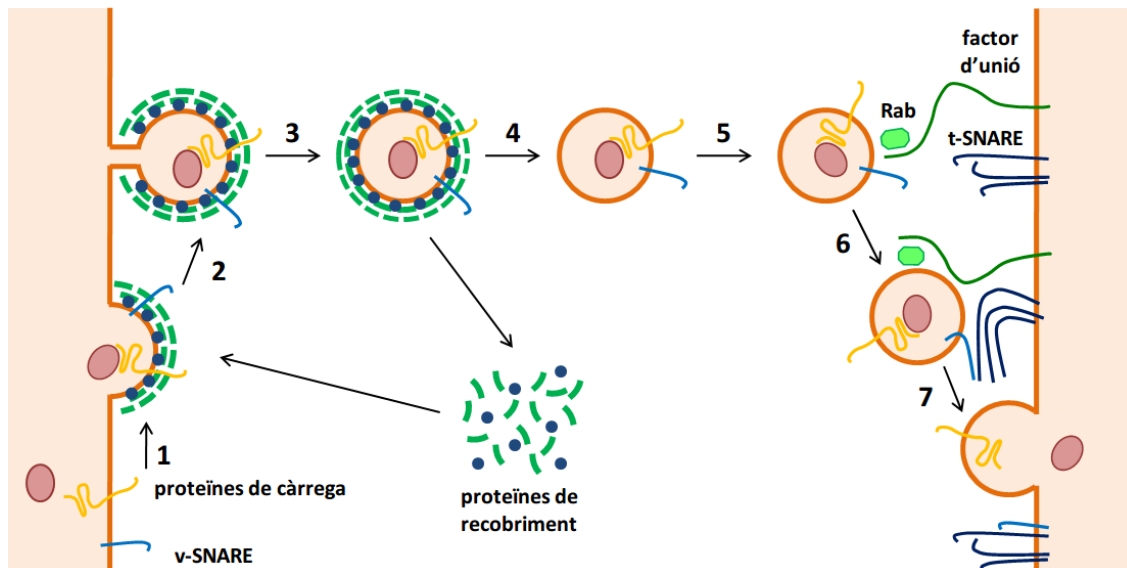


Figura 8. Passos en la gemmació i fusió de vesícules. 1. Iniciació de l'acoblament de les proteïnes de recobriment. 2. Gemmació i concentració de les proteïnes de càrrega i de recobriment a la zona de la membrana que inicia la curvatura. 3. Escissió de la vesícula. 4. Alliberament de les proteïnes de recobriment per al seu reciclatge. 5. Unió de la vesícula al compartiment acceptor. 6. Ancoratge per part de les molècules SNARE. 7. Fusió a la membrana acceptora, amb transferència de la càrrega i reciclatge de les molècules SNARE. Imatge adaptada de Bonifacino i Glick, 2004.

1.5.1.1 Paper de les proteïnes de recobriment en la gemmació vesicular i la selecció de la càrrega: importància del pèptid senyal.

Els processos de gemmació de les vesícules de transport i la selecció de la càrrega que s'incorporarà a les noves vesícules en formació són ambdós mediat per les proteïnes de recobriment (Kirchhausen, 2000; Bonifacino i Lippincott-Schwartz, 2003). Els recobriments són agrupaments de proteïnes, encarregats de desestructurar parts planes de la membrana per provocar-ne deformacions arrodonides, que acabaran separant-se per formar vesícules de transport noves. De la mateixa manera, participen en la selecció de la càrrega reconeixent els senyals de classificació presents als dominis citosòlics o transmembrana de les proteïnes que se secretaran.

Els diferents tipus de vesícules i de selecció de càrrega als diferents estadis de les vies d'exocitosi i endocitosi són mediat per diferents tipus de proteïnes de recobriment i de senyals de classificació. Les primeres molècules de recobriment identificades i caracteritzades tenien com a principal constituent la clatrina (Roth i Porter, 1964; Pearse, 1975) i, tot i que inicialment es va assumir que participaven en tots els passos de transport vesicular de la cèl·lula, es va demostrar que només es troben implicats en els sistemes de TGN i endosomes. Més endavant es va determinar la existència d'altres mediadors de transport. Els recobriments tipus COPII medien el transport de l'ER a un compartiment intermedi entre ER i Golgi (ERGIC) i

a l'aparell de Golgi (Barlowe et al, 1994). D'altra banda, els recobriments tipus COPI estan involucrats en el transport intern a l'aparell de Golgi i el transport retrògrad de l'aparell de Golgi a l'ER (Letourneur et al, 1994).

El complex COPII està format bàsicament per una molècula tipus Ras dependent de GTP, dos subcomplexos proteics, i una gran varietat de molècules reguladores (Barlowe et al, 1994, Bock et al, 2001). La diversificació de les subunitats de COPII permet al recobriment la capacitat de regular diferencialment diversos tipus de proteïnes de càrrega (Roberg et al, 1999; Shimoni et al, 2000). Els components de COPII s'uneixen mitjançant reaccions dependents i independents de GTP en llocs on les noves proteïnes que se sintetitzen surten de l'ER (Bi et al, 2002). Aquests llocs es troben generalment desproveïts de ribosomes, i varien en complexitat, des de gemmes d'embolcall nuclear, fins a xarxes complexes de túbuls i vesícules (Orci et al, 1991; Bednarek et al, 1995; Bannykh i Balch, 1997).

La majoria de les proteïnes transmembrana surten de l'ER unint-se directament a COPII (Aridor et al, 1998; Votsmeier i Gallwitz, 2001), però algunes transmembrana i la majoria de proteïnes de secreció solubles s'uneixen indirectament a COPII a través de receptors d'exportació transmembrana (Appenzeller et al, 1999; Muñiz et al, 2000; Powers i Barlowe, 2002). Aquests receptors abandonen l'ER amb els lligands, alliberen la càrrega al compartiment acceptor i retornen a l'ER. Els senyals de classificació i exportació de l'ER, també anomenats pèptids senyal, són molt diversos. Alguns consisteixen en motius diacídics que segueixen la seqüència consensu [DE]X[DE] (Nishimura i Balch, 1997; Votsmeier i Gallwitz, 2001), mentre que d'altres es basen en motius hidrofòbics com ara FF, YYM, FY, LL o IL (Kappeler et al, 1997; Nakamura et al, 1998), entre d'altres (D correspon a aspartat, E a glutamat, F a fenilalanina, Y a tirosina, M a metionina, L a leucina, I a isoleucina, i X és qualsevol aminoàcid).

El pas final en la formació de la vesícula és l'escissió del coll de la gemma. El procés sembla que el duu a terme la polimerització del mateix recobriment, comportant l'escissió de la membrana en el moment de tancar la vesícula formada pel recobriment de COPII.

Els recobriments de clatrina són més complexos que els de COPII i COPI, ja que es recluten una gran varietat d'adaptadors encarregats de formar una capa on es disposa la clatrina (Bonifacino i Lippincott-Schwartz, 2003; Wang et al, 2003). Els adaptadors tenen la capacitat d'unir-se als pèptids senyal de les proteïnes transmembrana a través de residus de tirosina, dileucina, o ubiquitina conjugada (Bonifacino i Traub, 2003). Els complexos formats per la clatrina i els adaptadors poden polimeritzar en esferes, i formar gemmes i vesícules a partir de membranes (Kirchhausen i Harrison, 1981), però les proteïnes involucrades, com ara cinases,

fosfatases, dinamines i xaperones (Ungewickell et al, 1995; Lafer, 2002; Sever, 2002), són diferents a les presents en els complexos COPII.

1.5.1.2 Les proteïnes SNARE en la fusió vesicular

Després que la vesícula es desprengui del seu recobriment s'ha de dirigir al compartiment acceptor apropiat, i fusionar-se a la seva membrana. Les reaccions de direcció i fusió recauen sobre el mateix tipus de proteïnes. La primera proteïna identificada va ésser un factor sensible a N-etilmaleimida (NSF), una molècula que pot existir en la seva forma citosòlica o unida a membrana (Glick i Rothman, 1987). Els primers estudis van detectar que quan NSF s'inactiva, s'acumulen vesícules sense coberta a la membrana de Golgi, suggerint que NSF és necessària per a la fusió a la membrana (Malhotra et al, 1988). Posteriorment es va demostrar que NSF actua en una gran quantitat de passos en la fusió a membrana i en les vies secretores i endocítiques (Beckers et al, 1989; Diaz et al, 1989). S'ha identificat una proteïna soluble associada a NSF, anomenada α -SNAP, capaç d'unir NSF a les membranes (Clary et al, 1990).

NSF i α -SNAP formen un complex amb altres proteïnes de membrana, anomenades receptors de SNAP, o SNAREs (Söllner et al, 1993). Algunes de les primeres proteïnes SNARE identificades van ésser VAMP o sinaptobrevina, syntaxina i SNAP25. Els SNARE es poden classificar de diverses maneres, però la més comuna és separar-los en v-SNARE (un domini hèlix alfa) i t-SNARE (tres dominis hèlix alfa). Cada tipus de vesícula de transport conté un v-SNARE que s'uneix a la seva parella t-SNARE a la membrana apropiada (Rothman, 1994). Les parelles SNARE es poden aparellar en membranes separades per formar un complex *trans*-SNARE, o a la mateixa membrana per formar un complex *cis*-SNARE. Un complex *trans*-SNARE persisteix després de la reacció de fusió a la membrana, i es converteix en un complex *cis*-SNARE (Hanson et al, 1997; Sutton et al, 1998). α -SNAP llavors s'uneix al marge del complex SNARE i recluta NSF (Rice i Brunger, 1999), permetent la dissociació dels SNARE: NSF i α -SNAP no participen directament en la reacció de fusió, però actuen en el reciclatge dels SNARE per a poder-los reutilitzar.

Les molècules SNARE tenen dues funcions majoritàries. Una és la de promoure la fusió per elles mateixes. En totes les reaccions de transport que s'han examinat, la formació de complexos *trans*-SNARE és essencial per a la fusió. L'acoblament de les quatre hèlix s'encarrega de subministrar l'energia lliure necessària per apropar les membranes suficientment com per a fusionar-se (Hanson et al, 1997; Weber et al, 1998; Chen i Scheller, 2001). La segona funció majoritària dels SNARE és assegurar-se de l'especificitat de la fusió a la membrana. Diferents complexos v- i t-SNARE es formen a diferents passos del transport

intracel·lular. La formació de complexos *trans*-SNARE funcionals *in vivo* es dóna exclusivament amb combinacions fisiològiques de v-SNARE i t-SNARE (McNew et al, 2000; Parlati et al, 2002).

A més dels SNARE, altres proteïnes participen en la formació dels lligams específic abans de la formació del complex SNARE. Per exemple, les proteïnes anomenades golgines, presents a l'aparell de Golgi (Barr i Short, 2003), s'uneixen a membres de la família de GTPases de Rab, i promouen l'associació inicial de dues membranes (Segev, 2001). De la mateixa manera, el sistema compta amb components accessoris i reaccions reguladores que modulen l'acció dels SNARE (Gerst, 2003). Algunes syntaxines, per exemple, són molècules amb funció autoinhibitòria, s'uneixen internament als motius SNARE per generar conformacions tancades, evitant que es puguin unir a parelles SNARE (Misura et al, 2002; Dietrich et al, 2003).

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Una de les principals fites en aqüicultura és aconseguir una reducció de les proteïnes que se subministren amb la dieta, procedents majoritàriament de farines de peix, i incrementar la presència de nutrients més rendibles. Per una banda, la reducció de farines de peix en els pinsos, altament dependents de pesqueries sovint sobreexplotades (Naylor et al, 2000), tindria a més un impacte rellevant sobre l'ecosistema marí i la biodiversitat, fent més sostenible l'aqüicultura. A més, la contaminació local causada per acumulació d'amoni excretat i matèria orgànica es veuria pal·liada per la disminució del catabolisme d'aminoàcids en els peixos en cultiu (Cole et al, 2009; Bostock et al, 2010). D'altra banda, des del punt de vista econòmic, la substitució de les proteïnes per carbohidrats, components més econòmics que les proteïnes, comportaria una reducció significativa dels costos de producció dels peixos en cultiu.

La substitució de proteïnes per carbohidrats en la dieta està limitada per les característiques metabòliques dels peixos en cultiu, en tractar-se principalment d'espècies carnívores. Els peixos carnívors, com l'orada, fan servir preferentment els aminoàcids com a font energètica i aprofiten els carbohidrats de la dieta de manera menys eficaç que els mamífers, ja que metabolitzen més lentament la glucosa (Christiansen i Klungsøyr, 1987; Cowey i Walton, 1989; Moon, 2001; Polakof et al, 2012; Caballero-Solares et al, 2015).

El fetge és un òrgan molt important en la regulació dels nivells plasmàtics d'aminoàcids i en la síntesi de glucosa a partir de l'excés d'aminoàcids aportats amb la dieta. L'activitat ALT hepàtica juga un paper central com a connexió entre el metabolisme d'aminoàcids i el de carbohidrats, ja que catalitza la transaminació reversible entre l'L-alanina i l' α -cetoglutarat per formar L-glutamat i piruvat (Welch, 1972). A més, l'ALT s'ha mostrat com l'aminotransferasa hepàtica més sensible a canvis en l'estat nutricional i la utilització de proteïna en moltes espècies de peixos (Fynn-Aikins, 1995; Sánchez-Muros et al, 1998; Metón et al, 1999b; Fernández et al, 2007). Per aquesta raó, hi ha la necessitat d'aprofundir en el coneixement dels factors que modulen l'expressió i l'activitat de l'ALT a nivell molecular, a fi d'abordar el control de l'activitat de les isoformes d'ALT com a eina per optimitzar la utilització dels nutrients de la dieta.

Actualment són poc coneguts els mecanismes moleculars que regulen l'expressió gènica d'ALT. La coexistència de diverses isoformes de l'ALT en un mateix teixit, com és el fetge, i fins i tot en el mateix compartiment subcel·lular, suggereix que l'ALT pot estar implicada en múltiples processos cel·lulars i que la seva activitat podria estar sotmesa a un sistema complex de

regulació. El nostre grup va clonar tres isoenzims d'ALT a partir de fetge de *S. aurata*, indicant l'existència de dues isoformes citosòliques, cALT1 i cALT2, i una isoforma mitocondrial mALT (Metón et al, 2004b; Anemaet et al, 2008).

Les característiques cinètiques de cALT1 i cALT2 d'orada expressades en llevats indiquen que cALT2 és un enzim més eficaç per catalitzar la conversió de L-alanina a piruvat que cALT1. Consistentment, la regulació de l'expressió de cALT1 i cALT2 en diferents condicions hormonals i nutricionals, mostra que els nivells d'mRNA de cALT2 incrementen en fetge d'orada sota condicions associades a gluconeogènesi, mentre que l'expressió de cALT1 predomina durant la utilització postprandial dels nutrients de la dieta. D'acord amb aquests resultats, hem constatat que l'expressió hepàtica de cALT2 incrementa en orades amb diabetis induïda per tractament amb estreptozotocina (Anemaet et al, 2008). La caracterització cinètica i la regulació nutricional de l'expressió d'mALT d'orada indica que aquest enzim catalitzaria preferentment la reacció en la direcció de formació de piruvat, i suggereix que podria tenir un rol important en la producció d'energia a partir d'aminoàcids per mantenir el metabolisme basal (Salgado et al, 2012). Addicionalment, el nostre grup ha observat que la inhibició d'ALT a nivell d'mRNA o posttraduccional incrementa la utilització dels carbohidrats de la dieta (González et al, 2012, 2015).

En aquest context, l'objectiu global d'aquesta tesi doctoral és analitzar la implicació de mecanismes d'interacció proteïna-proteïna en la modulació posttraduccional de l'activitat de les isoformes citosòliques d'ALT d'orada. La interacció entre proteïnes és una eina essencial per a la majoria del processos biològics, com la replicació, la transcripció, la secreció, la transducció de senyals o la modulació posttraduccional de l'activitat enzimàtica. Estudis de polarització fluorescent i amb biosensors SPR (ressonància de superfície en plasma) ja han descrit la interacció d'una proteïna amb l'ALT de cor porcí, l'enzim piridoxal quinasa, la funció del qual podria ser transferir el coenzim piridoxal-5-fosfat a l'apoenzim (Cheung et al, 2003).

Els objectius específics d'aquesta tesi doctoral han estat:

1. Identificar proteïnes que interaccionin amb l'ALT citosòlica de l'orada.
2. Analitzar els efectes de les interaccions proteïna-proteïna sobre l'activitat de l'ALT citosòlica.
3. Analitzar la distribució tissular i el control de l'expressió de les proteïnes interaccionants en orada.

MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Animals utilitzats en l'experimentació

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat mostres biològiques procedents d'orades (*Sparus aurata*) juvenils. L'orada és un peix teleosti que pertany a la família *Sparidae*, de l'ordre dels *Spariformes*. El seu cos té forma oval i comprimida, i es caracteritza per una franja daurada situada entre els ulls, i una taca fosca sobre l'opercle. Pot arribar a pesar més de 5 Kg i mesurar 70 cm de longitud.

L'orada és una espècie pròpia del Mar Mediterrani, però es troba també al Mar Negre, el Mar Roig i les costes orientals de l'Atlàntic, des de les illes britàniques fins al Senegal. És una espècie litoral, euriterma (tolera temperatures entre els 5 i els 35 °C) i eurihalina (capaç de créixer en diferents condicions de salinitat). Viu de manera solitària o formant grups reduïts, tot i que quan són joves es poden agrupar de manera més nombrosa. Els individus joves es troben en zones litorals i llacunes costeres. Els adults viuen a una profunditat de 30 m, tot i que en època de reproducció poden arribar als 150 m.

Es tracta d'una espècie hermafrodita proteràndrica. Els peixos no es diferencien sexualment en la fase juvenil, i no és fins a partir del primer any de vida que es comporten funcionalment com a mascles. Als dos o tres anys pateixen una inversió sexual, passant a comportar-se definitivament com a femelles. A més de l'edat, la mida també influeix en el seu estat de maduresa.

L'orada és un peix d'hàbits depredadors, amb una dieta preferentment carnívora. La seva alimentació es basa principalment en peixos, crustacis i mol·luscs, tot i que en ocasions pot menjar algues i plantes aquàtiques, com ara la posidònia.

L'aqüicultura ha experimentat un gran increment des de la seva implantació, passant de menys de mil tones a mitjans del segle XX a 66.6 milions de tones el 2012 (FAO, 2014). L'orada és molt apreciada en el Mediterrani, i el seu interès comercial ha incrementat notablement degut a la millora del seu cultiu. Només en l'última dècada s'ha duplicat la producció aqüícola anual d'orada, arribant gairebé a les 160 mil tones l'any 2012. La importància del cultiu de l'orada queda reflectida en el fet que actualment és el peix més cultivat a Espanya i, entre els organismes d'origen marí, a Europa (FAO FishStat, 2014).

3.1.1 Manipulació dels animals i presa de mostres

Les orades utilitzades en aquest treball van ésser subministrades per l'empresa Piscimar S.L. (Grupo Andrómeda, Castelló). Van ésser transportades al laboratori en aigua de mar insuflada amb oxigen pur. Al laboratori, les orades es van mantenir en aquaris de 260 L de capacitat a 20 °C de temperatura i en aigua de mar airejada i filtrada en circuit tancat, amb un sistema d'esterilització amb llums ultraviolats. Per simular el cicle circadiari es va mantenir un fotoperíode de 12 hores de llum/foscor. Les orades van ésser alimentades amb el pinso comercial Microbaq-15 (Dibaq, Segovia; taules 1 i 2), subministrat un cop al dia seguint una relació de 25 g de dieta per kg de pes corporal. Els peixos es pesaven cada setmana per ajustar periòdicament la quantitat de pinso subministrat.

Taula 1. Ingredients en la dieta Microbaq-15 (Dibaq).

Ingredients	
Farina de peix	60.5 %
Oli de peix	13.5 %
Blat	11.4 %
Gluten de blat	8.3 %
Solubles de peix concentrats	2.5 %
Minerals	1.7 %
Extracte de llevat	1.0 %
Lecitina de soja	1.0 %

Taula 2. Composició nutricional de la dieta Microbaq-15 (Dibaq).

Composició nutricional	
Proteïna bruta	50 %
Cendres brutes	10 %
Cel·lulosa bruta (fibra)	0.5 %
Matèria grassa bruta	20 %
Fòsfor	1.2 %
Calci	1.6 %
Sodi	0.42 %
Humitat	5 %
Additius (per kg)	
Vitamina A	13000 UI
Vitamina D3	2210 UI
Vitamina E	260 mg
Elements traça (per kg)	
Coure E4	7 mg
Manganès E5	31 mg
Zinc E6	170 mg
Cobalt	0.3 mg
Antioxidants (per kg)	
BHA-E320	30 mg
BHA-E321	120 mg
Energia bruta (per kg)	5917 Kcal

Totes les manipulacions realitzades s'han dut a terme segons les normes del Comitè Ètic d'Experimentació amb Animals de la Universitat de Barcelona (CEEA-UB). En el procés de manipulació s'han seguit pautes concretes per evitar l'estrès i situacions d'angoixa dels animals, que podrien incidir en el resultat dels experiments realitzats.

3.1.1.1 Passos preliminars: anestèsia dels peixos

1. Preparar un aquari de capacitat adequada a la mida i nombre de peixos a sacrificar, amb aigua de mar i un airejador.
2. Dissoldre-hi l'agent anestèsiant MS-222 (metanosulfonat de tricaina) en una proporció de 70 mg/L (p/v).
3. Submergir les orades immediatament en l'aquari amb anestèsic.
4. Esperar fins que els peixos quedin sedats (5-10 minuts).
5. Pesar cada orada.

3.1.1.2 Tractament amb injecció intraperitoneal

1. Anestèsia i pesar les orades.
2. Ajustar la dosi del compost a administrar al pes de cada orada.
3. Inyectar intraperitonealment cada orada utilitzant agulles d'insulina (25G).
4. Retornar l'orada a un nou tanc amb aigua de mar sense anestèsic fins a la seva recuperació de la sedació.

3.1.1.3 Sacrifici i presa de mostres

1. Seguir els passos preliminars d'anestèsia (punt 3.1.1.1).
2. Sacrificar l'orada amb un tall cervical.
3. Obtenir-ne la sang amb una pipeta Pasteur de vidre prèviament tractada amb una solució de citrat sòdic al 3 %.
4. Obrir el peix ventralment, i extreure el fetge. Per eliminar les restes de sang, bilis o greix, rentar el teixit submergint-lo en solució salina (NaCl, 0.9 %). Congelar el teixit immediatament per la tècnica del *freeze clamping*, amb pinces prèviament refredades en nitrogen líquid. Mantenir el fetge congelat a -80 °C fins que s'utilitzi.
5. La sang obtinguda es deixa coagular a temperatura ambient un màxim de 30 minuts, i després se centrifuga a 6000 x g a 4 °C durant 10 minuts. El sobrenedant (sèrum) es retira i s'analitzen els metabolits. Es manté congelat a -20 °C.

3.1.2 Administració de lipopolisacàrid

Els animals van ésser posats en dejú 24 hores abans del tractament.

Trenta-dues orades amb una massa mitjana de 12.52 ± 1.14 g es van dividir en dos grups. Catorze peixos corresponents al grup control van ésser injectat intraperitonealment amb una solució salina (NaCl 0.9 %), mentre que divuit peixos van ésser tractats amb LPS (serotip O26:B6, Sigma) a una concentració de 1 mg/kg de peix. La meitat de peixos de cada grup van ésser sacrificats a les 4 hores després de la injecció, i la resta es van sacrificar a les 24 hores post-injecció.

Es van recollir mostres de sang per determinar metabolits en el sèrum, i mostres de fetge per determinar activitats enzimàtiques i expressió gènica a nivell hepàtic.

3.2 Oligonucleòtids

3.2.1 Oligonucleòtids per a clonatge a pGBKT7

cALT2

AMAL01	GGCATATGTTTCAGATATCAGTCCAGAG
IMAL20	GAGGATCCTGGGGTTGTTATGAGAACTCTTG

3.2.2 Oligonucleòtids per a RACE

F-lectina

MG1001	CGCACAGCGTCAGGTA CTCTCTTCC
MG1002	GGCGCTGCTGGGATCTCTGTGA

RPS20

MG1003	TGCGTCAGCGATGGTAACCTCAACCTCT
MG1004	GGGCTGTGCAGATCAATCAGGCGCT

RBP2

MG1005	CCCTCGATCCATTGTCTCCAGCCGC
MG1006	TCCGTCCAGGTAACCAAGTGTCTTGA

HABP2

MG1007	GCCTTTTTGGCTGAGGCTTGCCGC
MG1008	GCACTCGGAATGACAGAAGCACCAGG
MG1009	CCCACCCAGGCTCCACAACCTTCT

Subministrats pel kit *FirstChoice RLM-RACE kit (Ambion)*

5' RACE adapter	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA
5'RACE Outer Primer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5'RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
3'RACE Outer Primer	GCGAGCACAGAATTAATACGACT
3'RACE Inner Primer	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG

3.2.3 Oligonucleòtids per a clonatge a pGEM-T easy

F-lectina

MG1306 AGAAGCTCCGGCTGCTCATC

MG1308 GAAATCAAACGTGGATC

HABP2

MG1309 ACTCTTCTGGCTGTCTTCTGATCC

MG1310 GGTTTAATAAGTAGCATCTCAAC

RBP2

MG1311 CAGTTAGACAGACCAACCCACAG

MG1312 ATTACGGGTATTCACAGTTAC

RPS20

JS-RPS20-F1 TTCGTGAAGAACTGACCACG

JS-RPS20-R1 TATTCAAATCATCCGCATCA

3.2.4 Oligonucleòtids per a clonatge en vectors fluorescents

F-lectina

MG1105 GGAAGCTTGGAAGCACACTGGTGTATTTATTTTG

MG1106 GGATCCTTAATCCAGGACAGAGCCATAC

MG1403 AAGCTTGCCACCATGAAGCACACTGGTGTATT

MG1404 GGATCCGCATCCAGGACAGAGCCATAC

RPS20

MG1116 GGAAGCTTGGGCTTTCAAGGACACTGG

MG1117 GAATTCTTATGCGTCAGCGATGGTAACCTC

RBP2

MG1118 AAGCTTGGCCTGCTGATTACAATGGACG

MG1119 GGATCCTTACTGGCTCTTCTTAAATGTTTG

HABP2

MG1120 AAGCTTGGAACCTAAAACCTCTTCATTTGCC

MG1121 GGATCCTTATGGAGATGCTGCCTGAGTC

cALT1

IMAL19 GAGCTAGCCAACATGTCCCACCAGGCGGCG

IMAL21 GAGGATCCCGTGAGAACTCTTGTGTGAAGCG

cALT2

IGALD GAGCTAGCCAACATGTTTCAGATATCAGTCCAGAGGGTG

IGALR2 GAGGATCCTGAGAACTCTTGTGTGAAGCG

MCS

MG1207 P – CCGGTAAGCTTGGTACCGAATTCGGATCCA

MG1208 P – CCGGTGGATCCGAATTCGGTACCAAGCTTA

3.2.5 Oligonucleòtids per a clonatge a pcDNA3

F-lectina

MG1037 AAGCTTGCCACCATGAAGCACACTGGTGTATTTATTTTGC

MG1038 GGATCCTTAATCCAGGACAGAGCC

HABP2

AA01 AAGCTTGCCACCATGAACTTAAAACCTCTTCATTTGC

AA02 GGATCCTTATGGAGATGCTGCCTGAGTC

RBP2

AA03 AAGCTTGCCACCATGCCTGCTGATTACAATG

AA04 GGATCCTTACTGGCTCTTCTTAAATGTTTGGTG

RPS20

AA05 AAGCTTGCCACCATGGCTTTCAAGGACACTGG

AA06 GAATTCTTATGCGTCAGCGATGGTAAC

cALT1

MG1402 GAAGCTTGCCACCATGTCCCACCAGGCGGC

IMAL20 GAGGATCCTGGGGTTGTTATGAGAACTCTTG

3.2.6 Oligonucleòtids per a seqüenciació de vectors

T7 TAATACGACTCACTATAGGG

pGEM-T-rev CAGCTATGACCATGATTACGC

pcDNA3-rev CTAGAAGGCACAGTCGAGGCT

pGBKT7-rev CCCGGAATTAGCTTGGCTGC

pGADT7-rev AGATGGTGCACGATGCACAG

pEGFP-N1-fw CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACG

pEGFP-N1-rev CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGG

pDsRedmonC1-fw AGCTGGACATCACCAACCACAAC

pDsRedmonC1-rev CAGGTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGG

pDsRedmon-N-fw GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC

pDsRedmon-N-rev CTTGGTCACCTGCAGCTTGGCGGTC

3.2.7 Oligonucleòtids per a qRT-PCR

		posició	pb
F-lectina			
MG1122q	GCAGAGATCCGCATCGGAGATTC	+736	
MG1123q	AACATAGCGGCCATCCATACCG	+864	129
Il-1b			
MG1205q	GGGCTGAACAACAGCACTCTC	+700	
MG1206q	TTAACTCTCCACCCTCCA	+864	165

cALT1

JDRT2C5S	GCGAGCCTAGTGAGCAACTGATATC	-80	
IMAL11	CCGCTCGCTGGACTACGGGACCACGA	+121	201

cALT2

JDc2s	CACACTCTCTATCTGCTCTCGTGC	-67	
JDc2as	GAGAGGTTGAGGAGTGAGCAGAAAG	-5	63

mALT

MC13	CCAGGGTCCGCTCACTGAT	+195	
MC14	GTCGCGCTCACACTCGATAA	+291	96

 β -actina

JDRTBactinaS	CGTGACATCAAGGAGAAGCTGT	+628	
BA0299	GACCTGTCCGTCGGGCAGCTC	+741	114

18s

JDRT18s	TTACGCCATGTTGTCCTGAG	+117	
JDRT18as	AGGATTCTGCATGATGGTCACC	+222	106

3.3 Plasmidis**3.3.1 Vectors comercials**

pGBKT7: vector que expressa la proteïna d'interès fusionada al domini d'unió del DNA (DNA-BD) del factor de transcripció GAL4 en llevats (Clontech).

pGADT7-rec: vector utilitzat per a l'expressió de les proteïnes d'interès fusionades al domini d'activació (AD) de GAL4 en llevats. Està especialment dissenyat per al clonatge mediat per recombinació homòloga, i es troba linearitzat amb *SmaI* (Clontech).

pcDNA3: vector dissenyat per a l'expressió d'alts nivells de proteïna en la majoria de línies cel·lulars eucariotes. Els alts nivells s'aconsegueixen sota el control del promotor de citomegalovirus (CMV) (Invitrogen).

pEGFP-N: la proteïna d'interès s'expressa fusionada a l'extrem N-terminal de l'*Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP). Permet la localització de la proteïna de fusió *in vivo* quan és excitat a una longitud d'ona de 488 nm (Clontech).

pDsRed-monomer-C1: vector que expressa la proteïna d'interès fusionada a l'extrem C-terminal de pDsRed-monomer. Permet la localització de la proteïna de fusió *in vivo* quan és excitat a una longitud d'ona de 561 nm (Clontech). Abreviat com a pDsRedmon-C.

pGEM-T easy: vector de tipus T que facilita la lligació de fragments de DNA obtinguts per amplificació per PCR en els casos on la DNA polimerasa deixa extrems protuberants per addició d'una desoxiadenosina en els extrems 3' (Promega).

pCMV β : plasmidi utilitzat com a control d'eficiència en les transfeccions realitzades en cultiu cel·lular, aquest plasmidi expressa β -galactosidasa en cèl·lules eucariotes (Clontech).

pBluescript: vector d'expressió en procariotes, utilitzat com a *carrier* en les transfeccions de cèl·lules eucariotes per igualar les quantitats de plasmidi entre les diferents mesclades de transfecció en un mateix experiment (Stratagene).

3.3.2 Constructes obtinguts

pGBKT7-cALT2: plasmidi utilitzat en l'assaig de doble híbrid. Expressa la proteïna cALT2 d'orada fusionada al DNA-BD del factor de transcripció GAL4. cALT2 està clonada mitjançant PCR amb els oligonucleòtids AMAL01/IMAL20 utilitzant cDNA de fetge d'orada, i la posterior digestió del vector pGBKT7 i el producte amplificat per PCR amb els enzims *NdeI* i *BamHI*.

pGADT7-bib: conjunt de plasmidis resultant de la recombinació homòloga del vector pGADT7-rec i els fragments de cDNA provinents de la biblioteca de cDNA de fetge d'orada. Utilitzats durant l'assaig de doble híbrid en llevats.

pGEM-Flectin: plasmidi amb la seqüència de cDNA (incloent les regions 5'- i 3'-UTR) corresponent a l'F-lectina clonada. L'insert ha estat obtingut a partir d'un PCR amb els encebadors MG1306 i MG1308 utilitzant cDNA de fetge d'orada com a motllo. El fragment de PCR purificat està lligat al vector pGEM-T easy.

pGEM-RPS20: plasmidi amb la seqüència de cDNA (incloent les regions 5'- i 3'-UTR) corresponent a l'RPS20 clonada. L'insert ha estat obtingut a partir d'un PCR amb els encebadors JS-RPS20-F1 i JS-RPS20-R1 utilitzant cDNA de fetge d'orada com a motllo. El fragment de PCR purificat està lligat al vector pGEM-T easy.

pGEM-RBP2: plasmidi amb la seqüència de cDNA (incloent les regions 5'- i 3'-UTR) corresponent a l'RBP2 clonada. L'insert ha estat obtingut a partir d'un PCR amb els encebadors MG1311 i MG1312 utilitzant cDNA de fetge d'orada com a motllo. El fragment de PCR purificat està lligat al vector pGEM-T easy.

pGEM-HABP2: plasmidi amb la seqüència de cDNA (incloent les regions 5'- i 3'-UTR) corresponent a l'HABP2 clonada. L'insert ha estat obtingut a partir d'un PCR amb els encebadors MG1309 i MG1310 utilitzant cDNA de fetge d'orada com a motllo. El fragment de PCR purificat està lligat al vector pGEM-T easy.

pDsRedmonMCS-N: vector que expressa la proteïna d'interès fusionada a l'extrem N-terminal de DsRed-monomer, obtingut a partir del vector pDsRed-monomer-C1. Es va realitzar una restricció enzimàtica amb *HindIII* i *BamHI* per eliminar-ne el *multi-cloning site* (MCS) existent a la regió C-terminal. Posteriorment es va digerir per la diana *Agel*, i es va inserir un nou MCS a la regió N-terminal, format a partir de la hibridació dels oligonucleòtids MG1207 i MG1208. Permet la localització de la proteïna de fusió *in vivo* si és excitat a una longitud d'ona de 561 nm.

pFlectin-DsRedmon: plasmidi que expressa la proteïna F-lectina d'orada fusionada a l'extrem N-terminal del vector pDsRedmonMCS-N. Obtingut mitjançant la digestió amb *HindIII* i *BamHI* del producte de PCR amplificat amb MG1403 i MG1404 i el plasmidi pGEM-Flectin com a motllo.

pDsRedmon-Flectin: plasmidi que expressa la proteïna F-lectina d'orada fusionada a l'extrem C-terminal del vector pDsRed-monomer-C1. Obtingut mitjançant la digestió amb *HindIII* i *BamHI* del producte de PCR amplificat amb MG1105 i MG1106 i el plasmidi pGEM-Flectin com a motllo.

pDsRedmon-RBP2: plasmidi que expressa la proteïna RBP2 d'orada fusionada a l'extrem C-terminal del vector pDsRed-monomer-C1. Obtingut mitjançant la digestió amb *HindIII* i *BamHI* del producte de PCR amplificat amb MG1118 i MG1119 i el plasmidi pGEM-RBP2 com a motllo.

pDsRedmon-RPS20: plasmidi que expressa la proteïna RPS20 d'orada fusionada a l'extrem C-terminal del vector pDsRed-monomer-C1. Obtingut mitjançant la digestió amb *HindIII* i *BamHI* del producte de PCR amplificat amb MG1116 i MG1117 i el plasmidi pGEM-RPS20 com a motllo.

pDsRedmon-HABP2: plasmidi que expressa la proteïna HABP2 d'orada fusionada a l'extrem C-terminal del vector pDsRed-monomer-C1. Obtingut mitjançant la digestió amb *HindIII* i *BamHI* del producte de PCR amplificat amb MG1120 i MG1121 i el plasmidi pGEM-HABP2 com a motllo.

pcDNA3-cALT1k2: plasmidi que expressa cALT1 de *S. aurata*. Obtingut mitjançant la digestió amb *HindIII* i *BamHI* del producte de PCR amplificat amb MG1402 i IMAL20 i cDNA de fetge d'orada. La seqüència Kozak s'ha optimitzat per a una millor expressió de cALT1.

pcDNA3-Flectin: plasmidi que expressa la proteïna F-lectina d'orada. El cDNA d'F-lectina s'ha clonat utilitzant el producte de PCR obtingut a partir del constructe pGEM-Flectin i els encebadors MG1037 i MG1038, i la posterior digestió enzimàtica del vector pcDNA3 i del producte de PCR amb els enzims *HindIII* i *BamHI*.

pcDNA3-RPS20: plasmidi que expressa la proteïna RPS20 d'orada. El cDNA de RPS20 s'ha clonat utilitzant el producte de PCR obtingut a partir del constructe pGEM-RPS20 i els encebadors AA05 i AA06, i la posterior digestió enzimàtica del vector pcDNA3 i del producte de PCR amb els enzims *HindIII* i *EcoRI*.

pcDNA3-RBP2: plasmidi que expressa la proteïna RBP2 d'orada. El cDNA d'RBP2 s'ha clonat utilitzant el producte de PCR obtingut a partir del constructe pGEM-RBP2 i els encebadors AA03 i AA04, i la posterior digestió enzimàtica del vector pcDNA3 i del producte de PCR amb els enzims *HindIII* i *BamHI*.

pcDNA3-HABP2: plasmidi que expressa la proteïna HABP2 d'orada. El cDNA d'HABP2 s'ha clonat utilitzant el producte de PCR obtingut a partir del constructe pGEM-HABP2 i els encebadors AA01 i AA02, i la posterior digestió enzimàtica del vector pcDNA3 i del producte de PCR amb els enzims *HindIII* i *BamHI*.

Tots els constructes es van verificar per seqüenciació (punt 3.4.12) de com a mínim dues colònies, en ambdós sentits, utilitzant oligonucleòtids que hibriden en zones flanquejant el lloc d'inserció, adients en cada cas segons el vector de partida (punt 3.2.6).

3.4 Tècniques de biologia molecular

3.4.1 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa o PCR (de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*) és una tècnica de biologia molecular utilitzada per amplificar un fragment de DNA fins a centenars de milions de còpies. Va ésser desenvolupada el 1983 per Kary Mullis, i s'ha convertit en una tècnica indispensable en la majoria de laboratoris d'investigació (Saiki et al, 1988). La zona a amplificar queda delimitada per dos oligonucleòtids (sentit i antisentit), que són complementaris a la seqüència coneguda que es vol amplificar. Aquests oligonucleòtids

funcionen com a encebadors per a la síntesi d'una nova cadena de DNA per part d'una DNA polimerasa termoestable. Les DNA polimerases que s'han utilitzat en aquesta tesi han estat:

Taq polimerasa (Biotools): utilitzada de manera rutinària per fer PCR.

Expand High Fidelity (Roche): utilitzada quan es requereix major fidelitat en l'amplificació, com ara en clonatges.

Advantage 2 PCR system (Clontech): utilitzada en l'amplificació dels fragments de DNA en la tècnica del RACE-PCR.

Els encebadors utilitzats han de ser específics, han de contenir entre 18 i 25 nucleòtids, tenir entre 50-70 % de residus G/C i minimitzar la formació de dímers o estructures secundàries. El disseny d'oligonucleòtids s'ha dut a terme utilitzant programes informàtics com Oligo Explorer 1.5 i Oligo Analyzer 1.5 (Gene Link, 2010).

Per dur a terme la reacció es requereix el DNA motllo, una parella d'encebadors, la DNA polimerasa, dNTPs per poder sintetitzar les noves cadenes, i un tampó que permeti les condicions de pH i sals òptimes per a què l'enzim funcioni. La majoria de tampons de reacció ja inclouen la concentració de $MgCl_2$ òptima per a la reacció. En un tub s'ha de preparar la següent mescla de PCR:

- 20-40 ng de DNA motllo
- 1X tampó de polimerasa (segons la polimerasa)
- 200 μ M dNTPs
- 0.2 μ M oligonucleòtid sentit
- 0.2 μ M oligonucleòtid antisentit
- 1.5 U DNA polimerasa
- H₂O milliQ fins a 50 μ L

El procés es duu a terme en un termociclador, i s'inicia amb la desnaturalització del motlle de DNA per escalfament. Seguidament es disminueix a la temperatura òptima d'hibridació dels oligonucleòtids a les seqüències complementàries del DNA motllo. La següent etapa és l'elongació dels encebadors per la DNA polimerasa. Aquests tres passos es repetiran fins a un màxim de 35-40 vegades (cicles). Les noves cadenes formades a cada cicle funcionaran com a motlle en els cicles posteriors, aconseguint d'aquesta manera un creixement exponencial del nombre de cadenes de DNA.

Desnaturalització inicial	94 °C	5 min
Desnaturalització	94 °C	30 seg
Hibridació	variable*	variable** 30 seg
Extensió	72 °C	variable***
Extensió final	72 °C	5 min

* El nombre de cicles pot oscil·lar fins a un màxim entre 35 i 40, depenent del nombre de còpies que es requereixi del fragment.

** La temperatura d'hibridació depèn de cada parella d'oligonucleòtids (llargària, contingut en G/C). Modificar la temperatura d'hibridació produeix canvis en l'especificitat dels oligonucleòtids: a més temperatura, més específicament s'uneixen a la seqüència complementària. Per defecte s'ha utilitzat una temperatura d'hibridació al voltant dels 60 °C.

*** El temps d'extensió de la cadena varia en funció de la longitud del fragment que es vulgui amplificar. La majoria de DNA polimerases requereixen un minut per a l'elongació d'una Kb.

3.4.2 Purificació i quantificació de DNA

Per purificar fragments de DNA com ara els obtinguts directament com a producte de PCR o de modificacions enzimàtiques (restriccions enzimàtiques, fosforilacions i defosforilacions, etc), tant sigui a partir de solucions com des de gels d'agarosa, s'ha utilitzat el kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). El principi es basa en la unió selectiva del DNA a les fibres de vidre dels filtres utilitzats en presència de tiocianat de guanidina. El DNA unit es purifica en una sèrie de rentats per eliminar molècules i sals contaminants, i posteriorment s'elueix en una solució amb baixa concentració de sals.

Per determinar la concentració dels àcids nucleics de la solució purificada s'ha utilitzat l'espectrofotòmetre *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop, Thermo Scientific), que permet efectuar determinacions en microgotetes. Els àcids nucleics (DNA i RNA) absorbeixen a una longitud d'ona de 260 nm, mentre que les proteïnes ho fan a 280 nm. Per determinar la puresa dels àcids nucleics es calcula la relació A_{260}/A_{280} . Factors majors o iguals a 1.8 en el cas de DNA, i a 2 en el cas d'RNA, indiquen que la mostra es troba lliure de proteïnes, fenol, o d'altres contaminants que absorbeixen a la longitud d'ona de 280 nm.

3.4.3 Electroforesi de DNA

L'electroforesi en gel d'agarosa és un mètode utilitzat en biologia molecular per separar i calcular la mida aproximada de fragments de DNA. Les molècules dels àcids nucleics se separen aplicant un camp elèctric per a què es desplacin les molècules carregades negativament a través d'una matriu d'agarosa. La mobilitat dels fragments de DNA és

inversament proporcional al logaritme de la seva mida i, per tant, les molècules més curtes passaran més fàcilment a través dels porus del gel i avançaran més ràpid. La concentració d'agarosa en el gel determina la resolució dels fragments de DNA a separar. Generalment s'utilitzen gels d'agarosa a l'1 % (p/v) per separar fragments de DNA de 0.4 a 6 Kb. Per separar fragments més petits s'utilitzen gels d'agarosa al 2 %.

La visualització dels fragments de DNA en el gel es duu a terme mitjançant la incorporació d'una molècula que s'intercala en el DNA i la posterior observació en un transil·luminador amb llum UV. Tradicionalment s'utilitzava el bromur d'etidi com a agent intercalant, però donat que és un producte potencialment carcinogènic, s'ha anat substituint per altres reactius. En els nostres estudis utilitzarem el producte *Red Safe* (iNtRON Biotechnology), seguint les instruccions del fabricant.

Abans de sembrar els carrils per l'electroforesi, a cada mostra de DNA se li afegeix el tampó de càrrega, que conté glicerol per facilitar la càrrega als pous del gel donant-li densitat, i el colorant orange G per visualitzar el front durant l'electroforesi.

A més, a cada gel d'electroforesi s'ha de reservar un carril per al marcador, per poder identificar la mida de les bandes que visualitzarem. Utilitzarem el marcador *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas), que inclou fragments de DNA de 250 a 10000 pb.

L'electroforesi es realitza submergint el suport que conté el gel d'agarosa en una cubeta d'electroforesi amb tampó d'electroforesi TAE 1X, i aplicant 100V de corrent a temperatura ambient.

Gel d'agarosa

1. Pesar la quantitat d'agarosa adequada per al gel que requerim.
2. Dissoldre l'agarosa en TAE 1X escalfant al microones.
3. Atemperar la solució d'agarosa fins a 50 °C, i afegir 5 µl de *Red Safe* (20000 X).
4. Abocar la barreja al suport i col·locar les pintes que formaran els pous.
5. Deixar solidificar el gel i retirar les pintes.

Tampó d'electroforesi TAE 1X

4 mM Tris HCl

2 mM Na₂EDTA·2H₂O

20 mM àcid acètic glacial

Ajustar a pH 8 i autoclavar.

Tampó de càrrega de les mostres de DNA (6X)

60 % glicerol

0.25 % *orange G*

Aquest tampó s'afegeix en una proporció de 1:5 (v/v) a les mostres de DNA.

3.4.4 Digestió de DNA per restricció enzimàtica

La digestió del DNA es duu a terme mitjançant els enzims de restricció, endonucleases de tipus II que s'uneixen al DNA i trenquen els enllaços fosfodièster en seqüències nucleotídiques específiques, en les dues cadenes del DNA. La major part de vectors comercials contenen una petita zona (*polylinker* o MCS) amb un gran nombre de llocs de reconeixement per a aquests enzims, la qual cosa fa que insertar DNA dins aquests plasmidis sigui especialment eficient.

Les reaccions de restricció enzimàtica s'han dut a terme seguint les instruccions de les cases comercials, utilitzant cada enzim de restricció amb el tampó de reacció corresponent. En general es recomana utilitzar 1 U d'enzim per µg de DNA a digerir, incubant 1 hora a la temperatura descrita.

3.4.5 Conversió d'extrems de DNA protuberants en roms

El fragment Klenow es una proteïna gran que prové del trencament enzimàtic de la DNA polimerasa I d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Aquest fragment conté les activitats 5' → 3' polimerasa i 3' → 5' exonucleasa, però ha perdut l'activitat 5' → 3' exonucleasa. Això la fa especialment útil per omplir extrems 5' protuberants i formar extrems roms (*fill-in*) en presència de dNTPs, i digerir extrems 3' protuberants (*chew-back*) en absència de dNTPs.

3.4.5.1 Conversió d'extrems 5' protuberants en roms (*fill-in*)

1. Preparar en un tub els components de la reacció.

Fragment de DNA (< 1 µg)

0.5 µl de dNTPs 10 mM

4 µl de 10X DNA polymerase buffer (1X)

2 µl de DNA polymerase Klenow (Roche) (10 U)

2. H₂O fins a 40 µl
3. Incubar 15 min a 37 °C.
4. Incubar 10 min a 75 °C per inactivar l'enzim.
5. Purificar el DNA (punt 3.4.2).

3.4.5.2 Conversió d'extrems 3' protuberants en roms (*chew-back* i *fill-in*)

1. Preparar en un tub els components de la reacció.

Fragment de DNA (< 1 µg)

4 µl de 10X DNA polymerase buffer

2 µl de DNA polymerase Klenow (Roche)

H₂O fins a 40 µl

2. Incubar 1h a 37 °C.
3. *Fill-in*: afegir 0.5 µl de dNTPs 10 mM.
4. Incubar 15 min a 37 °C.
5. Incubar 10 min a 75 °C per inactivar l'enzim.
6. Purificar el DNA (punt 3.4.2).

3.4.6 Defosforilació de vectors

La defosforilació dels extrems 5' de plasmidis lineals és un mètode utilitzat per prevenir la seva recircularització en reaccions de lligació. És especialment útil quan el plasmidi s'ha linearitzat utilitzant un únic enzim de restricció (que formarà extrems cohesius), o quan el plasmidi, després de la digestió, ha quedat amb els extrems roms.

1. Preparar en un tub els components de la reacció.

10 µl de plasmidi digerit

2 µl de 10X *Calf Intestine Alkaline Phosphatase buffer*

2 µl de *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIP)

6 µl H₂O milliQ

2. Incubar a 37 °C durant 1 h.
3. Incubar a 75 °C durant 10 minuts per inactivar l'enzim.
4. Purificar el DNA (punt 3.4.2).

3.4.7 Hibridació d'oligonucleòtids

Hi ha diferents mètodes per hibridar oligonucleòtids, però tots es basen en desnaturalitzar les cadenes complementàries per evitar la formació d'estructures secundàries, i després deixar que les cadenes hibridin de nou. L'eficiència d'aquest procés ve donada per la concentració de sals i el descens de la temperatura. L'eficiència augmenta quan la temperatura disminueix de manera lenta després de la desnaturalització, especialment quan els oligonucleòtids tenen alt contingut en G/C o formen estructures en forquilla.

1. Barrejar els dos oligonucleòtids equimolarment.
2. Escalfar a 95 °C de 3 a 5 minuts.
3. Deixar refredar lentament fins que arribi a temperatura ambient.
4. Congelar.

3.4.8 Lligació de DNA

La lligació del DNA està catalitzada per la DNA lligasa, que forma enllaços fosfodièster entre el grup 3' hidroxil i el 5' fosfat de residus adjacents de DNA. Aquesta reacció permet unir fragments de DNA de doble cadena amb extrems roms o cohesius per formar molècules de DNA recombinant. En aquesta tesi, s'ha utilitzat rutinàriament per unir un vector linearitzat i un insert de DNA, amb una relació molar de 1:3.

1. Mesclar en un tub.
 - 4 µl dels fragments de DNA que han de ser lligats (insert i vector)
 - 1 µl de T4 DNA lligasa (Promega) 3 U/ml
 - 5 µl de 2x *Rapid Ligation Buffer* (Promega)
2. Incubar 1 hora a temperatura ambient, o tota la nit a 4 °C.

3.4.9 Transformació de cèl·lules bacterianes

L'entrada de DNA plasmídic dins de cèl·lules bacterianes és un procés que es dona a la natura sota determinades condicions i amb baixa eficiència. Al laboratori es pot induir amb procediments que fan la cèl·lula permeable al DNA. Típicament les cèl·lules s'incuben en una solució que contingui cations divalents, en condicions de baixa temperatura (per aconseguir que el DNA s'adhereixi a la superfície cel·lular, i que aquesta superfície estigui debilitada i més permeable) abans de ser sotmeses a xoc tèrmic o electroporació (el DNA entra a través dels porus de la membrana, o a través de la paret malmesa).

3.4.9.1 Soques utilitzades

La soca que utilitzarem per transformar DNA plasmídic és *Escherichia coli* DH5α, que té el següent genotip:

***E. coli* DH5α:** sup E44, ΔlacU169 (90 lac ZDN15), hsd R17, rec A1, gyr A96, thi-1, rel A1.

La soca que utilitzarem per als experiments d'inhibició del creixement bacterià va ésser *Escherichia coli* XL1-Blue, que té el següent genotip:

***E. coli* XL1-Blue:** supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)].

3.4.9.2 Medis de cultiu

Medi LB

10 g/L de NaCl

10 g/L de triptona

5 g/L d'extracte de llevats

20 g/L d'agar (només en el cas que es requereixi medi sòlid)

Ajustar a pH 7 i autoclavar.

Un cop refredat a 50 °C, afegir l'antibiòtic que es necessiti, i plaquejar en cas que sigui medi sòlid.

Antibiòtics

Ampicil·lina (solució de treball: 100 µg/mL)

Kanamicina (solució de treball: 50 µg/mL)

Tetraciclina (solució de treball: 10 µg/mL)

3.4.9.3 Obtenció de cèl·lules *E. coli* competents

1. Inocular una alíquota de les cèl·lules en 10 mL d'LB i mantenir en agitació a 37 °C durant 12-15 hores.
2. Prendre una alíquota del cultiu i inocular-la en 50 mL d'LB.
3. Deixar unes 2 h en agitació a 37 °C fins que la OD₆₀₀ sigui inferior o igual a 0.9, per assegurar-se que el cultiu està en fase exponencial de creixement.
4. Centrifugar les cèl·lules a 600 x g durant 10 min.
5. Retirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 50 mL de MgCl₂ 100 mM fred.
6. Centrifugar les cèl·lules a 600 x g durant 10 min.
7. Retirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 10 mL de MgCl₂ fred.
8. Afegir 100 mL de CaCl₂ 100 mM fred, i deixar en gel de 60 a 90 min.
9. Centrifugar a 600 x g durant 10 min.
10. Retirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 12.5 mL de solució de resuspensió (85 mM CaCl₂, 15 % de glicerol).
11. Aliquotar en tubs estèrils i congelar-les immediatament a -80 °C.

3.4.9.4 Transformació per xoc tèrmic

1. Descongelar lentament sobre gel una alíquota de cèl·lules *E. coli* DH5α competents.
2. Mesclar en un tub 80 µl de les cèl·lules amb 5 µl de DNA (si prové d'una lligació), o mesclar 20 µl de cèl·lules amb 0.5 µl de DNA (si és DNA plasmídic purificat).

3. Deixar en gel durant 15 minuts.
4. Fer un xoc tèrmic a 42 °C no més de 3 minuts.
5. Deixar en gel 5 minuts.
6. Afegir al tub 600 µl de medi LB sense antibiòtic.
7. Incubar 1 h a 37 °C.
8. Centrifugar 30 segons a 13000 x g per sedimentar les cèl·lules, retirar parcialment el sobrenadant, deixant uns 100 µl de LB, i resuspendre les cèl·lules.
9. Sembrar en plaques d'agar amb LB amb l'antibiòtic que es requereixi segons el plasmidi.
10. Incubar durant 16-24 hores, fins al creixement de les colònies bacterianes.

3.4.10 Obtenció de DNA plasmídic

Per obtenir el DNA plasmídic lliure de DNA genòmic, proteïnes i restes cel·lulars, s'han utilitzat els kits comercials *GenElute Plasmid Miniprep Kit* i *GenElute Plasmid Midiprep Kit* (Sigma), en funció de la quantitat de DNA plasmídic que es necessités. Es deixa créixer un cultiu de cèl·lules *E. coli* transformades durant tota la nit en medi LB en presència de l'antibiòtic corresponent. Es recullen les cèl·lules per centrifugació i se sotmeten a lisi alcalina per alliberar el contingut cel·lular. Les restes cel·lulars, proteïnes, lípids i DNA genòmic es precipiten per centrifugació, i s'adsorbeix el DNA plasmídic en una columna de sílica en presència d'altres concentracions de sals. Els contaminants s'eliminen amb rentats en presència d'alta concentració de sals, i finalment el DNA s'elueix en baixa concentració de sals.

3.4.11 Concentració de DNA plasmídic

El DNA és una molècula polar donat la càrrega que proporcionen els grups fosfats i, per tant, és soluble en aigua, que també és altament polar. L'etanol és menys polar que l'aigua, i si s'afegeix a una solució aquosa d'àcids nucleics canvia les característiques generals de polaritat. Si la proporció d'etanol és superior al 64 % en solució aquosa, l'atracció elèctrica entre els grups fosfat i qualsevol ió positiu present en solució es torna suficientment estable com per formar unions iòniques i precipitar el DNA. Utilitzarem aquesta propietat per concentrar el DNA.

1. Afegir un 10 % del volum inicial de plasmidi de solució NaAc 3 M, pH 5.
2. Afegir 2 volums de EtOH absolut del volum inicial de plasmidi.
3. Agitar bé al vortex.
4. Deixar-ho de 15 minuts fins a un màxim de 2 h a -80 °C.

5. Centrifugar 15 minuts a 13000 x g.
6. Retirar el sobrenedant.
7. Rentar el sediment amb 100 µl d' EtOH al 70 %, sense resuspendre.
8. Centrifugar 5 minuts a 13000 x g.
9. Repetir els passos 7 i 8.
10. Retirar tot el líquid, i deixar eixugar.
11. Resuspendre en TE o H₂O milliQ.

3.4.12 Seqüenciació de DNA

La seqüenciació del DNA plasmídic es va realitzar mitjançant un PCR utilitzant el kit comercial *Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1* (Applied Biosystems). El kit es basa en la tècnica de seqüenciació Sanger (Sanger et al, 1973), on cadascun dels quatre ddNTP està marcat amb un fluorocrom que emet a diferent longitud d'ona. El DNA producte de la PCR és precipitat i s'analitza per fluorimetria la Unitat de Genòmica dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona.

Mescla de reacció

- 1.5 µL *mix terminator* (proveït pel kit)
- 5 pmol oligonucleòtid
- 0.5 µg DNA a seqüenciar
- H₂O fins 10 µL

Condicions de la PCR

Desnaturalització inicial		94 °C	3 min
		94 °C	30 seg
Amplificació	30x	50 °C	30 seg
		72 °C	4 min

3.4.13 Anàlisi bioinformàtica i introducció de seqüències en bases de dades

Per a la manipulació i anàlisi bioinformàtica de les seqüències de DNA i proteïna s'han utilitzat diferents programes bioinformàtics. El següent llistat reuneix els principals programes utilitzats i els seus usos.

Oligo Explorer v1.5 i Oligo Analyzer v1.5 (Gene Link, 2010): disseny d'oligonucleòtids.

FinchTV v1.3.1 (Geospiza, 2005): visualització de seqüències de DNA en format .ab1.

BLAST (National Library of Medicine): aliniament de seqüències de DNA i proteïna amb bases de dades.

Clustal W2 i Clustal Omega (EMBL-EBI, 2014): aliniament múltiple de seqüències de DNA i proteïna.

The Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000): mapa de restricció, seqüència reversa complementària.

Translate tool (Swiss Institute of Bioinformatics): traducció de seqüències de DNA a proteïna.

SignalP 4.1 Server (Petersen, 2011): predicció de pèptids senyal en seqüències proteiques.

Les seqüències de DNA obtingudes, que no han estat descrites prèviament, van ésser introduïdes a la base de dades *GenBank*, que forma part de la *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, compresa pel *DNA DataBank of Japan* (DDBJ), el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), i *GenBank* al NCBI.

3.4.14 Amplificació d'extrems de cDNA per RACE-PCR

L'amplificació ràpida d'extrems de cDNA (sigles en anglès RACE) és una tècnica basada en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que facilita el clonatge de seqüències senceres de cDNA quan només hi ha una seqüència parcial.

Els protocols clàssics de 5'-RACE varien en el disseny, però són essencialment equivalents. La primera cadena de cDNA és sintetitzada a partir d'RNA total o poliA en una reacció de transcripció inversa (RT). Llavors una seqüència definida s'afegeix als extrems 3' de la primera cadena de cDNA (extrem 5' de l'mRNA) mitjançant una deoxittransferasa terminal (TdT), o per lligació d'un oligonucleòtid adaptador. Finalment, un encebador específic del gen s'utilitza conjuntament amb un encebador que hibridarà a la seqüència afegida a 3' per poder amplificar la seqüència continguda entre els encebadors de l'adaptador i l'específic del gen que es troba a l'extrem 5' del cDNA. La major limitació d'aquest procediment és que no hi ha selecció per a l'amplificació dels fragments d'RNA amb l'extrem 5' intacte, ja que les etapes de PCR afavoreixen l'amplificació dels fragments més petits en detriment dels productes de llargada completa.

L'amplificació ràpida d'extrems de cDNA mediada per RNA lligasa (RLM-RACE) representa una millora respecte la tècnica de RACE clàssica (Maruyama i Sugano 1994, Schaefer, 1995). El RLM-RACE està dissenyat per amplificar només cDNA de cadena completa, d'mRNA encaputxat, produint normalment una única banda després del PCR. Per dur a terme aquesta tècnica s'ha utilitzat el kit *FirstChoice RLM-RACE kit* (AM1700, Ambion).

El procediment per a la realització del 5' RLM-RACE s'inicia amb el tractament de l'RNA amb fosfatasa alcalina (CIP) per degradar els fosfats lliures a 5' de molècules com l'RNA ribosomal,

mRNA fragmentat, tRNA i DNA genòmic contaminant. L'estructura de caputxa que es troba als extrems 5' de l'mRNA intacte no està afectada per la CIP. Posteriorment l'RNA es tracta amb pirofosfatasa àcida (TAP) per eliminar la caputxa, deixant un fosfat lliure a 5' on es lligarà un adaptador d'RNA. Una etapa de transcripció inversa generarà el cDNA sobre el qual es realitzarà el PCR (figura 9). Es pot millorar l'eficiència de l'amplificació de la banda desitjada realitzant un altre PCR utilitzant com a motllo el producte de PCR inicial (el que s'anomena amplificació secundària, PCR intern o *nested-PCR*).

En el cas del 3'-RACE, la primera cadena de cDNA es pot sintetitzar a partir d'RNA total o poliA, utilitzant un adaptador per 3'-RACE que hibridarà a la cua poliA de l'mRNA.

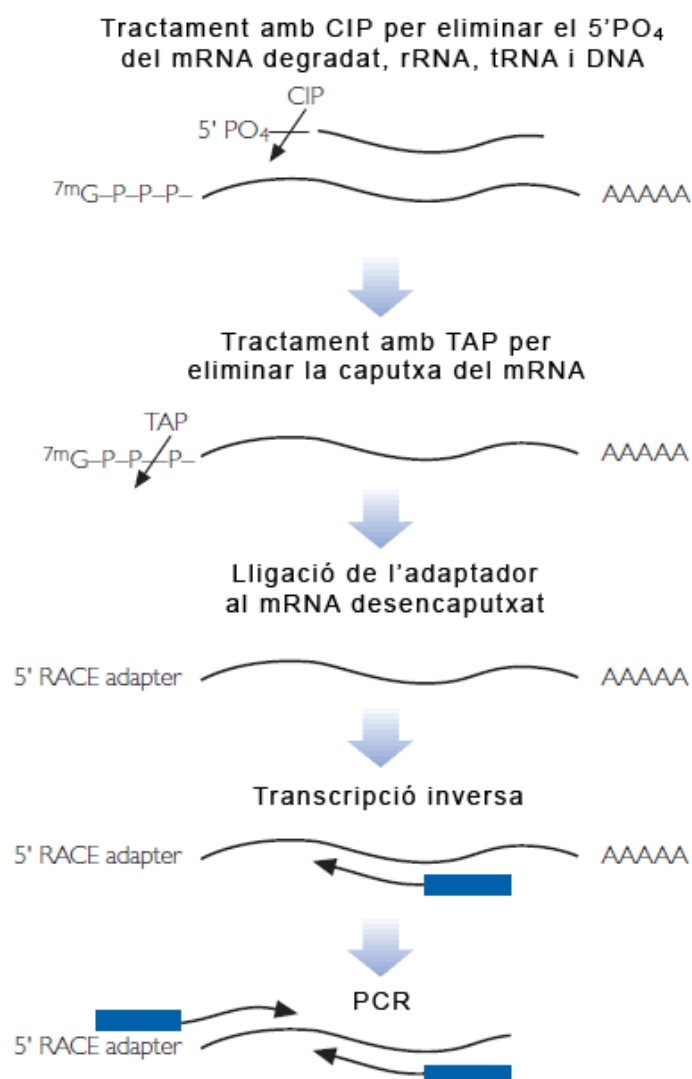


Figura 9. Representació esquemàtica del procediment del 5' RLM-RACE. L'RNA es tracta amb CIP per degradar tot el que no estigui protegit amb caputxó. Seguidament, es tracta amb TAP per retirar el caputxó, i seguidament es lliguen els adaptadors. L'RNA es retrotranscriu, i es fa la PCR. Imatge adaptada del manual del kit *FirstChoice RLM-RACE Kit* (Ambion).

3.4.14.1 Disseny d'oligonucleòtids

Els encebadors específics dels gens per amplificar els extrems de cDNA utilitzant la tècnica RACE han de tenir una longitud de 20-24 parells de bases, i aproximadament un 50 % de contingut en G i C. S'ha d'evitar la presència de més de 3 residus G o C a les 5 últimes posicions a 3', i evitar un residu G a l'extrem 3'-terminal. També és important minimitzar la formació d'estructures secundàries i dímers. Una temperatura de fusió elevada (superior a 70 °C) permet la utilització d'un programa de *Touch Down* PCR.

Els encebadors específics de gen en el 5'-RACE han d'estar en la orientació inversa i complementària respecte la seqüència codificant de l'mRNA, ja que seran els encebadors antisentit. De la mateixa manera, els encebadors específics de gen en el 3'-RACE seran els encebadors sentit, i han d'estar en la mateixa orientació que la seqüència de l'mRNA.

3.4.14.2 Tractament de l'RNA amb fosfatasa alcalina per 5' RLM-RACE

1. Mesclar en un tub:
 - 10 µg RNA (provinent d'RNA total)
 - 2 µL 10X CIP buffer
 - 2 µL fosfatasa alcalina (CIP)
 - Fins 20 µL H₂O lliure de nucleases
2. Incubar 1 h a 37 °C.

3.4.14.3 Purificació de l'RNA

1. Afegir al tub anterior:
 - 15 µL solució d'acetat d'amoni (proporcionada en el kit)
 - 115 µL H₂O milliQ
 - 150 µL fenol àcid : cloroform
2. Vortexar enèrgicament. Centrifugar a més de 10.000 x g durant 5 minuts a temperatura ambient. Transferir la fase aquosa (capa superior) a un tub nou.
3. Afegir 150 µL de cloroform, vortexar enèrgicament, centrifugar a més de 10.000 x g durant 5 minuts a temperatura ambient. Transferir la fase aquosa (capa superior) a un nou tub.
4. Afegir 150 µL d'isopropanol, vortexar enèrgicament i deixar en gel durant 10 minuts.
5. Centrifugar a 13000 x g durant 20 minuts. Rentar el sediment amb 0.5 mL d'etanol 70 % fred, centrifugar a 13000 x g durant 5 minuts. Retirar tot l'etanol i deixar que s'assequi el sediment.

6. Resuspendre el pellet en 11 μL d'aigua milliQ. Reservar 1 μL com a control de la reacció CIP.
7. Continuar amb la següent reacció, o guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.14.4 Tractament de l'RNA amb fosfatasa àcida

1. Mesclar en un tub:
 - 5 μL RNA tractat amb CIP
 - 1 μL 10X TAP buffer
 - 2 μL fosfatasa àcida de tabac (TAP)
 - 2 μL H_2O lliure de nucleases
2. Incubar durant 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Continuar amb la següent reacció, o guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.14.5 Lligació de l'adaptador 5' RACE

1. Mesclar en un tub:
 - 2 μL RNA tractat CIP/TAP
 - 1 μL adaptador 5'-RACE
 - 1 μL 10X RNA lligasa buffer
 - 2 μL T4 RNA lligasa (2.5 U/ μL)
 - 4 μL H_2O lliure de nucleases
2. Incubar durant 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Continuar amb la següent reacció, o guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.14.6 Transcripció inversa per 5' RLM-RACE

1. Mesclar en un tub:
 - 2 μL RNA lligat
 - 4 μL dNTP
 - 2 μL Random decamers
 - 2 μL 10X RT Buffer
 - 1 μL RNase Inhibitor
 - 1 μL MMLV Reverse Transcriptase
 - 8 μL H_2O lliure de nucleases
2. Incubar 1h a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o continuar al pas de PCR.

3.4.14.7 PCR extern per 5' RLM-RACE

- Mesclar en tubs de PCR, en gel:

- 1 µL reacció de RT
- 5 µL 10X PCR Buffer
- 4 µL dNTP
- 2 µL 5' RACE encebador específic de gen (10 µM)
- 2 µL 5' RACE Outer Primer
- 38 µL Nuclease-free Water
- 1 µL 50X DNA polymerase mix (Advantage 2 PCR system, Clontech)

- Realitzar el programa de TouchDown PCR següent:

Desnaturalització inicial		94 °C	3 min
		94 °C	30 seg
Amplificació TouchDown	5x	65 °C	30 seg
		72 °C	30 seg *
		94 °C	30 seg
Amplificació	35x	60 °C	30 seg
		72 °C	30 seg *
Extensió final		72 °C	7 min

* Per dianes majors de 1 kb, afegir 1 minut al temps d'extensió a 72 °C per cada kb.

3.4.14.8 PCR intern per 5' RLM-RACE

- Mesclar en tubs de PCR en gel:

- 1 µL reacció de RT
- 5 µL 10X PCR Buffer
- 4 µL dNTP
- 2 µL 5' RACE encebador intern específic de gen (10 µM)
- 2 µL 5' RACE Outer Primer
- 38 µL Nuclease-free Water
- 1 µL 50X DNA polymerase mix (Advantage 2 PCR system, Clontech)

- Fer el programa de PCR seguint les condicions del PCR extern (punt 3.4.14.7).

3.4.14.9 Transcripció inversa per 3'-RACE

- Mesclar en un tub:

- 2 µL RNA (1 µg d'RNA total o 50 ng de poliA)
- 4 µL dNTP
- 2 µL 3' RACE Adapter

- 2 µL 10X RT Buffer
- 1 µL RNase Inhibitor
- 1 µL MMLV Reverse Transcriptase
- 8 µL Nuclease-free Water

2. Incubar 1h a 42 °C.
3. Guardar a -20 °C o continuar al pas de PCR.

3.4.14.10 PCR extern per 3' RLM-RACE.

1. Mesclar en tubs de PCR en gel:
 - 1 µL reacció de transcripció inversa
 - 5 µL 10X PCR Buffer
 - 1 µL dNTP
 - 2 µL 3' RACE encebador específic de gen (10 µM)
 - 2 µL 3' RACE Outer Primer
 - 38 µL Nuclease-free Water
 - 1 µL 50X DNA polymerase mix (Advantage 2 PCR system, Clontech)
2. Realitzar el programa de PCR següent:

Desnaturalització inicial		94 °C	3 min
		94 °C	30 seg
Amplificació	35x	60 °C *	30 seg
		72 °C	30 seg **
Extensió final		72 °C	7 min

* Utilitzar una temperatura d'anellament de 55 a 65 °C. Un bon punt de partida són els 60 °C, però la temperatura òptima s'ha de determinar empíricament.

** Per dianes majors de 1 kb, afegir 1 minut al temps d'extensió a 72 °C per cada kb.

3.4.15 RT-PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR)

Una PCR convencional (punt 3.4.1) amplifica el DNA de la mostra de manera exponencial, duplicant el nombre de molècules en cada cicle d'amplificació. En la PCR a temps real, la quantitat de DNA amplificat es mesura després de cada cicle a través d'un fluorocrom reporter (Lee et al, 2004; Livak i Schmittgen 2001), que incrementa el seu senyal de manera proporcional al nombre de molècules generades en la fase exponencial de la reacció.

El procés complet inclou l'aïllament de l'RNA, el seu pas a cDNA i l'amplificació mitjançant la PCR.

3.4.15.1 Aïllament d'RNA

El fetge d'orada obtingut segons el punt 3.1.1.3 es pulveritza per assegurar l'homogeneïtzació de les diferents estructures hepàtiques i es manté congelat a -80 °C fins al moment de la seva utilització. Per realitzar l'extracció d'RNA total a partir d'aquest teixit polvoritzat s'utilitza el kit comercial *High Pure RNA Tissue Kit* (Roche).

Una vegada finalitzada l'extracció, es quantifica la concentració d'RNA i es detecta la possible existència de contaminants (DNA, proteïnes) mesurant l'absorbància a 260 nm i 280 nm amb un espectrofotòmetre *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop, Thermo Scientific), tal com s'indica en el punt 3.4.2. Els tubs amb RNA es conserven a -80 °C per evitar-ne la degradació, i quan es fa necessària la seva utilització es descongelen lentament sobre gel.

3.4.15.2 Transcripció inversa de l'RNA (RT)

La síntesi de la cadena de cDNA a partir del motllo d'RNA es dona per acció d'una DNA polimerasa dependent d'RNA, la retrotranscriptasa (RT). A més del motlle d'RNA, aquesta polimerasa necessita dNTPs com a molècules base per a la síntesi, i encebadors per iniciar la nova cadena (hexàmers aleatoris o poliadenina). A la reacció s'afegeixen inhibidors d'RNAses per evitar la degradació de l'RNA.

La reacció es duu a terme a 37 °C durant una hora, incubant en un tub:

1-5 µg RNA

1X tampó de reacció 10X (10X *MMLV-RT buffer*, Promega)

10 µmols dNTPs

125 ng hexàmers aleatoris

20 U RNAsin (*RNase inhibitor*, Promega)

200 U MMLV-RT (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*, Promega)

H₂O milliQ q.s.p. 20 µl

3.4.15.3 PCR quantitativa a temps real (qPCR)

Per monitoritzar l'amplificació de cDNA en la PCR s'utilitza un agent reporter d'unió a cadena doble de DNA, el fluoròfor *SYBR Green* (Life Technologies). Quan la molècula s'intercala al DNA, la seva fluorescència s'incrementa enormement (Morrison et al, 1998). Durant el transcurs de la PCR la intensitat de la fluorescència incrementarà proporcionalment a la quantitat de doble cadena que hi hagi present.

La reacció de PCR es duu a terme en un termociclador amb capacitat de detecció de fluorescència, en tubs òptics adaptats per no interferir en aquesta detecció. L'aparell utilitzat va ésser un *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Life Technologies).

La reacció consta dels mateixos components que una PCR convencional a més del fluoròfor SYBR Green. La mescla de polimerases, fluorocrom i tampó de reacció s'obté comercialment (*2X SYBR Green PCR Master Mix*, Life Technologies). Els oligonucleòtids encebadors han de tenir una longitud entre 19 i 22 nucleòtids, amb un mínim del 50 % de residus G/C, i formar un fragment d'amplificació entre 50 i 300 pb.

La mescla per cada mostra i gen a analitzar té un volum final de 40 µl, que es repartiran en dos tubs diferents de 18 µl per obtenir cada assaig per duplicat.

20 µl *2X SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies)
 300 nM encebador sentit
 300 nM encebador antisentit
 3.2 µl cDNA diluït (*variable*) (obtingut en el punt 3.4.15.2)
 H₂O milliQ q.s.p. 40 µl

Condicions de la PCR:

		50 °C	2 min
		95 °C	10 seg
<hr/>			
Amplificació	40 x	95 °C	15 seg
		62 °C	1 min

El mètode utilitzat per determinar la quantitat del gen d'interès és el mètode comparatiu del llindar [*Comparative threshold (C_T) method (ΔΔC_T)*]. Un cop acabada la reacció, la fluorescència obtinguda es representa mitjançant una corba respecte el cicle de PCR. El cicle llindar o *cycle threshold* és el cicle on es detecta un increment significatiu de ΔRn (magnitud de la senyal de fluorescència generada durant la PCR a cada punt): aquest cicle ens donarà el valor de C_T. Contra major és la quantitat de cDNA inicial, abans es detectarà el producte de PCR, i menor és el seu valor de C_T. La fluorescència obtinguda es normalitza automàticament dividint la intensitat d'emissió del marcador reporter per la intensitat d'emissió de la referència passiva. En el cas de la nostra mescla comercial s'utilitzà ROX (6-carboxi-X-rodamina) com a referència interna per normalitzar el senyal de SYBR Green.

El valor de C_T obtingut pel gen diana s'ha de normalitzar amb el valor de C_T d'un o diversos gens normalitzadors, per obtenir el valor ΔC_T. Com a gens normalitzadors s'han utilitzat els gens de l'RNA ribosomal 18S i de la β-actina. Aquest valor de ΔC_T es calcula per a cada mostra que es desitja quantificar.

$$\Delta C_T = C_T(\text{gen diana}) - C_T(\text{gen normalitzador})$$

Una de les mostres de la sèrie analitzada s'escull com a valor de referència per efectuar la comparació entre la resta de les mostres, obtenint el valor de $\Delta\Delta C_T$.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{mostra } X) - \Delta C_T(\text{mostra referència})$$

L'últim pas és transformar els valor en valors absoluts.

$$\text{valor d'expressió} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Abans de dur a terme la quantificació relativa de les mostres s'ha de dur a terme dos assajos previs per a cada gen a analitzar: la corba de dissociació dels oligonucleòtids i la corba de concentracions.

Corba de dissociació dels oligonucleòtids

Pas important en treballar amb SYBR Green com a agent reporter, ja que s'intercala en la doble cadena de DNA de manera inespecífica i es podrien detectar productes de PCR no específics, o la dimerització d'oligonucleòtids. El procediment es basa en comprovar que cada mostra dóna un únic pic de fluorescència a la temperatura de fusió del fragment d'amplificació, i que no hi ha cap detecció en els pous sense cDNA. A més és convenient fer una electroforesi del producte de PCR per comprovar que la mida i el nombre de bandes és l'esperat.

Corba de concentracions

Permet saber el rang de concentració inicial de mostra on obtindrem uns resultats de C_T fiables. Es determina sotmetent diferents dilucions de cDNA a la reacció de qRT-PCR i representant els valors de C_T obtinguts respecte els valors logarítmics de la dilució realitzada. La representació hauria de resultar una recta, tant en la representació pel gen normalitzador com en el d'estudi.

3.5 Tècniques de cultiu de llevats – assaig de doble híbrid

L'assaig doble híbrid es pot utilitzar per identificar noves interaccions proteïna-proteïna, confirmar interaccions ja detectades, i definir els dominis d'interacció entre dues proteïnes. Per dur a terme l'assaig de doble híbrid utilitzarem el kit comercial *Matchmaker Yeast Two-Hybrid library construction and screening kit* (Clontech).

En aquest sistema, el gen esquer s'expressa com a proteïna de fusió al DNA-BD del factor de transcripció GAL4, mentre que un altre gen o cDNA s'expressa com a proteïna de fusió a l'AD del mateix factor de transcripció (Fields i Song, 1989; Chien et al, 1991). Quan la proteïna de

fusió esquer i la proteïna de fusió de la biblioteca de cDNA interaccionen en una soca reportera de llevat com la AH109, el DNA-BD i el AD estan suficientment a prop com per activar gens reporters, com *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* i *MEL1*. L'expressió d'aquests gens permetrà a la soca de llevat créixer en medis deficientes en determinats aminoàcids (figura 10).

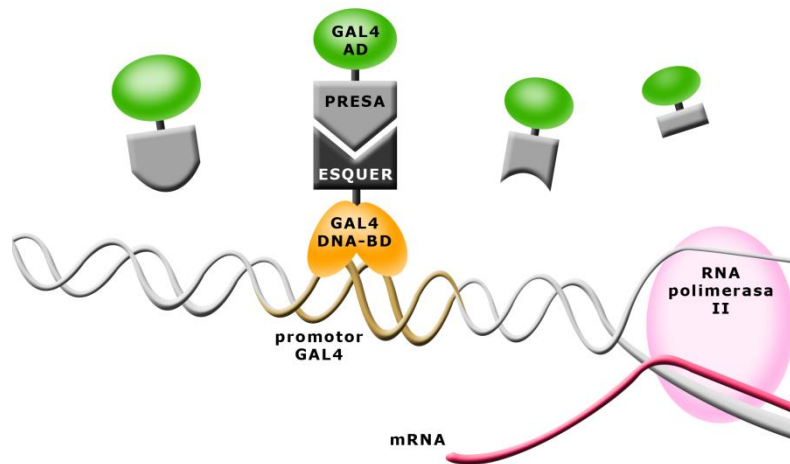


Figura 10. Representació esquemàtica de l'assaig de doble híbrid. El domini d'unió al DNA del factor de transcripció GAL4 es fusiona a la proteïna esquer, i el domini activador del mateix factor es fusiona a les proteïnes presa. Quan les proteïnes presa i esquer interaccionen, el factor de transcripció es reconstitueix, i és capaç d'activar la transcripció de gens reporters.

En aquesta tesi, el DNA-BD i AD de fusió es creen clonant els cDNAs dins dels vectors d'expressió en llevat pGBKT7 i pGADT7-Rec, respectivament. En llevats, ambdós proteïnes s'expressen a alts nivells gràcies al promotor constitutiu ADH1.

3.5.1 Soques de llevat utilitzades

Les soques de llevat utilitzades en l'assaig doble híbrid i el seu genotip són les següents:

AH109: MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1.

Y187: MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met⁻, gal80 Δ , URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1.

Abans de realitzar l'assaig, és important comprovar el fenotip de les soques AH109 i Y187, per a la qual cosa es va seguir el protocol següent:

1. Per recuperar les cèl·lules des de l'estock congelat, prendre una mostra amb una punta estèril, i sembrar en una placa YPDA.
2. Incubar les plaques a 30 °C durant 3-5 dies, fins que les colònies apareguin. Propagar cultius addicionals únicament des de colònies aïllades en aquesta primera placa.

3. Repicar 3-4 colònies en plaques amb el medi selectiu SDM apropiat (taula a sota).
4. Incubar les plaques a 30 °C durant 4-6 dies. Els llevats creixen més lentament en medis selectius que en YPDA.
5. Comparar els resultats amb la taula següent, i seguir només amb les colònies que tenen els fenotips esperats. El símbol + indica que el creixement ha de ser positiu, mentre que el símbol - indica que no hi ha d'haver creixement de la soca en el medi indicat.

	SDM/-Ade	SDM/-Met	SDM/-Trp	SDM/-Leu	SDM/-His	SDM/-Ura	YPDA
AH109	-	+	-	-	-	+	+
Y187	-	-	-	-	-	+	+

3.5.2 Medis i solucions utilitzades

YPDA

20 g/L peptona

10 g/L extracte de llevat

20 g/L agar (només en cas de ser medi sòlid)

15 ml/L adenina hemisulfat 2 %

Ajustar a pH 6.5 i autoclavar.

Un cop el medi s'hagi refredat a 55 °C, afegir 50 ml/L de glucosa al 40 % (concentració final de glucosa, 2 %).

Plaquejar en cas que es tracti de medi sòlid.

YPD

20 g/L peptona

10 g/L extracte de llevat

20 g/L agar (només en cas de ser medi sòlid)

Ajustar a pH 6.5 i autoclavar.

Un cop el medi s'hagi refredat a 55 °C, afegir 50 ml/L de glucosa al 40 % (concentració final de glucosa, 2 %).

Plaquejar en cas que es tracti de medi sòlid.

SDM

1.72 g/L YNB (*Yeast Nitrogen Base*)

5 g/L sulfat d'amoni

20 g/L agar (només en cas de ser medi sòlid)

100 ml/L de suplement DO (*Dropout*) 10x o 1X sòlid comercial, segons convingui

Les solucions DO permeten la creació de medis deficients en certs aminoàcids. Per exemple, un medi SDM/-Leu es prepara amb una base de SDM i el DO que contindrà tots els aminoàcids indicats excepte la leucina. Per preparar els suplementes DO 10X es mesclen tots els nutrients, excepte el que volem excloure, en aigua destil·lada, i s'autoclava.

Concentració DO 10X	Nutrient
200 mg/L	L-adenina hemisulfat, sal
200 mg/L	L-arginina HCl
200 mg/L	L-histidina HCl monohidrat
300 mg/L	L-isoileucina
1000 mg/L	L-lisina HCl
200 mg/L	L-metionina
500 mg/L	L-fenilalanina
2000 mg/L	L-treonina
200 mg/L	L-triptòfan
300 mg/L	L-tirosina
200 mg/L	L-uracil
1500 mg/L	L-valina

Ajustar a pH 5.8 i autoclavar.

Un cop el medi s'hagi atemperat a 55 °C, afegir glucosa fins a una concentració final del 2 %, i l'antibiòtic si es requereix (especificat en cada cas).

Plauejar en cas que es tracti de medi sòlid.

3.5.2 Tests previs a l'assaig de doble híbrid

Un cop clonat el gen esquer dins del vector pGBKT7 cal realitzar dos tests abans de continuar amb l'assaig de doble híbrid. Es tracta dels tests d'activació transcripcional i de toxicitat de la proteïna de fusió al DNA-BD.

3.5.2.1 Test d'activació transcripcional del DNA-BD de fusió

Aquest protocol es basa en comprovar que la proteïna de fusió al DNA-BD no és capaç per si sola de promoure la transcripció dels gens reporters.

1. Transformar les soques AH109 i Y187 amb el constructe de fusió utilitzant una transformació a petita escala.
2. Plaquejar els transformants en els medis següents:

SDM/-Trp

SDM/-His/-Trp

SDM/-Ade/-Trp

3. Analitzar els resultats.

Proteïna esquer inactiva: les colònies no creixen en el medi SDM/-His/-Trp ni SDM/-Ade/-Trp.

Proteïna esquer activa: les colònies creixen en el medi SDM/-His/-Trp o SDM/-Ade/-Trp.

3.5.2.2 Test de toxicitat del DNA-BD de fusió

Aquest protocol es basa en comparar el rati de creixement en medi líquid de la soca Y187 transformada amb el vector buit i amb el vector que expressa el gen esquer. Si la soca que expressa la proteïna esquer creix significativament més lenta, la proteïna pot ésser tòxica per a la cèl·lula de llevat.

1. Inocular 50 ml de SDM/-Trp/Kan (20 µg/ml) amb una colònia gran (2-3 mm).
2. Incubar a 30 °C durant 16-24 hores amb agitació de 250-270 rpm.
3. Comprovar la OD₆₀₀ del cultiu: ha de ser ≥0.8. Si és inferior a 0.8, la proteïna de fusió al DNA-BD podria ser tòxica.
4. Centrifugar a 600 x g durant 5 minuts.
5. Resuspendre en 5 ml de medi líquid SDM/-Trp. Comptar les cèl·lules utilitzant un hemacitòmetre. La densitat cel·lular ha de ser ≥1 x 10⁹ cèl·lules/ml.
6. Utilitzar aquesta soca transformada per aparellar-la amb la soca AH109 que contingui la biblioteca de fusió al AD.

3.5.3 Construcció de la biblioteca de cDNA de fetge d'orada

La construcció de la biblioteca es va dur a terme prèviament en el laboratori a partir d'RNA aïllat de fetge d'orada, seguint el protocol proporcionat pel kit comercial *Matchmaker Yeast Two-Hybrid library construction and screening kit* (Clontech).

3.5.4 Preparació de cèl·lules de llevat competents

1. Inocular una colònia de 2-3 mm de diàmetre en 3 ml de medi YPDA en un tub de centrífuga de 15 ml.
2. Incubar a 30 °C en agitació durant 8 hores.
3. Transferir 5 µl del cultiu a un erlenmeyer de 250 ml que contingui 50 ml de medi YPDA.
4. Incubar a 30 °C en agitació a 230-250 rpm durant 16-24 hores. La OD₆₀₀ ha d'arribar a 0.15-0.3.
5. Centrifugar les cèl·lules a 700 x g durant 5 minuts a temperatura ambient.
6. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 100 ml de medi YPDA.
7. Incubar a 30 °C durant 3-5 hores (fins que la OD₆₀₀ sigui de 0.4-0.5).
8. Centrifugar les cèl·lules a 700 x g durant 5 minuts a temperatura ambient.
9. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 60 ml d'aigua destil·lada estèril.
10. Centrifugar les cèl·lules a 700 x g durant 5 minuts a temperatura ambient.
11. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 3 ml de solució 1.1X TE/LiAc (550 µl TE 10X, 550 µl LiAc 10X, 3.9 mL d'aigua destil·lada estèril).
12. Separar la solució en dos tubs eppendorf de 1.5 ml.
13. Centrifugar a 13000 x g durant 15 segons.
14. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 600 µl de solució 1.1X TE/LiAc.

3.5.5 Transformació de llevats a petita escala

1. Preparar cèl·lules de llevat competents (punt 3.5.4).
2. En tubs eppendorf de 1.5 ml afegir seguint aquest ordre:
 - 250 ng de DNA
 - 5 µl de *Herring Testes Carrier DNA* (10mg/ml, proporcionat pel kit), desnaturalitzat*
 - 50 µl de cèl·lules competents
 - 500 µl de solució de PEG/LiAc (proporcionat pel kit)

* escalfar a 100 °C durant 5 minuts, i repetir el procés abans d'afegir al tub.
3. Incubar a 30 °C durant 30 minuts. Agitar cada 10 minuts.
4. Afegir 20 µl de DMSO a cada tub, barrejar, i incubar a 42 °C durant 15 minuts. Agitar cada 5 minuts.
5. Centrifugar a 13000 x g durant 15 segons.

6. Retirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 1 ml de YPD *Plus Liquid Medium* (proporcionat pel kit).
7. Incubar a 30 °C durant 90 minuts.
8. Centrifugar a 13000 x g durant 15 segons.
9. Descartar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 1 ml de NaCl *Solution* (proporcionada pel kit).
10. Sembrar en el medi que requereixi el plasmidi transformat.
11. Incubar les plaques a 30 °C durant 2-4 dies, fins que apareguin les colònies.

3.5.6 Cribatge de la biblioteca per aparellament de llevats

3.5.6.1 Transformació de la soca AH109 amb el cDNA de doble cadena (ds cDNA) i el vector pGADT7-Rec

1. Preparar cèl·lules competents.
2. Mesclar en un tub de 15 ml
 - 20 µl ds cDNA (obtingut al punt 3.5.3)
 - 6 µl pGADT7-Rec (0.5 µg/µl)
 - 20 µl *Herring Testes Carrier DNA*, desnaturalitzat (punt 3.5.5)
3. Afegir 600 µl de cèl·lules competents al DNA.
4. Mesclar suaument al vòrtex.
5. Afegir 2.5 ml de solució PEG/LiAc (proporcionada pel kit).
6. Incubar 45 minuts a 30 °C. Mesclar cada 15 minuts.
7. Afegir 160 µl de DMSO, mesclar, i incubar 20 minuts en un bany a 42 °C. Mesclar les cèl·lules cada 10 minuts.
8. Centrifugar a 700 x g durant 5 minuts.
9. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 3 ml de YPD *Plus Liquid Medium* (proporcionat pel kit).
10. Incubar en agitació durant 90 minuts a 30 °C.
11. Centrifugar a 700 x g durant 5 minuts.
12. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 30 ml de solució de NaCl al 0.9 %.

3.5.6.2 Selecció dels transformants en plaques SDM/-Leu

1. Sembrar 150 µl a cada placa de 150 mm. Per calcular l'eficiència de la transformació, sembrar 100 µl de dilucions 1:10, 1:100, 1:1000 i 1:10000 en plaques de 100 mm SDM/-Leu.

2. Incubar les plaques cap per avall a 30 °C fins que apareguin colònies (3-6 dies).
3. Calcular l'eficiència de transformació (nombre de transformants/ 3 µg pGADT7-Rec).

3.5.6.3 Recollida dels transformants

1. Refredar les plaques a 4 °C durant 3-4 hores.
2. Afegir 5 ml de medi de congelació a cada placa (YPD, 25 % (v/v) glicerol).
3. Utilitzar comptes de vidre estèrils per disgregar les cèl·lules en el líquid.
4. Combinar tots els líquids en un tub estèril i barrejar bé.
5. Comprovar i ajustar la densitat cel·lular a $\leq 2 \times 10^7$ cèls/ml amb un hemacitòmetre.
6. Aliquotar i guardar a -80 °C.
7. Per determinar el títol de la biblioteca, sembrar 100 µl de dilucions 1:100, 1:1000 i 1:10000 en plaques de 100 mm SDM/-Leu. Incubar a 30 °C fins que apareguin colònies, comptar-les i calcular el nombre de clons a la biblioteca.

3.5.6.4 Aparellament de la soca de la biblioteca (presa) amb la soca esquer

1. Descongelar una alíquota de 1 ml de la soca AH109 transformada amb la biblioteca.
2. Combinar el cultiu de 5 ml de la soca esquer Y187 (punt 3.5.2.2) i l'alíquota de la soca que conté la biblioteca AH109 en un erlenmeyer de 2 L.
3. Afegir 45 ml de 2X YPDA/Kan (50 µg/ml) i barrejar.
4. Rentar el vial de la soca AH109 amb dues alíquotes de 1 ml de 2X YPDA/Kan (50 µg/ml) i afegir-ho.
5. Incubar a 30 °C durant 20-24 hores amb agitació suau (30-50 rpm). Una agitació major podria reduir significativament l'eficiència de l'aparellament.
6. Centrifugar a 1000 x g durant 10 minuts. Mentrestant, rentar el flascó dues vegades amb 50 ml de 0.5X YPDA/Kan (50 µg/ml) i utilitzar-ho per resuspendre les cèl·lules.
7. Centrifugar a 1000 x g durant 10 minuts. Resuspendre les cèl·lules en 10 ml de 0.5X YPDA/Kan (50 µg/ml), i mesurar el volum total de cèl·lules en el medi.

3.5.6.5 Selecció dels llevats diploides que expressen les proteïnes amb potencial d'interacció

1. Per determinar l'eficiència de l'aparellament, plaquejar 100 µl de dilucions 1:100, 1:1000 i 1:10000 en plaques de 100 mm SDM/-Leu, SDM/-Trp i SDM/-Leu/-Trp.
2. Plaquejar la resta de volum en plaques TDO (*Triple Dropout Medium*, SDM/-His/-Leu/-Trp) i QDO (*Quadruple Dropout Medium*, SDM/-Ade/-His/-Leu/-Trp), utilitzant 200 µl per cada placa de 150 mm.

3. Incubar de 5 a 7 dies a 30 °C, fins que apareguin colònies. Les colònies esperades són de color blanc o rosa pàl·lid i poden mesurar més de 2 mm.
4. Fer el recompte del creixement en les plaques SDM/-Leu, SDM/-Trp i SDM/-Leu/-Trp i calcular l'eficiència de l'aparellament i el nombre de colònies cribades (punt 3.5.6.6).
5. Replicar en plaques de medi QDO les colònies que han crescut en medi TDO. Incubar a 30 °C durant 3-8 dies.

3.5.6.6 Càlcul de l'eficiència de l'aparellament i el nombre de colònies

cribades

1. Comptar les colònies (UFC) que han crescut en els medis SDM/-Leu, SDM/-Trp i SDM/-Leu/-Trp en les dilucions on la placa tingui 30-300 UFC.
2. Calcular les UFC/ml viables en cada medi seguint la fórmula:

$$\frac{UFC}{\text{volum plaquetat (ml)} \times \text{factor dil.}} = UFC/ml \text{ viables}$$

Les UFC/ml en medi SDM/-Leu corresponen a la viabilitat de la soca Y187, mentre que en medi SDM/-Trp corresponen a la viabilitat de la soca AH109. Les UFC/ml en medi SDM/-Leu/-Trp indiquen la viabilitat dels diploides. La soca amb la viabilitat més baixa és la soca limitant.

3. Calcular l'eficiència de l'aparellament seguint la fórmula:

$$\frac{UFC/ml \text{ dels diploids}}{UFC/ml \text{ de la soca limitant}} \times 100 = \% \text{ de diploides}$$

4. Calcular el nombre de clons cribats:

$$UFC/ml \text{ dels diploides} \times \text{volum de resuspensió (ml)} = \text{nombre de clons cribats}$$

3.5.7 Anàlisi de les interaccions positives

Els transformants AD/biblioteca poden contenir més d'un plasmidi, la qual cosa pot complicar l'anàlisi dels possibles positius. Per aquesta raó és convenient sembrar les colònies positives en els medis restrictius TDO i QDO 2 o 3 vegades per segregar els plasmidis AD/biblioteca i recomprovar-ne el fenotip. D'aquesta manera també serà més fàcil aïllar els plasmidis per a la seva posterior identificació.

3.5.7.1 Recuperació de l'insert de cDNA de la biblioteca assajada

1. Aïllar el plasmidi del llevat utilitzant un kit d'aïllament de plasmidis en llevats, *Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep II* (Zymo Research).
2. Transformar l'extracte de plasmidi del llevat en una soca d'*E. coli* (punt 3.4.9.4).

3. Plaquejar en medi LB amb ampicil·lina per seleccionar només els plasmidis AD/biblioteca .
4. Purificar el plasmidi AD/biblioteca, analitzar-lo per PCR per identificar-ne la mida i seqüenciar-lo per identificar la proteïna que codifica.

3.6 Tècniques de cultiu de línies cel·lulars

El manteniment dels cultius cel·lulars es realitza en condicions estèrils per tal d'evitar contaminacions. La manipulació dels cultius es duu a terme en una campana de flux laminar, que es manté irradiada amb llum ultravioleta quan no s'utilitza. La superfície de la campana es descontamina amb etanol al 70 % o amb altres productes (Virkon, Bayer), abans i després de cada ús. Tot el material utilitzat ha de ser estèril, ja sigui estèril d'origen, o esterilitzat per autoclau o amb un filtre de 0.22 µm.

Les diferents línies cel·lulars es mantenen congelades en criotubs en nitrogen líquid, tot i que per períodes curts es poden mantenir congelades a -80 °C. Per tal d'aconseguir la major viabilitat cel·lular, la congelació es produeix lentament en presència d'un agent crioprotector, per evitar la formació de cristalls que puguin malmetre la integritat cel·lular, i la descongelació es produeix ràpidament, per eliminar el crioprotector (que és potencialment tòxic).

Per norma general, la confluència en una placa de cultiu provoca canvis bioquímics, funcionals i morfològics que convé evitar. La dilució del cultiu s'aconsegueix amb la tripsinització, una tècnica que permet recuperar les cèl·lules adherides a la placa. La freqüència amb que s'haurà d'aplicar és variable, ja que les condicions de creixement (medi de creixement, condicions ambientals, ritme de divisió, etc.) són diferents per a cada línia cel·lular.

3.6.1 Línies cel·lulars utilitzades

Cèl·lules SBL (Castric, 1984): línia cel·lular adherent derivada de larva de llobarro (Sea bass larvae). Les cèl·lules creixen en medi MEM suplementat amb un 10 % de sèrum fetal boví (FBS), 100 UI/ml de penicil·lina i 50 µg/ml d'estreptomicina. Aquesta línia cel·lular es cultiva a temperatura ambient i no requereix una atmosfera amb intercanvi de CO₂.

Cèl·lules 293A (ATCC CRL-1573): línia cel·lular adherent derivada de ronyó embrionari humà. La línia cel·lular 293A és un subclon de la línia cel·lular HEK293 amb una millor adherència a la placa. Les cèl·lules creixen en medi DMEM suplementat amb un 10 % de sèrum fetal boví (FBS), 2 mM de glutamina, 110 mg/L de piruvat sòdic, 100 UI/ml de penicil·lina i 50 µg/ml d'estreptomicina. Les condicions de cultiu d'aquesta línia són en un incubador a 37 °C i una atmosfera humida amb el 5 % de CO₂.

3.6.2 Medis i reactius

MEM, Hank's balanced salts: *Minimum Essential Medium* (21575-022, Gibco, Life Technologies) que conté la mescla de sals òptima pel creixement en atmosfera sense intercanvi de CO₂.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco, Life Technologies).

FBS: *Foetal Bovine Serum* (Gibco, Life Technologies). Cal escalfar-lo a 50 °C durant 20 minuts abans de ser utilitzat, per tal d'inactivar les proteïnes del complement.

Penicil·lina/estreptomicina: solució de 10000 UI/mL penicil·lina i 5000 µg/mL estreptomicina (Gibco, Life Technologies).

TrypLE Express: derivat de la tripsina amb un origen no animal que redueix el dany cel·lular que causen els altres enzims presents en els extractes de tripsina convencionals (12605-010, Gibco, Life Technologies).

OptiMEM: medi formulat especialment per utilitzar en les mescles de transfecció mediada per polímers o lípids catiónics (31985-062, Gibco, Life Technologies).

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, amb un pH de 7.4 i esterilitzat.

3.6.3 Arrencada, manteniment i congelació de cultius cel·lulars

3.6.3.1 Arrencada del cultiu cel·lular

1. Descongelar el criotub amb les cèl·lules ràpidament a 37 °C.
2. Transferir les cèl·lules a un tub de centrifuga amb 7ml de medi.
3. Centrifugar a 200 x g durant 5 minuts.
4. Aspirar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en el medi idoni.
5. Transferir a les ampolles o plaques amb medi.

3.6.3.2 Manteniment del cultiu: tripsinització

1. Aspirar el medi completament amb una pipeta de vidre.
2. Fer un rentat amb 5 ml de PBS 1X. Aspirar completament. Aquest pas garanteix que no quedi medi que pugui inactivar la tripsina.
3. Afegir 1 ml de TrypLE Express, i deixar actuar 5 minuts.
4. Resuspendre les cèl·lules en medi complet.

5. Repartir en ampolles o plaques noves, que ja contindran la resta del medi fins arribar al volum final.

3.6.3.3 Congelació del cultiu cel·lular

1. Tripsinitzar.
2. Resuspendre en medi i centrifugar a 200 x g durant 2-3 minuts.
3. Resuspendre les cèl·lules en 1 ml de solució de congelació, que conté el medi, un 20 % de sèrum fetal boví, i 10 % de DMSO (agent crioprotector), i guardar en un criotub.
4. Congelar a -80 °C el criotub dins un recipient Mr. Frosty (Nalgene), que garanteix una baixada d'un grau centígrad per minut.

3.6.4 Transfecció transitòria de cèl·lules

La transfecció és el procés d'introduir àcids nucleics dins de cèl·lules eucariotes, utilitzant mètodes no virals. Típicament implica obrir transitòriament porus a la membrana cel·lular, permetent l'entrada de material dins la cèl·lula. El procés de la transfecció es pot dur a terme mitjançant diferents mètodes, tant físics, com l'electroporació, com també químics, com ara el fosfat càlcic, o molècules catióniques per produir liposomes, que es fusionaran a la membrana i dipositaran el seu contingut a dins.

3.6.4.1 Transfecció pel mètode del fosfat càlcic

Aquest mètode es basa en la coprecipitació del DNA exogen amb fosfat càlcic, facilitant la penetració del DNA en la cèl·lula (Graham i Van der Eb, 1973). La maquinària de transcripció endògena permetrà expressar els gens transfectats. Va ésser el mètode utilitzat en aquesta tesi per transfectar la línia cel·lular 293A. Un cop disposem de les cèl·lules en plaques de 6 pous en quantitat adequada (50 % de confluència), procedim a la transfecció.

1. Preparar en un tub la mescla de transfecció per a cada pou de 3 cm de diàmetre.
 - 6 µg de plasmidi total
 - H₂O milliQ fins 90 µL
2. Afegir a la mescla 10 µL de CaCl₂ 2,5 M i mesclar amb el vòrtex.
3. Afegir gota a gota 100 µL de BBS 2X a l'interior del tub eppendorf anterior, mentre es mescla al vòrtex.
4. Comprovar a un microscopi de contrast de fases 1 µL de la mescla, per observar la formació dels precipitats (temps màxim de 20 minuts).
5. Transfectar el pouet amb els 200 µL de la mescla.

6. Incubar les cèl·lules durant 48 hores per permetre l'expressió dels gens transfectats.
7. Recollir les cèl·lules.

BBS 2X

50 mM BES pH 7.0

280 mM NaCl

1.5 mM Na₂HPO₄

El pH adequat per a la formació dels precipitats és 7. Com que el pH del BBS 2X és un paràmetre crític per a la formació d'un precipitat adequat, es recomana realitzar proves del BBS 2X en un rang de pH entre 6.8 i 7.2.

3.6.4.2 Transfecció mitjançant l'agent de transfecció *Turbofect*

El *Turbofect* (Fermentas) és un reactiu de transfecció formulat a base d'un polímer catiònic en aigua. El polímer forma complexos compactes i estables amb el DNA carregats positivament. Aquests complexos protegeixen el DNA de la degradació i en faciliten l'entrada dins de les cèl·lules eucariotes. En aquest treball va ésser el mètode d'elecció per transfectar la línia cel·lular SBL, i la línia cel·lular 293A en el cas d'experiments de microscòpia. Un cop disposem de les cèl·lules en plaques de 6 pous en quantitat adequada (60-70 % de confluència), procedim a la transfecció.

1. Preparar en un tub en l'ordre indicat la mescla de transfecció per un pou de 3 cm de diàmetre.
 - 94 µL OptiMEM
 - 4 µg de plasmidi total
 - 6 µL *Turbofect* (agitat prèviament el vòrtex)
2. Mesclar al vòrtex breument.
3. Esperar 10 minuts.
4. Transfectar el pouet amb els 100 µL de la mescla.
5. Incubar les cèl·lules durant 48 hores per permetre l'expressió dels gens transfectats.
6. Recollir les cèl·lules.

3.6.5 Anàlisi de l'activitat enzimàtica en extractes cel·lulars

3.6.5.1 Obtenció dels extractes cel·lulars

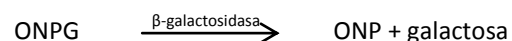
Per obtenir els extractes cel·lular a partir de cèl·lules transfectades s'utilitza un reactiu de lisi cel·lular, CCLR (*Cell culture lysis reagent*, Promega). Aquest reactiu evita la degradació

de les proteïnes i en manté les seves propietats. És apte per mesurar activitats enzimàtiques en els extractes cel·lulars obtinguts si es mantenen en fred. El protocol adaptat a plaques de sis pous és el següent:

1. Aspirar el medi.
2. Rentar cada pou amb 1 ml de PBS 1X.
3. Aspirar el PBS i afegir a cada pou 300 μ L del reactiu CCLR.
4. Deixar actuar durant 10-15 minuts.
5. Transferir el lisat a un tub eppendorf i centrifugar a 13000 x g durant 15 segons a temperatura ambient.
6. Transferir el sobrenedant a un tub eppendorf nou i mantenir a 4 $^{\circ}$ C.
7. Quantificar la proteïna total en l'extracte (punt 3.7.2).
8. Mesurar les activitats enzimàtiques que es requereixin (punts 3.6.5.2 i 3.7.3).

3.6.5.2 Assaig de β -galactosidasa

En totes les mescles de transfecció on es requereix una posterior normalització de l'eficiència de la transfecció s'hi inclou un plasmidi que expressa el gen de la β -galactosidasa sota el promotor del citomegalovirus (pCMV β). La quantitat de proteïna expressada es pot mesurar amb una reacció enzimàtica acoblada a un assaig colorimètric, i ens permetrà saber la relació de cèl·lules que han introduït plasmidi al seu interior, ja que la β -galactosidasa trenca el substrat O-nitrofenil- β -D-galactopiranòsid (ONPG) en dos compostos, un del quals és de color groc (O-nitrofenil, ONP), i es pot mesurar a OD₄₂₀.



1. Mesclar 50 μ l d'extracte cel·lular amb 100 μ l de la mescla següent:
 - 0.3 mM MgCl₂
 - 0.9 mM ONPG (Applichem)
 - 13.5 mM β -mercaptoetanol
 - 0.1 M tampó fosfat (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) pH 7.5
2. Incubar a 37 $^{\circ}$ C fins que la mescla adquireixi una coloració groga.
3. Aturar la reacció amb 250 μ l de 0.5 M Na₂CO₃.
4. Llegir a l'espectrofotòmetre a OD₄₂₀.

3.6.6 Muntatge de cèl·lules per visualització en microscopi confocal

Per a la correcta visualització de cèl·lules en un microscopi confocal, el suport on creixen ha de tenir unes característiques de refracció de la llum particulars. Per poder-les complir, es poden utilitzar cambres de cultiu aptes per la visualització al microscopi, amb un índex de refracció apropiat i un gruix específic que emula el d'un vidre cobreobjectes, o dipositar cobreobjectes estèrils dins dels pous on es cultiven normalment. Les cèl·lules, a més, s'han de fixar amb paraformaldehid (o metanol) per mantenir les estructures cel·lulars intactes. Posteriorment la preparació es munta a un portaobjectes, per així facilitar-ne la manipulació en la visualització al microscopi.

3.6.6.1 Sembra

1. Submergir els cobreobjectes en etanol al 70 %.
2. Amb unes pinces, agafar el cobreobjectes i esterilitzar-lo a la flama. Deixar que s'evapori tot l'etanol.
3. Dipositar un cobreobjectes a cada pou d'una placa de 6 pous.
4. Plaquejar les cèl·lules segons el procediment habitual.

3.6.6.2 Recol·lecció

1. Mantenir les plaques amb el cultiu de cèl·lules en gel durant tots els passos.
2. Fer tres rentats consecutius amb PBS 1X de cada pou.
3. Afegir 1 ml de paraformaldehid/PBS al 4 %.
4. Fixar les cèl·lules durant 10 minuts.
5. Fer tres rentats consecutius amb PBS 1X de cada pou.
6. Deixar les cèl·lules en PBS 1X.

4 % Paraformaldehid/PBS

1. Mesurar 100 ml de PBS 1X, i posar-ho en un flascó amb 4 g de paraformaldehid.
2. Cobrir amb parafilm i treballar en una campana de gasos.
3. Posar en una placa calefactora en agitació moderada, escalfar i afegir NaOH 2M fins que es torni transparent. Afegir HCl 2M fins arribar a pH neutre.
4. Deixar en agitació fins que es refredi.
5. Aliquotar en tubs falcon de 50 ml i guardar al congelador a -40 °C.

3.6.6.3 Muntatge al portaobjectes

1. Posar 20-30 µl de Mowiol al portaobjectes, a la posició on es col·locarà el cobreobjectes, intentant que no quedi cap bombolla.

2. Separar el portaobjectes del pou, amb l'ajuda d'unes pinces.
3. Dipositar el cobreobjectes a sobre la gota de Mowiol, vigilat que les cèl·lules estiguin orientades a la gota.
4. Escalfar els portaobjectes 20 minuts a 70 °C.

Mowiol

1. Posar 6 g de glicerol en un tub de centrifuga de 50 ml amb una barreta agitadora.
2. Afegir 2.4 g de Mowiol 40-88 (324590, Sigma) i agitar fins que es dissolgui.
3. Afegir en agitació 6 ml d' H₂O milliQ i deixar 2 hores a temperatura ambient.
4. Afegir 12ml de 0.2 M Tris, pH 8.5, i 230 µl de 1 % timerosal (pes/volum, en H₂O).
5. Incubar a 50 °C en un bany durant 10 minuts, i agitar periòdicament per dissoldre el Mowiol. Repetir durant hores perquè la majoria del Mowiol es dissolgui.
6. Centrifugar a 5000 x g 15 segons per clarificar la solució.
7. Guardar en alíquotes de 0.5 ml a -20 °C.

3.6.7 Detecció d'estructures subcel·lulars

Per a la visualització d'estructures subcel·lulars en un microscopi confocal prèviament s'hauran de marcar aquestes estructures amb molècules que emetin fluorescència en una longitud d'ona específica. El marcatge es pot fer de diverses maneres. La més ràpida i menys invasiva és utilitzar els rastrejadors, molècules que s'uneixen a estructures subcel·lulars de manera específica, sense necessitat de permeabilitzar la cèl·lula. Alternativament es pot utilitzar un anticòs que s'uneixi a una proteïna específica del compartiment subcel·lular d'interès, i detectar-lo directament o amb la utilització d'un anticòs secundari que emeti fluorescència. Aquest mètode requereix una major manipulació de la preparació, ja que s'ha de permeabilitzar la cèl·lula per permetre l'entrada dels anticossos.

3.6.7.1 Marcatge subcel·lular amb rastrejadors

1. Seguir els protocols de sembra (punt 3.6.6.1). Transfectar si és necessari, i incubar el temps que es requereixi.
2. Retirar el medi de les plaques i incubar amb medi nou que contingui el rastrejador. Les condicions d'incubació i concentracions utilitzades depenen de la línia cel·lular.
3. Seguir el protocol de recol·lecció (punt 3.6.6.2) i muntatge al portaobjectes (punt 3.6.6.3).

Rastreadors utilitzats:

Lysotracker (Lysotracker deep red (L12492), Molecular Probes, Life Technologies): rastreador de lisosomes. Emet fluorescència en una longitud d'ona de vermell llunyà (668 nm). La seva visualització es duu a terme en un microscopi confocal equipat amb un làser HeNe.

ER-Tracker (ER-Tracker Blue-White DPX (E12353), Molecular Probes, Life Technologies): rastreador de reticle endoplasmàtic. Emet fluorescència en una longitud d'ona d'ultraviolat (450 nm). La seva visualització es duu a terme en un microscopi confocal equipat amb un làser de diode.

3.6.7.2 Marcatge subcel·lular amb anticossos: immunodetecció

1. Seguir els protocols de sembra (punt 3.6.6.1) i recol·lecció (punt 3.6.6.2).
2. Continuar a temperatura ambient.
3. Incubar 15 minuts amb 1 ml de buffer de permeabilització (PB: 0.1 % de Triton X-100 (Sigma), 1 % FBS en PBS 1X).
4. Preparar una cambra humida amb una placa de Petri. Dipositar paper Whatman saturat en aigua al fons, i situar a sobre una tira de Parafilm més gran que el cobreobjectes.
5. Dipositar 100 µl de l'anticòs primari en PB damunt de la tira de Parafilm, formant una gota.
6. Dipositar el cobreobjectes amb les cèl·lules fixades i permeabilitzades, de manera que el costat on han crescut les cèl·lules estigui en contacte amb la gota d'anticòs.
7. Incubar 1 hora a temperatura ambient.
8. Rentar 3 cops 10 minuts amb PBS 1X.
9. Afegir sobre una nova tira de Parafilm 100 µl de l'anticòs secundari.
10. Posar el cobreobjectes amb les cèl·lules en contacte amb l'anticòs 1 hora a temperatura ambient, protegint la cambra de la llum.
11. Rentar 3 cops durant 10 minuts amb PBS 1X.
12. Seguir el protocol de muntatge al portaobjectes (punt 3.6.6.3).

Anticossos utilitzats:

STX-6 (Anti-Syntaxin 6 antibody [3D10] (ab12370), Abcam): anticòs primari IgG monoclonal de ratolí que detecta la proteïna syntaxina-6, que es troba de manera constitutiva en *trans*-Golgi i vesícules de secreció.

GM130 (Anti-GM130 antibody (610822), BD Transduction Laboratories): anticòs primari IgG monoclonal de ratolí que detecta la proteïna GM130 que forma part de la matriu de *cis*-Golgi.

Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Life Technologies): anticòs secundari de cabra que detecta els anticòs primaris IgG de ratolí. Emet fluorescència en una longitud d'ona de vermell llunyà (668 nm), la qual cosa permet la seva visualització en un microscopi confocal equipat amb un làser HeNe.

3.6.8 FRET

El FRET (de l'anglès *Förster Resonance Energy Transfer*, o *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) és un mecanisme que descriu la transferència d'energia entre dues molècules sensibles a la llum (cromòfors). El cromòfor donant, en un estat d'excitació electrònica, transfereix energia a un cromòfor acceptor, i l'eficiència d'aquesta transferència és inversament proporcional a la distància entre donant i acceptor. Aquest fenomen es pot utilitzar per determinar si dos fluoròfors amb espectres d'excitació i emissió solapats (l'espectre d'emissió del donant ha de solapar amb el d'absorció de l'acceptor) es troben a certa distància entre ells (típicament entre 1-10 nm). En biologia molecular és una eina molt útil per quantificar interaccions proteïna-proteïna, ja que es poden monitoritzar les dues molècules, una fusionada al cromòfor donant i l'altra a l'acceptor (figura 11).

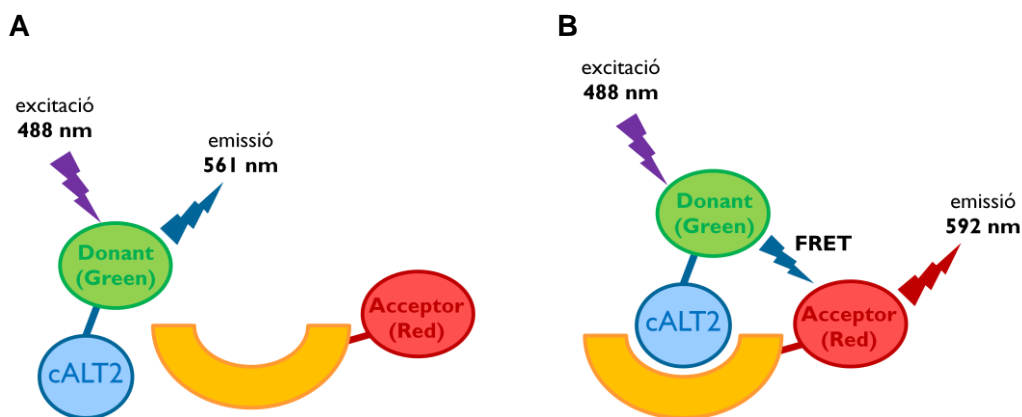


Figura 11. Representació esquemàtica de la metodologia FRET utilitzada per detectar la interacció de cALT2 amb altres proteïnes. La proteïna cALT2 (color blau) es troba fusionada al cromòfor donant (color verd), i una altra proteïna (color groc) es troba fusionada al cromòfor acceptor (color vermell). Quan les dues proteïnes no interaccionen, els cromòfors no estan propers, i no hi ha transferència d'energia del donant a l'acceptor (A). Si les dues proteïnes interaccionen, els cromòfors estan propers, i part de l'energia d'emissió del donant excita el cromòfor acceptor (B).

Per mesurar l'eficiència de FRET en un microscopi confocal es pot utilitzar el mètode de fotoblanqueig de l'acceptor. Aquest mètode consisteix en cremar (o fotoblanquejar) el

cromòfor acceptor, i comparar la intensitat d'emissió del cromòfor donant abans i després del fotoblanqueig. Si els cromòfors donant i acceptor es troben a poca distància, abans del fotoblanqueig, part de l'energia d'excitació del cromòfor donant passa a excitar l'acceptor. Després del fotoblanqueig, el cromòfor acceptor ja no és capaç d'absorbir energia, per tant, el donant no li transferirà part de la seva energia d'excitació, i la intensitat que captarem del donant serà major. Per tant, si les proteïnes que volem assajar interaccionen, la intensitat que es capta del donant incrementa després del fotoblanqueig.

Per quantificar aquest pas d'energia (o el que és el mateix, l'eficiència de FRET) en cada mostra, s'utilitza la següent fórmula:

$$FRET_{eff} = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}} \times 100$$

La fórmula s'expressa en % d'eficiència, i té en compte la intensitat en escala de grisos del donant abans (D_{pre}) i després (D_{post}) del fotoblanqueig de l'acceptor. Valors menors a un 5 % d'eficiència de FRET corresponen al soroll de fons de la tècnica. El màxim teòric de la tècnica es troba en un 30 %.

3.6.8.1 Cromòfors utilitzats i metodologia general

EGFP: cromòfor donant. El seu màxim d'excitació es troba a la longitud d'ona de 488 nm, i el seu màxim d'emissió a 507 nm. El plasmidi pEGFP-N expressa la proteïna EGFP.

DsRed-monomer: cromòfor acceptor. El seu màxim d'excitació es troba a la longitud d'ona de 557 nm, i el seu màxim d'emissió a 592 nm. Els plasmidis pDsRedmon-C i pDsRedmonMCS-N expressen DsRed-monomer.

La línia cel·lular on es vol assajar l'eficiència de FRET es transfecta amb la parella de plasmidis d'expressió dels cromòfors donant i acceptor fusionats a les proteïnes que potencialment interaccionen. El protocol a seguir en aquesta tècnica és l'habitual per al muntatge i visualització de mostres cel·lulars al microscopi (punt 3.6.6).

3.6.8.2 Obtenció d'imatges en microscopi confocal

Les imatges per determinar l'eficiència de FRET a través del mètode del fotoblanqueig s'obtenen utilitzant un microscopi confocal d'escaneig làser Leica SP2 (*True Confocal Scanner Leica TCS SP2*; Leica) i el programa informàtic *Leica Confocal Software* (LCS, Leica). Se selecciona l'opció de tècnica de fotoblanqueig de l'acceptor (*FRET – acceptor photobleaching*) i se segueixen les indicacions del manual. S'obtenen imatges a la longitud d'ona d'excitació del donant i de l'acceptor, abans i després del fotoblanqueig.

Per excitar el cromòfor donant s'utilitza un làser d'Argó a una longitud d'ona de 488 nm. Per excitar el cromòfor acceptor s'utilitza un làser de Kriptó a una longitud d'ona de 561 nm.

Per realitzar el fotoblanqueig en cèl·lules SBL, la intensitat d'excitació de l'acceptor (a la longitud d'ona de 561 nm) es fixa al 100 %, definint 4 passades de fotoblanqueig.

3.6.8.3 Tractament i anàlisi de les imatges

Les imatges obtingudes al microscopi confocal es tracten amb el programa informàtic (*Fiji is just ImageJ* 1.45b (Schneider et al, 2012)). Es defineix una àrea de treball o ROI (*Region Of Interest*) situat dins de la zona fotoblanquejada. En aquesta àrea es mesuren, en escala de grisos, les intensitats corresponents al cromòfor donant abans i després del fotoblanqueig. Per normalitzar els resultats, l'àrea del ROI es fixa per totes les mostres de l'experiment.

A partir dels valors d'intensitat obtinguts es calcular l'eficiència de FRET per a cada parella de constructes.

3.7 Determinació d'activitats enzimàtiques i metabòlits

3.7.1 Obtenció d'extractes proteics de teixit hepàtic

El fetge d'orada obtingut segons l'apartat 3.1.1.3 es polvoritza per assegurar l'homogeneïtzació de les diferents estructures hepàtiques i es manté congelat a -80 °C fins al moment de la seva utilització. L'extracte hepàtic s'obté en un tampó on els enzims mantenen les seves propietats, i se separa de la resta de components per centrifugació. Tots els procediments es duen a terme a 4 °C per evitar la degradació de la proteïna.

1. Pesar 50-100 mg de teixit i afegir ràpidament el tampó d'homogeneïtzació en una relació de 1:5 (mg/ μ l, p/v).
2. Homogeneïtzar durant 30 segons en un Polytron-PTA 7 (Kinematica) a la posició 3.
3. Centrifugar durant 30 minuts a 10000 x g per separar l'extracte proteic de la resta de components.
4. Recollir el sobrenedant, quantificar la proteïna total seguint el mètode de Bradford (punt 3.7.2) i determinar les diferents activitats enzimàtiques (punts 3.7.3 a 3.7.9).

Tampó d'homogeneïtzació:

50 mM Tris-HCl

4 mM EDTA

50 mM NaF

1 mM DTT (ditiotreitòl)

250 mM sacarosa

0.5 mM PMSF (fluorur de fenilmetilsulfonil)

Aquesta solució es prepara concentrada 10X, amb l'excepció de la sacarosa, el DTT i el PMSF, que s'afegeixen extemporàniament. Ajustar a un pH de 7.5.

3.7.2 Quantificació de proteïna segons el mètode Bradford

La determinació de proteïna total es va realitzar seguint el mètode de Bradford (Bradford, 1976). El mètode es basa en la formació de complexos entre les proteïnes i el colorant blau *Coomassie brilliant blue G-250*. Aquests complexos es poden mesurar a una longitud d'ona de 600 nm, i l'absorbància a aquesta longitud d'ona és proporcional a la concentració de proteïna a la mostra.

L'assaig s'ha adaptat a un autoanalitzador COBAS MIRA S (Roche), i es duu a terme a 30 °C, mesclant 5 µl de l'extracte proteic obtingut en el pas 3.7.1 o l'extracte cel·lular segons el punt 3.6.5.1 amb reactiu *BioRad Protein assay* (BioRad), diluït cinc vegades en un volum final de 250 µl (Metón et al, 1999b). Els valors d'absorbància a 600 nm s'interpolen a una recta patrò obtinguda a partir de concentracions de 0.125 a 1 mg/ml d'una solució d'albumina sèrica bovina.

3.7.3 Determinació de l'activitat alanina aminotransferasa (ALT)

La determinació de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim s'assaja en els extractes proteics obtinguts segons el pas 3.7.1, i en els extractes cel·lulars segons el punt 3.6.5.1. La reacció va ésser duta a terme utilitzant el kit *ALT/GPT BR* (Linear Chemicals), adaptat a l'ús en l'autoanalitzador COBAS MIRA S (Roche). La reacció es duu a terme a 30 °C. L'ALT catalitza la transferència del grup amino de l'alanina a l'α-cetoglutarat, amb la formació de glutamat i piruvat. Aquest últim és reduït a lactat per acció de la lactat deshidrogenasa (LDH) en presència de NADH. La reacció es monitoritza cinèticament a través de la disminució de l'absorbància a 340 nm, resultat de l'oxidació del NADH, i és proporcional a l'activitat ALT de la mostra. Una unitat d'activitat enzimàtica s'expressa com a quantitat d'enzim que és capaç de consumir 1 µmol de NADH per minut (U).

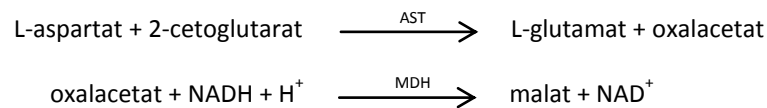


La mescla de reacció amb volum final de 220 µl conté:

109 mM Tris-HCl, pH 7.3
 540 mM L-alanina
 13.5 mM 2-cetoglutarat
 0.23 mM NADH
 0.9 U/ml LDH
 3 µl d'extracte proteic

3.7.4 Determinació de l'activitat aspartat aminotransferasa (AST)

L'activitat enzimàtica d'AST s'assaja en els extractes proteics obtinguts segons el pas 3.7.1. L'assaig es duu a terme utilitzant el kit *AST/GOT BR* (Linear Chemicals), adaptat a l'ús en l'autoanalitzador COBAS MIRA S (Roche). La reacció es duu a terme a 30 °C. L'AST catalitza la transferència del grup amino de l'aspartat a l'α-cetoglutarat amb la formació de glutamat i oxalacetat. Aquest últim és reduït a malat per la malat deshidrogenasa (MDH) en presència de NADH. La reacció es monitoritza cinèticament a través de la disminució de l'absorbància a 340 nm, resultat de l'oxidació del NADH, i és proporcional a l'activitat AST de la mostra. Una unitat d'activitat enzimàtica s'expressa com a quantitat d'enzim que és capaç de consumir 1 µmol de NADH per minut (U).



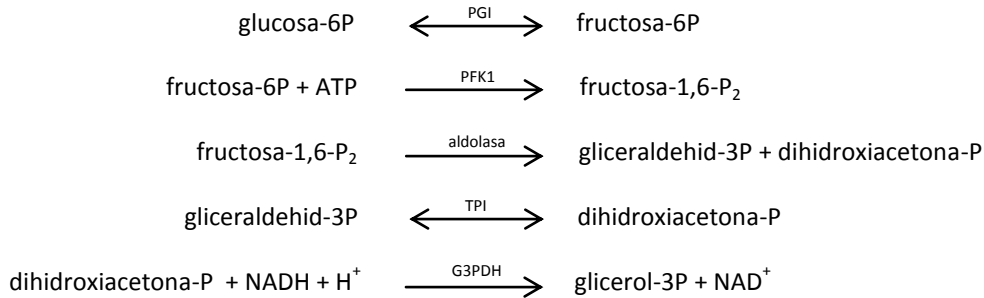
La mescla de reacció amb volum final de 220 µl conté:

87.1mM Tris-HCl, pH 7.8
 261 mM L-aspartat
 13.5 mM 2-cetoglutarat
 0.23 mM NADH
 324 U/l MDH
 432 U/l LDH
 3 µl d'extracte proteic

3.7.5 Determinació de l'activitat 6-fosfofructo-1-cinasa (PFK1)

La determinació de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim s'assajà en els extractes proteics obtinguts segons el pas 3.7.1. La reacció és una adaptació del mètode de Castaño (Castaño et al, 1979) a l'assaig automatitzat en COBAS MIRA S (Roche), i es duu a terme a 30 °C (Metón et al, 1999b). La mescla d'assaig conté glucosa-6P, que isomeritza fàcilment a fructosa-6P per

acció de la fosfoglucosa isomerasa present a l'extracte de la mostra, raó per la qual no és necessari agregar aquest enzim. La reacció es monitoritza registrant el descens d'absorbància a 340 nm degut a la desaparició de NADH durant el curs de l'última reacció acoblada. La unitat d'activitat enzimàtica es defineix com la quantitat d'enzim necessària per consumir 2 μ mol de NADH per minut.



La mescla de reacció amb volum final de 200 μ l conté:

- 100mM Tris-HCl, pH 8.25
- 50 mM KCl
- 5 mM MgCl₂
- 0.15 mM NADH
- 4 mM sulfat d'amoni
- 12 mM β -mercaptoetanol
- 10 mM fructosa-6-fosfat
- 30 mM glucosa-6-fosfat
- 1 mM ATP
- 0.675 U/ml aldolasa
- 5 U/ml LDH TPI (triosafosfat isomerasa)
- 2 U/ml G3PDH (gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa)
- 4 μ l d'extracte proteic

3.7.6 Determinació de l'activitat piruvat cinasa (PK)

La determinació de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim s'assaja en els extractes proteics obtinguts segons el pas 3.7.1. L'assaig es basa en el mètode de Staal (Staal et al, 1975), adaptat a l'autoanaltzador COBAS MIRA S (Roche), i es realitza a 30 °C (Metón et al, 1999b). La cinètica de la reacció se segueix registrant el descens d'absorbància a 340 nm degut a l'oxidació de NADH. La unitat d'activitat enzimàtica de la PK es defineix com la quantitat d'enzim necessària per consumir 1 μ mol de NADH per minut.

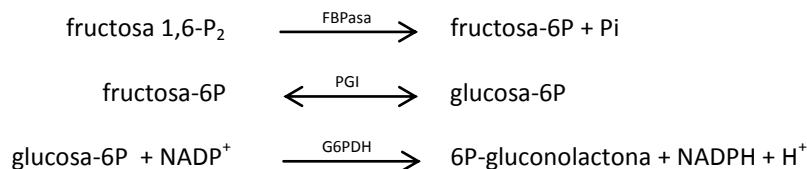


La mescla de reacció amb volum final de 250 µl conté:

- 100mM glicil-glicina pH 7.4
- 100 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 2.5 mM PEP (fosfoenolpiruvat)
- 0.15 mM NADH
- 2.5 mM ADP
- 21 U/ml LDH
- 2.5 µl d'extracte proteic

3.7.7 Determinació de l'activitat fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa)

La determinació de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim s'assaja en els extractes proteics obtinguts segons el pas 3.7.1, adaptant el mètode de Ekdahl i Ekmann (Ekdahl i Ekmann, 1985) a l'assaig automatitzat en COBAS MIRA S (Roche) (Metón et al, 1999b). La reacció, que es duu a terme a 30 °C, se segueix determinant l'increment d'absorbància a 340 nm degut a l'aparició de NADPH. Una unitat d'activitat FBPasa es defineix com la quantitat d'enzim capaç de produir 1 µmol de NADPH per minut.

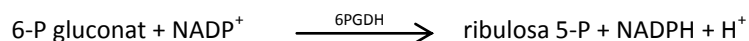


La mescla de reacció amb volum final de 200 µl conté:

- 100mM imidazol-HCl pH 7.7
- 5 mM MgCl₂
- 12 mM β-mercaptoetanol
- 0.5 mM NADH
- 0.05 mM fructosa-1,6-difosfat
- 2.5 U/ml PGI (fosfoglucosa isomerasa)
- 0.48 U/ml G6PDH (glucosa-6-fosfat deshidrogenasa)
- 4 µl d'extracte proteic

3.7.8 Determinació de l'activitat 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6-PGDH)

La determinació de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim s'assajà en els extractes proteics obtinguts segons el pas 3.7.1. L'assaig automatitzat en COBAS MIRA S (Roche) a una temperatura de 30 °C es basà en el mètode descrit per Möellering i Bergmeyer (1984) (Metón et al, 1999b). Es registra l'increment d'absorbància a 340 nm degut a l'aparició de NADPH. La unitat d'activitat enzimàtica es defineix com la quantitat d'enzim capaç de produir 1 µmol de NADPH per minut.

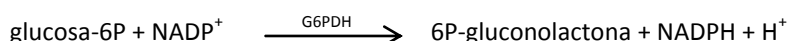


La mescla de reacció amb volum final de 200 µl conté:

- 82.7 imidazol-HCl pH 7.7
- 3 mM MgCl₂
- 1mM 6-fosfogluconat
- 0.5 mM NADP⁺
- 4 µl d'extracte proteic

3.7.9 Determinació de l'activitat glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH)

La determinació de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim s'assajà en els extractes proteics obtinguts segons el pas 3.7.1. L'assaig automatitzat en l'autoanalitzador COBAS MIRA S (Roche) a una temperatura de 30 °C es va basar en el mètode manual descrit per Lee (1982) (Metón et al, 1999b). La reacció es registra a través de l'increment d'absorbància a 340 nm degut a l'aparició de NADPH. La unitat d'activitat enzimàtica es defineix com la quantitat d'enzim capaç de produir 1 µmol de NADPH per minut.



La mescla de reacció amb volum final de 200 µl conté:

- 77.5mM imidazol-HCl pH 7.7
- 5 mM MgCl₂
- 1mM glucosa-6-fosfat
- 1 mM NADP
- 4 µl d'extracte proteic

3.7.10 Determinació de glucosa en sèrum

La determinació de glucosa es va mesurar sobre el sèrum obtingut tal com s'indica en el punt 3.1.1.2, diluït si era necessari per ajustar els valors dins de la recta de calibratge. Per a la

determinació es va utilitzar el kit *Glucose MR* (Linear Chemicals) adaptat a la determinació a 30 °C en l'autoanalitzador COBAS MIRA S (Roche). El mètode es basa en la formació de peròxid d'hidrogen com a resultat de la reacció d'oxidació de la β -D-glucosa de les mostres, i la utilització d'aquest producte en una reacció acoblada que dóna com a resultat final un compost vermell que es pot mesurar a 500 nm. La quantificació s'efectua extrapolant els valors d'absorbància observats amb una recta de calibratge obtinguda a partir de solucions de concentracions entre 6.25 i 200 mg/dl de glucosa.

3.7.11 Determinació de triglicèrids en sèrum

La determinació de triglicèrids es va mesurar sobre el sèrum obtingut tal com s'indica en el punt 3.1.1.2, diluït si era necessari per ajustar els valors dins de la recta de calibratge. Per a la determinació s'utilitzà el kit *Triglycerides MR* (Linear Chemicals) adaptat a la determinació a 30 °C en l'autoanalitzador COBAS MIRA S (Roche). El mètode es basa en la hidròlisi dels triglicèrids en sèrum i una sèrie de reaccions acoblades amb el glicerol resultant de la primera reacció, per finalment observar un compost vermell que es pot mesurar a 500 nm. La quantificació s'efectua extrapolant els valors d'absorbància observats amb una recta de calibratge obtinguda a partir de solucions de concentracions entre 6.25 i 200 mg/dl de glicerol.

3.8 Tractament estadístic de les dades

El tractament estadístic dels resultats es va dur a terme amb el programa informàtic PASW 18 (SPSS, IBM). L'anàlisi estadística entre dues condicions experimentals es va realitzar mitjançant un test T de Student, mentre que per tres o més condicions es va utilitzar un test ANOVA.

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1 Identificació de proteïnes que interaccionen amb cALT2 mitjançant la criba d'una biblioteca de cDNA d'orada utilitzant el sistema doble híbrid en llevat

L'ALT juga un paper molt important com a nexa d'unió entre el metabolisme aminoacídic i el gluconeogènic, ja que és l'enzim encarregat de catalitzar la transaminació reversible entre L-alanina i α -cetoglutarat per formar piruvat i L-glutamat. En l'orada s'han aïllat tres isoformes de l'enzim, dues de localització citosòlica generades per processament alternatiu del gen cALT (cALT1 i cALT2) i una de mitocondrial (mALT) (Metón et al, 2004; Anemaet et al, 2008). Les característiques cinètiques, el patró de distribució tissular i la regulació nutricional i hormonal de l'expressió difereix per a cadascuna de les tres isoformes (Anemaet et al, 2008; Salgado et al, 2012). Donat la rellevància de les diferents isoformes en el metabolisme intermediari és important conèixer la regulació post-traducciona a què poden estar sotmeses.

El sistema doble híbrid en llevat (*Saccharomyces cerevisiae*) es va utilitzar per identificar proteïnes que puguin regular l'activitat de l'ALT citosòlica d'orada mitjançant processos d'interacció proteïna-proteïna. En la figura 12 es resumeix el procediment que es va realitzar.

L'esquer que es va utilitzar va ser la seqüència de cDNA de la cALT2 d'orada fusionada al DNA-BD del factor de transcripció GAL4. Aquesta construcció es va expressar mitjançant el plasmidi pGBKT7-cALT2 a la soca de llevat Y187. La utilització de cALT2 com a esquer es dona perquè el seu mRNA conté un exó més que el missatger de cALT1, fet que es tradueix en la inclusió d'una seqüència de poliasparagines a la regió N-terminal de la proteïna. Les seqüències de poliasparagina estan involucrades en interaccions proteïna-proteïna (Perutz et al, 2002), i això suggereix que l'activitat enzimàtica de cALT2 pot estar regulada per interacció amb proteïnes efectores.

La presa utilitzada va ésser una biblioteca de cDNA de fetge de *Sparus aurata* fusionada a l'AD del factor de transcripció GAL4, i que s'expressà en el plasmidi pGADT7-bib (que indica la mescla de cDNAs de la biblioteca clonada per recombinació homòloga al vector pGADT7-Rec) a la soca de llevat AH109.

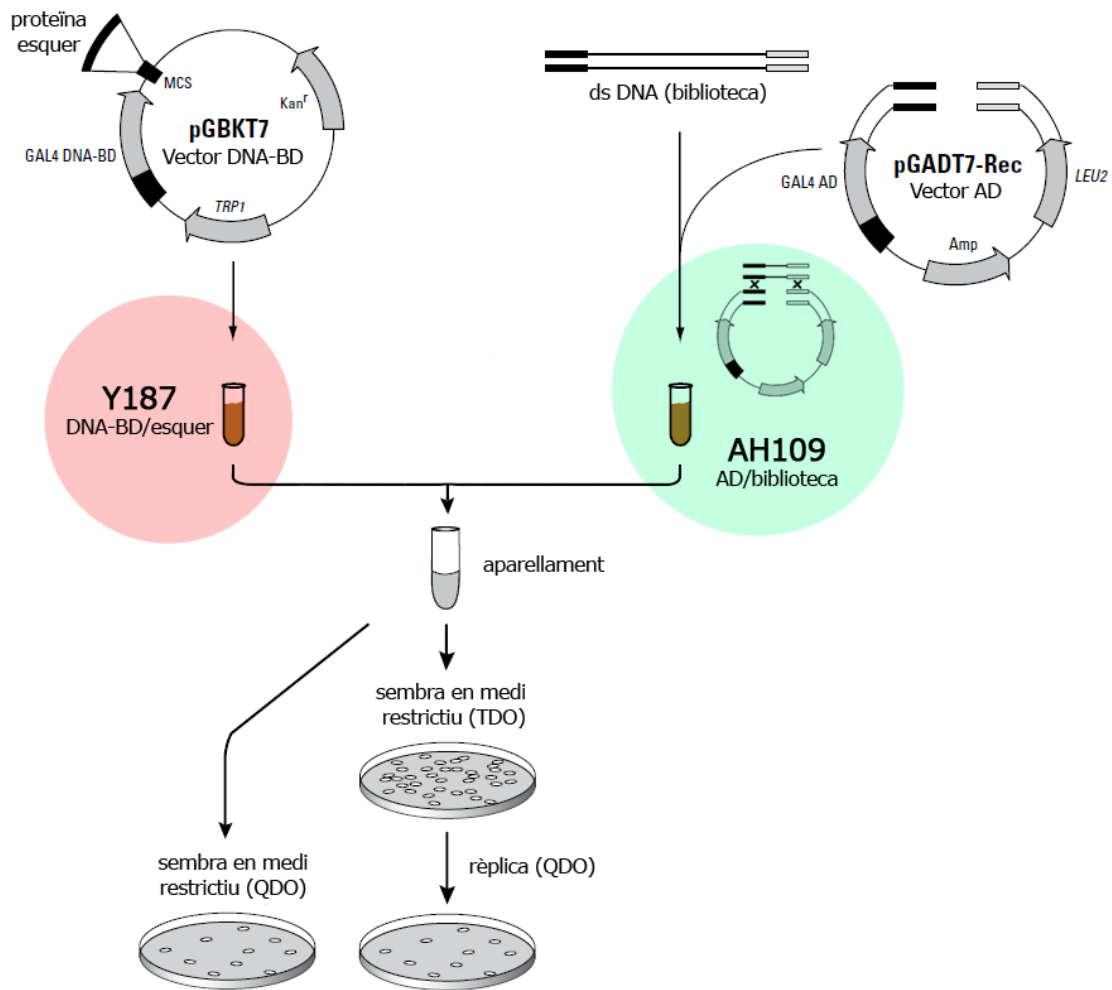


Figura 12. Representació esquemàtica de l'assaig doble híbrid realitzat. La soca Y187 de *Saccharomyces cerevisiae* es transformà amb el constructe pGBKT7-cALT2, i la soca AH109 es transformà amb el vector pGADT7-Rec linealitzat i el cDNA representatiu d'una biblioteca de fetge d'orada. Les dues soques es van aparellar, i es van seleccionar els clons positius per creixement en medis restrictius. Imatge adaptada del protocol *Matchmaker Library Construction & Screening Kit* (Clontech).

4.1.1 Eficiència de la construcció de la biblioteca

La biblioteca de cDNA es va obtenir prèviament al laboratori a partir d'RNA poli A⁺ de fetge d'orada, utilitzant una mescla de fetges provinents d'orades alimentades i d'orades en dejú.

El cDNA es va clonar al vector pGADT7-rec per recombinació homòloga en la soca de llevat AH109. Donat que es tracta del clonatge d'una biblioteca de cDNA, i no d'una proteïna única, es va requerir prèviament transformar el cDNA sintetitzat. Per quantificar la magnitud dels missatgers de la biblioteca representada es va calcular l'eficiència de la transformació i el títol de la biblioteca.

L'eficiència de transformació de la biblioteca va ésser de:

$$0.68 \times 10^6 \text{ transformants} / 3 \mu\text{g de pGADT7} - \text{Rec}$$

Després del recompte en l'hemocitòmetre de les cèl·lules transformades en el volum de medi, el títol de la biblioteca va ésser de:

$$8.7 \times 10^7 \text{ colònies} / \text{ml}$$

L'eficiència de transformació de la biblioteca dóna una idea del nombre de còpies de cDNA clonades per recombinació homòloga dins del vector pGADT7. El títol de la biblioteca ens indica el nombre de clons transformats que tindrem en un volum específic. Com que en cada assaig doble híbrid s'utilitzà 1 ml de la biblioteca, s'assumeix que en cada assaig es va partir de 8.7×10^7 colònies de transformants.

4.1.2 Eficiència de l'aparellament

Les soques Y187 i AH109 de *S. cerevisiae*, que expressaven l'esquer i la presa respectivament, es van aparellar durant 24 hores. El recompte de plaques selectives destinades als càlculs d'eficiència de l'aparellament es va utilitzar per determinar la viabilitat de les diferents soques, i la viabilitat dels diploides.

$$\text{Viabilitat de la soca Y187 expressant pGBKT7} - \text{cALT2: } 2.7 \times 10^7 \text{ colònies} / \text{ml}$$

$$\text{Viabilitat de la soca AH109 expressant pGADT7} - \text{bib: } 7.7 \times 10^7 \text{ colònies} / \text{ml}$$

$$\text{Viabilitat dels diploides: } 5.1 \times 10^4 \text{ colònies} / \text{ml}$$

Els valors de viabilitat de les soques indiquen que la soca Y187 és la limitant, tot i que amb un valor no llunyà del de la soca AH109. En un assaig ideal, la soca limitant hauria d'ésser la soca AH109, que és la que expressa la biblioteca de cDNA fusionada al domini d'activació del DNA de GAL4. El fet que la soca limitant sigui la soca que expressa la proteïna esquer (en el nostre cas és la soca Y187) indica que un percentatge limitat dels clons que expressin les proteïnes presa (expressades a la soca AH109) no es van poder aparellar.

El càlcul de l'eficiència de l'aparellament va ésser:

$$\frac{5.4 \times 10^4 \text{ colònies} / \text{ml dels diploides}}{2.7 \times 10^7 \text{ colònies} / \text{ml de la soca limitant}} \times 100 = 0.19 \%$$

Per últim, es va calcular el nombre de clons cribats en l'assaig de doble híbrid realitzat:

$$5.1 \times 10^4 \text{ colònies/ml de diploides} \times 12 \text{ ml} = 6.12 \times 10^5 \text{ clons}$$

Considerant que el nombre de transformants de la biblioteca en cada assaig doble híbrid va ser de 8.7×10^7 clons, el nombre de clons cribats, que és de 6.12×10^5 clons, és dos ordres de magnitud menor. Aquest resultat indica que és possible que un percentatge de proteïnes representades en la biblioteca, fonamentalment proteïnes amb nivells baixos d'expressió, no hagi pogut aparellar-se i ésser assajat.

4.1.3 Identificació i anàlisi dels clons positius

Els clons diploides capaços de reconstruir l'activitat del factor de transcripció GAL4, degut a una interacció entre les proteïnes esquer i presa, es van seleccionar en plaques TDO. Al cap d'una setmana es van seleccionar les colònies presents a la placa TDO amb un diàmetre superior a 1.5 mm. En total van ésser 8 colònies.

Aquestes 8 colònies es van recomprovar seleccionant-les de nou en medi TDO. A més, es van créixer en medi QDO, que és més restrictiu que el TDO. De les 8 colònies, només una colònia no va ésser capaç de créixer en medi QDO, la colònia 6.

Totes les colònies que van créixer en medi TDO tenien una coloració blanquinosa, i un diàmetre entre 0.5 i 1 mm. En medi QDO adquirien una lleugera tonalitat rosada, degut a la deficiència d'adenina al medi. Aquests fenotips eren els esperats per a les colònies positives. L'única excepció va ésser la colònia 3, que tenia una coloració rosada en tots dos medis, a més d'una estructura molt irregular i amb filaments. El fenotip inusual d'aquesta colònia indica que es podria tractar d'un fals positiu.

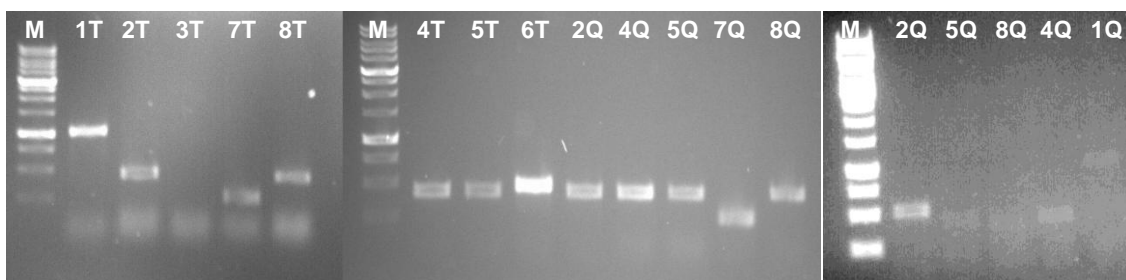


Figura 13. Anàlisi per PCR dels inserts presents en els constructes pGADT7-bib aïllats de les colònies crescudes en medi TDO (1T a 8T) i medi QDO (1Q, 2Q, 4Q, 5Q, 7Q i 8Q). Carril M: marcadore de DNA (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*, Fermentas). Resta de carrils: amplificació d'inserts a partir de les diferents colònies diploides seleccionades en medi TDO (indicades com a T) i QDO (indicades com a Q). El DNA va ésser sotmès a una electroforesi en gel d'agarosa a l'1 % i va ésser visualitzat per tinció amb RedSafe.

Després de repicar les colònies en medi de selecció i obtenir-ne colònies aïllades, se'n va extreure els plasmidis corresponents. Per a cada clon aïllat, es va comprovar que contenien els plasmidis pGBKT7-cALT2 i pGADT7-bib mitjançant una PCR (figura 13). Per detectar el plasmidi

pGBKT7-cALT2 es van utilitzar els oligonucleòtids T7 i pGBKT7-rev. D'altra banda, per detectar el plasmidi pGADT7-bib es van utilitzar els oligonucleòtids T7 i pGADT7-rev.

Tal i com era d'esperar, per a la mateixa colònia, en els dos medis restrictius diferents (TDO i QDO) s'aïllava una banda d'igual mida. La colònia 3 no presentà cap insert i es va descartar per estudis posteriors. Els plasmidis aïllats de les colònies 1, 2, 4, 5, 6, 7 i 8 es van seqüenciar i se'n van identificar fins a cinc proteïnes diferents (taula 3).

Número de colònia	Proteïna	Mida del pèptid aïllat
1	F-lectina	120 aa
2, 4, 8	RPS20	65 aa
5	RBP2	80 aa
6	HABP2	105 aa
7	pèptid no identificat	30 aa

Taula 3. Pèptids aïllats dels clons positius. La proteïna a què pertany cada clon aïllat es va deduir mitjançant un alineament de les seqüències nucleotídica i aminoacídica amb una base de dades (BLAST). La mida es representa amb el nombre de residus d'aminoàcids deduïts a partir de la seqüència de cDNA aïllada del plasmidi pGADT7-bib dels clons positius.

Els pèptids aïllats corresponien a fragments de les proteïnes F-lectina, RPS20 (*Ribosomal Protein s20*), RBP2 (*Retinol Binding Protein 2*), HABP2 (*Hyaluronan Binding Protein 2*), i un pèptid que no es va poder identificar.

4.2 Clonatge i caracterització de les proteïnes aïllades

4.2.1 Obtenció de la seqüència codificant dels clons positius

Com a pas previ a confirmar si les proteïnes identificades eren capaces d'interaccionar amb cALT2 i eventualment modificar l'activitat de l'ALT citosòlica, es va completar la regió codificant dels seus cDNAs mitjançant la tècnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) utilitzant el kit *First Choice RLM-RACE Kit* (Ambion). En el cas de les proteïnes F-lectina, RPS20 i RBP2 només es va requerir el clonatge de la regió 5' del missatger per completar la regió codificant (CDS o *Coding Domain Sequence*), ja que els fragments aïllats en l'assaig doble híbrid corresponien a la regió 3' del cDNA (incloent-hi el codó STOP). En el cas de la proteïna HBP2 es va requerir el clonatge de les regions 5' i 3' del cDNA, perquè el fragment aïllat corresponia a una regió central de la regió codificant.

Per al clonatge de la regió 5' del cDNA de l'F-lectina es van utilitzar els oligonucleòtids MG1001 (per al PCR extern) i MG1002 (per al PCR intern), a més dels propis del kit utilitzat; en el cas d'RPS20 es van utilitzar els oligonucleòtids MG1003 (per al PCR extern) i MG1004 (per al PCR intern); per clonar RBP2 els oligonucleòtids utilitzats van ésser MG1005 (per al PCR extern) i MG1006 (per al PCR intern). Per al clonatge de la regió 5' del cDNA de la proteïna HBP2 es van utilitzar els oligonucleòtids MG1007 (per al PCR extern) i MG1008 (per al PCR intern), i per al clonatge de la regió 3' del cDNA es va utilitzar l'oligonucleòtid MG1009.

Un cop obtingudes les seqüències parcials adjacents a les seqüències aïllades anteriorment, es van dissenyar oligonucleòtids per al clonatge del cDNA complet de les quatre proteïnes. Les parelles d'oligonucleòtids utilitzades van ésser MG1306/MG1308 per al clonatge d'F-lectina, JS-RPS20-F1/JS-RPS20-R1 per al clonatge d'RPS20, MG1311/MG1312 per al clonatge d'RBP2, i MG1309/MG1310 per al clonatge d'HBP2. La regió codificant sencera de les proteïnes es va amplificar a partir d'una RT-PCR utilitzant RNA total de fetge d'orada (50 % peixos alimentats, 50 % peixos en dejú) i es va clonar en el vector pGEM-T easy per obtenir els constructes pGEM-Flectin, pGEM-RPS20, pGEM-RBP2 i pGEM-HBP2. Les seqüències nucleotídiques i aminoacídiques de l'F-lectina (figura 14), RPS20 (figura 15), RBP2 (figura 16) i HBP2 (figura 17) van ésser sotmeses a les bases de dades de EMBL/GenBank amb els números d'accés KM014671, KM014674, KM014673 i KM014672, respectivament.

1	agaacacagg	caaaatcatt	tttctaacca	ggaatcagga	ata ATGAAGC	ACACTGGTGT	
					M K H T G V		6
61	ATTTATTTTG	CTGCTCTTCT	TCGGGTCATG	CTCAGCTTAT	ACTTACCAAA	ATGTGGCCCT	
	F I L L L F F	G S C	S A Y	T Y Q N	V A L		26
121	ACGAGGCAAA	GCAACTCAGT	CATACCGCTA	TGAGCCTAGT	AATTATGGGG	CTGCATACAA	
	R G K A T Q S	Y R Y	E P S	N Y G A	A Y N		46
181	TGCCATTGAT	GGAAACCGCG	AGACTGATTT	TAAAGCCGGT	TCATGCACCC	ATACCGCTGA	
	A I D G N R E	T D F	K A G	S C T H	T A E		66
241	ACAAACCAAC	CCCTGGTGGA	GAGTTGACCT	GCTGGAGTCC	TACATCGTCA	CCTCCGTCAC	
	Q T N P W W R	V D L	L E S	Y I V T	S V T		86
301	CATCACCAAC	AGAGGAGACT	GCTGTCCAGA	AAGGATCAAC	GGAGCAGAGA	TTCGCATTGG	
	I T N R G D C	C P E	R I N	G A E I	R I G		106
361	CAACTACTA	CAAGATCATG	GTGTCACAAA	CCCCTGGCT	GCTGTTATTT	TTGAAAACCC	
	N S L Q D H G	V T N	P L A	A V I F	E N P		126
421	TGCAGTGAAC	TCATTCACTT	TCACTCTCCA	AAATCGTTTT	GAGGGGCGTT	ATGTGACTGT	
	A V N S F T F	T L Q	N R F	E G R Y	V T V		146
481	GGTCTGCCT	GGTCCAAACA	AGATTCTGTC	ACTCTGTGAA	GTGGAGGTTT	ATGGTTACCG	
	V L P G P N K	I L S	L C E	V E V Y	G Y R		166
541	TGCACCAACT	GGAGAGAACC	TGGCACTCCA	AGGAAAAGCG	TCACAATCAT	CTTTGTATGC	
	A P T G E N L	A L Q	G K A	S Q S S	L Y A		186
601	AAATGGAATT	GCTTATAATG	CCATTGATGG	GAATCATGCC	AACAATTTTG	ACCGGGCGTC	
	N G I A Y N A	I D G	N H A	N N F D	R A S		206
661	CTGCACTCAT	ACAAACAACG	ACATGAACCC	ATGGTGGCGT	CTGGATCTGC	GCAAAAACCCA	
	C T H T N N D	M N P	W W R	L D L R	K T H		226
721	CAAAGTGCTT	TCTGTAAAGA	TAACCAATCG	ACATAATTAC	TCTGAACGCC	TTAATGGAGC	
	K V L S V K I	T N R	H N Y	S E R L	N G A		246
781	AGAGATCCGC	ATCGGAGATT	CCCTTGAGAA	CAATGGCAAC	AACAATCCCA	GGTGTGCTCT	
	E I R I G D S	L E N	N G N	N N P R	C A L		266
841	GATCACAGAG	ATCCCAGCAG	GCGCCACTGC	TGAGTTCAG	TGTAACGGTA	TGGATGGCCG	
	I T E I P A G	A T A	E F Q	C N G M	D G R		286
901	CTATGTTACC	GTGGTTATCC	CTGGAAGAGA	AGAGTACCTG	ACGCTGTGCG	AGGTGGAGGT	
	Y V T V V I P	G R E	E Y L	T L C E	V E V		306
961	GTATGGCTCT	GTCTTGATT	AA gctgacaa	ttcacttcat	ttgcaagaat	tcagccaata	
	Y G S V L D -						312
1021	cattgttatg	atctcaaaact	aatcaataat	agattaagct	tcaatttttaa	tgtttgatgt	
1081	tgtttgatga	taaacatcaa	aacaaaaacc	aatgaaagtg	tgtgcaacaa	gggcaaaggt	
1141	tgtctcagac	agacagtagc	actgcaaccg	aaaacactgt	ctagaggaaa	aaaacagctc	
1201	tgtgtgattc	acaagattaa	actcatggct	gaggaaaaat	ggcattagtt	ggacaaaatg	
1261	ggtcttgaat	tcccgcact	gtgttaatgt	cagccaacaa	taatctgcaa	tgaccatgtg	
1321	tgaaattagc	taagctatat	attagctgta	tttaggattt			

Figura 14. Seqüència nucleotídica i aminoàcids deduïts de l’F-lectina de *S. aurata*. Els nucleòtids corresponents a la CDS es troben en majúscules, mentre que les regions 5’ i 3’ UTR es troben en minúscules. Els codons d’inici (ATG) i de final (TAA) estan marcats en negreta. La seqüència d’aminoàcids està marcada amb majúscules i negreta. La seqüència nucleotídica aïllada durant l’assaig de doble híbrid es troba ressaltada en gris.

```

1 ttggttgctc ccattcctgg ctcaccgctg ttcgcttgaa tttatattccg aataagtcgg
61 tcagggggtat tcacaATGGC TTCAAGGAC ACTGGCAAGG CACCTGTTGA GACCGAGGTC 15
      M A F K D T G K A P V E T E V

121 GCCATTCACC GCATCCGCAT CACCCTTACC AGCCGCAATG TCAAATCTCT GGAGAAGGTC
      A I H R I R I T L T S R N V K S L E K V 35

181 TGCCTGACC TGATCCGTGG GGCTAAGGAG AAGAACCTGA AGGTGAAGGG ACCCGTCCGG
      C A D L I R G A K E K N L K V K G P V R 55

241 ATGCCAACCA AGACTCTGCG CATCACCACC AGAAAGACTC CCTGTGGTGA AGGATCCAAA
      M P T K T L R I T T R K T P C G E G S K 75

301 ACCTGGGATC GCTCCAGAT GAGGATCCAC AAGCGCCTGA TTGATCTGCA CAGCCCATCT
      T W D R F Q M R I H K R L I D L H S P S 95

361 GAGATTGTCA AGCAGATCAC CTCCATCAGC ATTGAACCAG GTGTAGAGGT TGAGGTTACC
      E I V K Q I T S I S I E P G V E V E V T 115

421 ATCGCTGACG CATAAa
      I A D A - 119

```

Figura 15. Seqüència nucleotídica i aminoàcids deduïts d'RPS20 de *S. aurata*. Els nucleòtids corresponents a la CDS es troben en majúscules, mentre que les regions 5' i 3' UTR es troben en minúscules. Els codons d'inici (ATG) i de final (TAA) estan marcats en negreta. La seqüència d'aminoàcids està marcada amb majúscules i negreta. La seqüència nucleotídica aïllada durant l'assaig de doble híbrid es troba ressaltada en gris.

```

1 taacggcaaaa taccactgaa cgccggtcca acATGCCTGC TGATTACAAT GGACGCTGGG
      M P A D Y N G R W E 10

61 AGATGGTGAG CAACGAGAAC TTCGAGGATG TCATGAAAGG CTTAGACATT GACTTCGCCA
      M V S N E N F E D V M K G L D I D F A T 30

121 CCAGGAAGAT AGCCGTCCAC CTGCATCAGA CAAAAATAAT CGTCCAGAAT GGAGACAAGT
      R K I A V H L H Q T K I I V Q N G D K F 50

181 TTGAAACGAA GACCCTAGC ACCTTCAGGA ACTACGAGGT CAACTTCACC ATAGGAGAGG
      E T K T L S T F R N Y E V N F T I G E E 70

241 AGTTTGAGGA GCAGACAAAG GCCCTGGACA ACCGGAAGGT CAAGACACTG GTTACCTGGG
      F E E Q T K A L D N R K V K T L V T W D 90

301 ACGGAGACAA GCTGGTGTGC GTCCAGAAGG GAGAGAAAGA AAACCGCGGC TGGAGACAAT
      G D K L V C V Q K G E K E N R G W R Q W 110

361 GGATCGAGGG AGACCTGCTA CACCTGGAAA TCCATGTGCT TGACAAAGTC TGCCACCAAA
      I E G D L L H L E I H V L D K V C H Q T 130

421 CATTTAAGAA GAGCCAGTAA gatgggaacc acctcggtct caacgaagct gcccgctcatg
      F K K S Q - 135

481 tgatgcatgt tgctgtctat ttataat

```

Figura 16. Seqüència nucleotídica i aminoàcids deduïts d'RBP2 de *S. aurata*. Els nucleòtids corresponents a la CDS es troben en majúscules, mentre que les regions 5' i 3' UTR es troben en minúscules. Els codons d'inici (ATG) i de final (TAA) estan marcats en negreta. La seqüència d'aminoàcids està marcada amb majúscules i negreta. La seqüència nucleotídica aïllada durant l'assaig de doble híbrid es troba ressaltada en gris.

1 actgccatc**A TGA**ACTTAAA GTCCTCTTC ATTTGCCTCT TCTTAGCAGC GCTTGT**CATA**
M N L K L L F I C L F L A A L V I 17

61 CCTGCTGAAC TGAAACCTAA ATACAAGAAA CATCGTCATC GTGACCATCA CGATCCTGAC
P A E L K P K Y K K H R H R D H H D P D 37

121 AGACCTGGAC ATCATAAACA TGGCAAGAGA GCAAAATATG AGGACATAAT TAAAGATGCT
R P G H H K H G K R A K Y E D I I K D A 57

181 TTCTATGAGA TCATAGATTC ATTGAGTGGT GATGATGATG ATGAAGACGA AGAAAGTGCA
F Y E I I D S L S G D D D D E D E E S A 77

241 GACTGGTTCT ATGATCTTCA AAACGACAAA TGCAACCCAA ATCCTTGCCT CAACAATGGT
D W F Y D L Q N D K C N P N P C L N N G 97

301 GTGTGTGAGG AAAAAGGCAA AAAAGGCAAA ATCAAATGTG ATTGTCCCAG ACCTTTCAAG
V C E E K G K K G K I K C D C P R P F K 117

361 GGAAGGAGAT GCGAAGAAAG TCCAAAACAT TGTAGGAAAG GTATATGTGG GCGTGGTGAA
G R R C E K G P K H C R K G I C G R G E 137

421 TGTGTTCTGA TTTCAACTCC TCCATTCTAT GAGTCAAGT GCAAAGAGCC CTTCCAGCCT
C V L I S T P P F Y E C K C K E P F Q P 157

481 CCCCCTGCA GAACTGTTGC ACTGTGTGAG CCTAGCCCAT GTAAGAATGG TGGAACATGT
P R C R T V A L C E P S P C K N G G T C 177

541 GTCAAGGACG GAAATGACTT TGACTGCCAG TGCCTCCGG GGTACAGAGG ACGTTTCTGC
V K D G N D F D C Q C P P G Y R G R F C 197

601 CATGTTGGCC CCGATGACTG CTATGTGGAT GATGGAGAAT CATACCGTGG CAATGTGAGT
H V G P D D C Y V D D G E S Y R G N V S 217

661 GAGACAGATG ATGGTGATGA ATGCCTCTAC TGGAACTCTC AGTTCATCCT AGAGAAAGGA
E T D D G D E C L Y W N S Q F I L E K G 237

721 GCCGATCCCT TTGATTCCCT TGAGGACAAA GATGGACTTG GCCCTCACAA CTTCTGCAGA
A D P F D S F E D K D G L G P H N F C R 257

781 AACCCAGATG GAGAGCTGAT GCCATGGTGC TTCTTCAGAA GAGGCCGAG GTTGTGTGG
N P D G E L M P W C F F R R G R R L L W 277

841 GACTACTGTG ATGTGACAGA GTGTCTGTA CCAACAGGTG TGGCGCCAAC TGGTGTGTGC
D Y C D V T E C P V P T G V A P T G V V 297

901 CCTCCAGGCC CTGATCCTAC TGCTCCAAAG CCCCAACCAA CAGAACCCTCA ACCTACAGCC
P P G P D P T A P K P Q P T E P Q P T A 317

961 CCTCAGCCTT CAACACCTCA ACCCACAACA GTCCCCAAGC **CAGCGACTAC CAAACCCCA**
P Q P S T P Q P T T V P K P A T T K P P 337

1021 **ACAGCTGAGC AGCCACCCA GGCTCCACCA CCTTCTTCTA CCACCCCTGG TGCTTCTGTC**
T A E Q P T Q A P P P S S T T P G A S V 357

1081 **ATTCCGAGTG CCACCCCTCC ACTGCAACAG TTTTCCACTT GCGGCAAGCC TCAGCCAAAA**
I P S A T P P L Q Q F S T C G K P Q P K 377

1141 **AAGGCCATAA CCCGAATCAT CAGTGGTCTA AAGGTCTCTC CCGGAGCTAT ACCTTGGCAG**
K A I T R I I S G L K V S P G A I P W Q 397

1201 **GTGTCTATTC AAGTGAGACC ACAGAAGTCA AACCTGCCGT TCAGACACAC GTGTGGAGGT**
V S I Q V R P Q K S N L P F R H T C G G 417

1261 **GTTCTCATCG AGAGCTGCTG GGTACTGACA GCTGCACACT GCATTGAACC AAACACTGAA**
V L I E S C W V L T A A H C I E P N T E 437

1321 ATGGAGGTGG TCATGGGAGG TCTGTCTCTA AATATAGACG AACCCACAGA GCAAACCCTA
M E V V M G G L S L N I D E P T E Q T L 457

```

1381 AGAGTTGAAG AGGCTATTAG GCATGAGAAC TACAGGGAGA CTCCTTCAGC AGTTTACAAC
    R V E E A I R H E N Y R E T P S A V Y N 477
1441 GACATAGGCT TGTGAGGCT GAATGGTATC AACGGAGTTT GTGCCAATGA GACCCAGTTT
    D I G L L R L N G I N G V C A N E T Q F 497
1501 GTGAAGACAG CCTGTCTGCC CGATGCTCAG CTGCCTGATG GGATGGAGTG TAAAATTTCT
    V K T A C L P D A Q L P D G M E C K I S 517
1561 GGATGGGGTG CCACTGAAGA ATTTGAATAT GGTCTAACC ATTTGCTGTC GGCCAATGTA
    G W G A T E E F E Y G S N H L L S A N V 537
1621 CTGCTGATCA ACCAGGAAAA GTGCATGGAG CCTATTGTTT ATGGCAGTGT CCTGGATAAT
    L L I N Q E K C M E P I V Y G S V L D N 557
1681 TCTATGTTCT GTGCTGGCCA CCTGCAGGGA GGGGTGGATT CCTGCCAGGG TGACTCTGGA
    S M F C A G H L Q G G V D S C Q G D S G 577
1741 GGACCACTGA CTTGTAGGCA AAATAATACC AGCGTTGTTT ATGGTATTGT GAGTTGGGGA
    G P L T C R Q N N T S V V Y G I V S W G 597
1801 GACCAATGTG GAATGAAGAA CAAGCCTGGG GTCTACACAC GGGTCACTAA CTCCTGGAC
    D Q C G M K N K P G V Y T R V T N F L D 617
1861 TGGATCAAGT CAAAGACTCA GGCAGCATCT CCATAAgcaa ccttgattac tcagcaacat
    W I K S K T Q A A S P - 628
1921 gccagtaagt ttagccaagg acgtgtttat gtacagagca ggtattactc ctcccgatta
1981 agctttgggt tttgtgcac ttgtacctgt tatttttttg cttaacaggt ctataacacc
2041 atctttat

```

Figura 17. Seqüència nucleotídica i aminoàcids deduïts d'HABP2 de *S. aurata*. Els nucleòtids corresponents a la CDS es troben en majúscules, mentre que les regions 5' i 3' UTR es troben en minúscules. Els codons d'inici (ATG) i de final (TAA) estan marcats en negreta. La seqüència d'aminoàcids està marcada amb majúscules i negreta. La seqüència nucleotídica aïllada durant l'assaig de doble híbrid es troba ressaltada en gris.

A la taula 4 es mostren les quatre proteïnes seqüenciades amb el nombre d'aminoàcids que corresponen a la proteïna, i el pes molecular deduït.

Nom	ID GenBank	cDNA aïllat	Nombre d'aminoàcids	Pes molecular
F-lectina	KM014671	1360 pb	312 aa	34601.6 Da
RPS20	KM014674	436 pb	119 aa	13346.6 Da
RBP2	KM014673	507 pb	135 aa	15900.0 Da
HABP2	KM014672	2048 pb	628 aa	69160.2 Da

Taula 4. Identificació i característiques dels cDNAs sencers corresponents a les proteïnes aïllades durant l'assaig de doble híbrid. Identificació a la base de dades de *GenBank* de les diferents proteïnes aïllades dels clons positius en l'assaig doble híbrid d'interacció entre proteïnes. La taula representa la mida en parell de bases del cDNA aïllat (comprenent les regions UTR) i el nombre d'aminoàcids de la proteïna resultant. S'afegeix una predicció del pes molecular de cada proteïna.

De les quatre proteïnes potencialment positives es va decidir continuar els estudis d'interacció amb una d'elles, l'F-lectina. Com cALT2, l'F-lectina presenta una regió poliasparagina en la seva seqüència que podria estar implicada en interaccions proteïna-proteïna.

4.2.2 Caracterització de l’F-lectina

L’F-lectina o fucolectina és una proteïna d’unió a la fucosa. Pertany a una nova família de lectines amb un plegament únic (lectines tipus F), que es troba només en peixos. Les lectines es caracteritzen per tenir diferents dominis d’unió a carbohidrats (CRD, *Carbohydrate Recognition Domain*). En el cas de les F-lectines, el carbohidrat de preferència és la fucosa (Kilpatrick, 2002; Vasta et al, 2011).

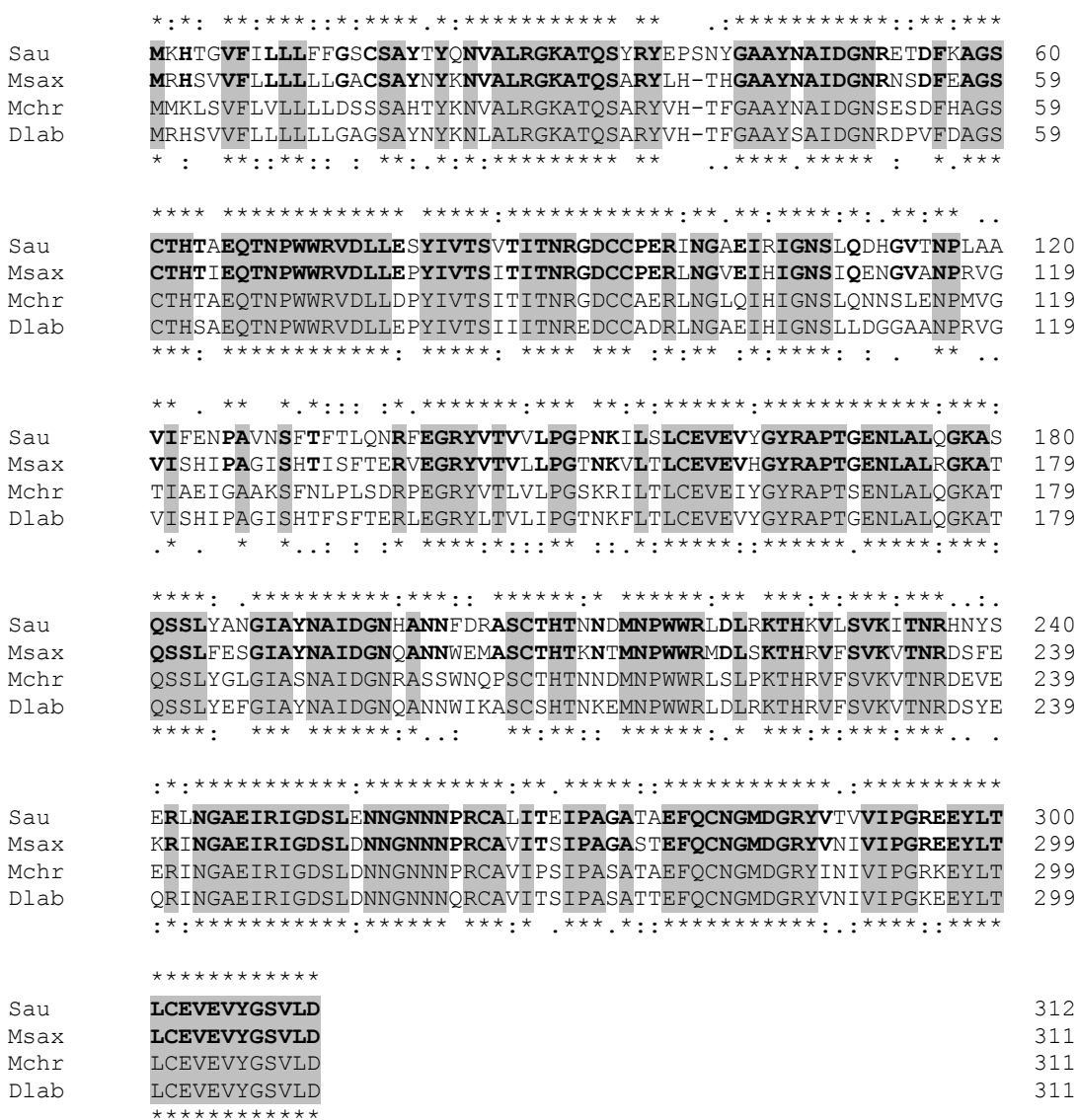


Figura 18. Alineament de la seqüència d’aminoàcids de l’F-lectina de *S. aurata* amb seqüències descrites per a altres organismes. L’homologia entre els residus d’aminoàcids de les diferents espècies es representa marcada en gris, i amb la sèrie d’asteriscs situats a sota de l’alineament. L’homologia entre l’F-lectina de *S. aurata* i *Morone saxatilis* es representa amb els residus en negreta i la sèrie d’asteriscs situats a la part superior de l’alineament. L’alineament es va fer utilitzant el programa informàtic Clustal Omega (Clustal Omega 1.2.1). Sau: *Sparus aurata*, KM014671; Msax: *Morone saxatilis*, ABB29997.1; Mchr: *Morone chrysops*, ABB29992.1; Dlab: *Dicentrarchus labrax*, ACF94293.1.

L'F-lectina d'orada presenta un elevat grau d'homologia en la seva seqüència d'aminoàcids amb l'F-lectina d'altres espècies de peixos. Tal com es mostra a la figura 18, presenta una identitat aproximada del 74 % amb el llobarro (*Dicentrarchus labrax*) i el llobarro blanc (*Morone chrysops*), i del 75 % amb el llobarro ratllat (*Morone saxatilis*).

En particular, la seva homologia en la seqüència d'aminoàcids amb la proteïna de *Morone saxatilis* és especialment útil, ja que l'estructura terciària d'aquesta F-lectina s'ha descrit a partir de la seva cristal·lització (Protein Data Base ID: 3CQO). S'ha caracteritzat i visualitzat l'estructura i els llocs d'unió a la fucosa en l'F-lectina de *M. saxatilis*, determinat els diferents CRD, que queden exposats a la part externa de la proteïna, i identificat els aminoàcids implicats en la unió a la fucosa (Bianchet, 2010). Donada l'alta homologia amb la seqüència d'aquesta proteïna, és possible fer una predicció de l'estructura de l'F-lectina d'orada (figura 19).

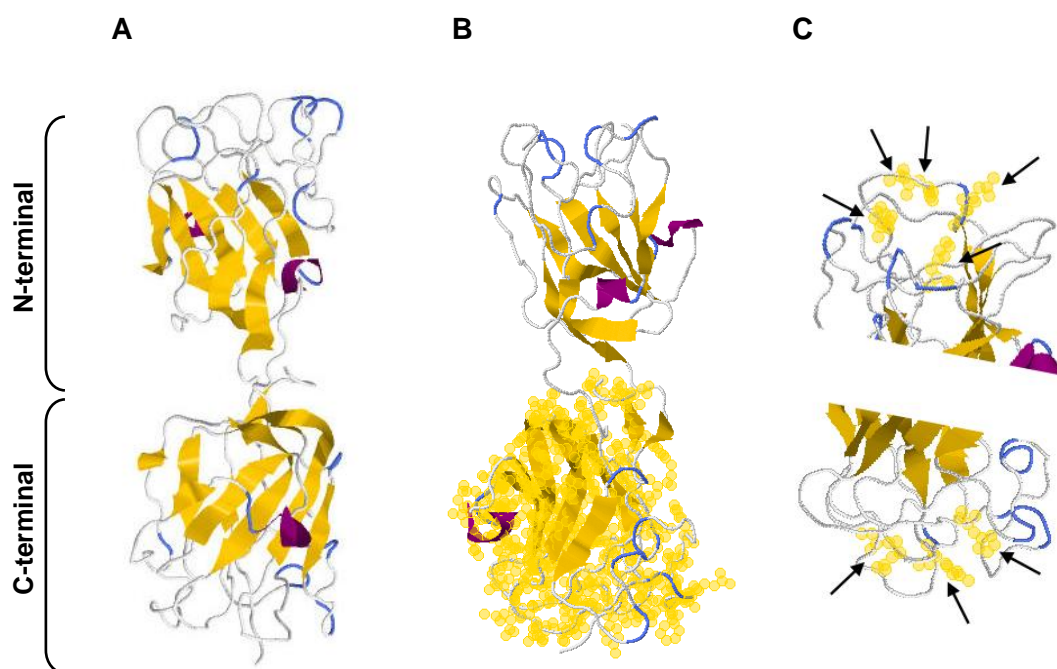


Figura 19. Estructura terciària predita per a l'F-lectina de *S. aurata*. Estructura obtinguda a partir de l'alineament de la seqüència proteica de l'F-lectina d'orada amb l'estructura cristal·litzada de l'F-lectina de llobarro ratllat (*Morone saxatilis* MsaFBP32, estructura 3CQO). Visualització en dibuix segons l'estructura secundària en Jmol (Jmol 14.2.4_2014.08.03). Els girs beta es troben representats en blau, les fulles beta en cintes de color groc, i les hèlix en cintes violeta. La resta d'estructures es representen amb color gris. A. Representació de l'estructura terciària de l'F-lectina de *S. aurata* deduïda per homologia. B. Els aminoàcids corresponents a la seqüència aïllada durant l'assaig de doble híbrid es troben ressaltats en groc. C. Ampliació de les zones d'unió a la fucosa en els dominis N i C terminal. Els aminoàcids importants en la unió a la fucosa es troben ressaltats amb groc, i marcats amb una fletxa.

L'anàlisi bioinformàtic amb el programa SignalP 4.1 indica la presència d'un pèptid senyal amb una probabilitat del 91 % de la posició 1 a la 18, amb el lloc de tall entre les posicions 18 i 19.

La presència d'aquest pèptid senyal indica que la proteïna podria ser secretada seguint la via clàssica. La seqüència restant està compresa per dos subdominis de lectina de tipus F situats en tàndem. El fragment de cDNA aïllat durant l'assaig doble híbrid en llevat corresponia al subdomini C-terminal de la proteïna. Per tant, és de suposar que la interacció amb cALT2 es fa a través d'aquest domini.

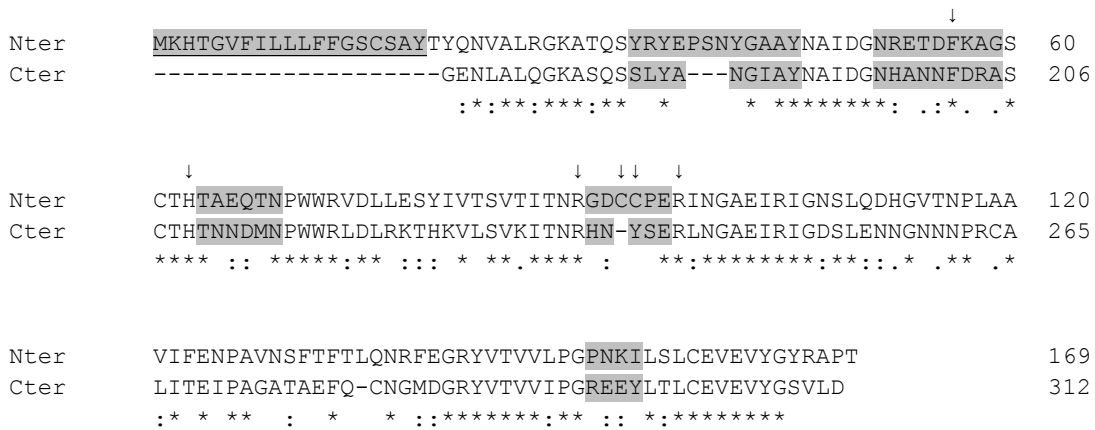


Figura 20. Alineament de la seqüència de proteïna dels dos subdominis de l’F-lectina de *S. aurata*. Alineament dels dos subdominis d’F-lectina situats en tàndem utilitzant el programa informàtic Clustal Omega (Clustal O 1.2.1). El pèptid senyal situat a l’extrem N terminal de la proteïna està marcat amb fons gris i subratllat. Els diferents dominis d’unió a carbohidrats (CRD) es troben marcats amb fons gris. Els aminoàcids amb la marca superior (↓) indiquen els residus predits clau per a la unió a fucosa.

Els dos subdominis, N-terminal i C-terminal, comparteixen una gran homologia de seqüència (figura 20), amb una identitat del 55 %. Si s’exceptuen les zones deduïdes com a CRD (ja que són regions molt variables), la identitat augmenta fins a un 65 %. A més, alguns dels residus clau per a la unió a la fucosa no es troben conservats en els domini C-terminal, la qual cosa suggereix que l’afinitat per les diferents estructures fucosilades pot diferir en els dos subdominis.

4.3 Localització subcel·lular de l'F-lectina, cALT1 i cALT2 en cèl·lules eucariotes

Per comprovar la viabilitat de la interacció entre F-lectina i cALT1 o cALT2 *in vivo*, es va analitzar la localització subcel·lular de les tres proteïnes expressades en cèl·lules SBL.

Per dur a terme aquest objectiu, s'obtingueren constructes que expressaven cALT1, cALT2 i F-lectina fusionades a fluoròfors. D'aquesta manera es visualitzà la localització subcel·lular de les proteïnes assajades utilitzant un microscopi confocal capaç d'excitar el fluoròfor i de detectar-ne l'emissió.

Els constructes de fusió de cALT1 i cALT2 a l'extrem N-terminal d'EGFP (un fluoròfor que es detecta a la longitud d'ona del verd si s'excita a 488 nm) es van realitzar prèviament al laboratori (Metón et al, 2004; Anemaet et al, 2008). Es tracta dels constructes pcALT1-EGFP i pcALT2-EGFP, respectivament.

L'F-lectina es va clonar dins d'un vector que permet l'expressió de la proteïna fusionada a DsRedmon, un fluoròfor que es pot detectar a la longitud d'ona del vermell si s'excita a 561 nm. Donat que l'F-lectina té un pèptid senyal al seu extrem N-terminal, i que aquest pèptid podria ésser important per a la bona compartimentació de la proteïna, l'F-lectina es va clonar en dos vector diferents: pDsRedmonMCS-N i pDsRedmon-C. El vector pDsRedmonMCS-N expressa l'F-lectina fusionada a l'extrem N-terminal de DsRedmon (o el que és el mateix, el fluoròfor DsRedmon es fusiona a l'extrem C-terminal de l'F-lectina, deixant el pèptid senyal lliure). El vector pDsRedmon-C expressa l'F-lectina fusionada pel seu extrem N-terminal al fluoròfor DsRedmon, deixant lliure el domini C-terminal d'interacció detectat en el sistema doble híbrid.

Per realitzar el subclonatge als vectors pDsRedmonMCS-N i pDsRedmon-C, la CDS de l'F-lectina es va amplificar per PCR utilitzant les parelles d'encebadors MG1403/MG1404 i MG1105/MG1106 respectivament, i el constructe pGEM-Flectin com a motllo. El subclonatge dels amplicons resultants generaren els constructes pFlectin-DsRedmon i pDsRedmon-Flectin.

Per comprovar la localització subcel·lular de les proteïnes cALT1, cALT2 i F-lectina, cèl·lules SBL es van sembrar sobre cobreobjectes, i a les 24 hores es van transfectar amb els plasmidis pcALT1-EGFP, pcALT2-EGFP i el control negatiu pEGFP. Després de 48 hores les cèl·lules van ésser fixades per a la seva posterior visualització al microscopi confocal. Es van prendre fotografies de les cèl·lules a les longituds d'ona d'excitació d'EGFP (488 nm).

Tal com estava prèviament descrit en les línies cel·lulars CHO i HEK293 (Metón et al, 2004; Anemaet et al, 2008), en cèl·lules SBL la distribució de cALT1 i cALT2 és difosa per tota la cèl·lula, suggerint una localització preferentment citosòlica. Tot i amb això, es pot apreciar a més un patró lleugerament vesiculat per a ambdues proteïnes (figura 21).

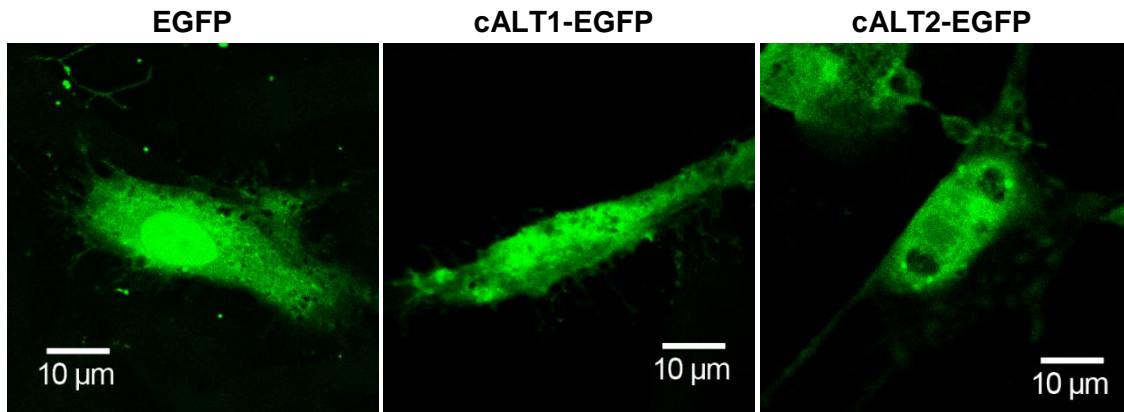


Figura 21. Localització subcel·lular de cALT1-EGFP i cALT2-EGFP en cèl·lules SBL. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 μ g del control negatiu (pEGFP) i dels constructes de fusió fluorescents pcALT1-EGFP i pcALT2-EGFP. Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i van ésser analitzades amb un microscopi confocal d'escaneig amb làser. Imatges representatives preses a la longitud d'excitació d'EGFP (488 nm, representat en verd).

D'altra banda, per tal de comprovar la localització subcel·lular de l'F-lectina d'orada, cèl·lules SBL es van sembrar sobre cobreobjectes, i a les 24 hores es van transfectar amb el plasmidi de fusió pFlectin-DsRedmon i el control negatiu pDsRedmonMCS-N. Després de 48 hores les cèl·lules es van recollir i els cobreobjectes es van muntar per a la visualització al microscopi confocal. Es van prendre fotografies de les cèl·lules a les longituds d'ona d'excitació de DsRedmon (561 nm).

La figura 22 mostra un patró de localització subcel·lular per a l'F-lectina en forma vesiculada. El patró de distribució de les vesícules és citosòlic amb tendència perinuclear. Aquesta localització és consistent amb els estudis *in silico* (punt 4.2.2), i suggereix la presència d'un pèptid senyal en l'F-lectina, de manera que la proteïna podria seguir la via clàssica de síntesi a l'aparell de Golgi i secreció a través de vesícules.

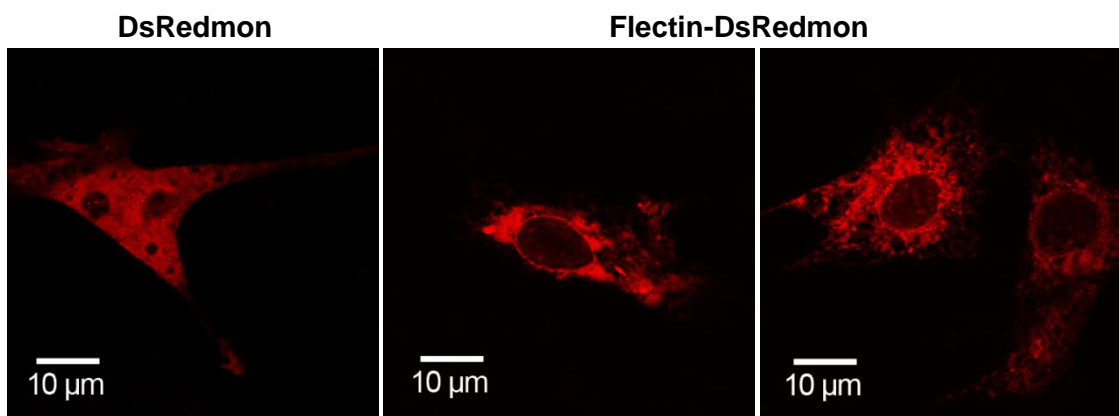


Figura 22. Localització subcel·lular de Flectin-DsRedmon en cèl·lules SBL. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg del control negatiu pDsRedmonMCS-N i el constructe de fusió fluorescent pFlectin-DsRedmon. Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i van ésser analitzades amb un microscopi confocal d'escaneig amb làser. Imatges representatives preses a la longitud d'excitació de DsRedmon (561 nm, representat en vermell).

4.3.1 Localització en aparell de Golgi de l'F-lectina, cALT1 i cALT2

Per comprovar si l'F-lectina segueix la via de secreció clàssica, on la proteïna es marca a l'aparell de Golgi per a la seva secreció, es va realitzar una immunodetecció amb un anticòs que detecta la proteïna GM130 (GM130, BD Transduction Laboratories). La proteïna GM130 forma part de la matriu de *cis*-Golgi (Puthenveedu et al, 2006; Marra et al., 2007; Valentijn et al, 2007; Holst et al, 2013; Shitara et al, 2013). La detecció d'aquest anticòs en el microscopi es va fer a través d'un anticòs secundari, Alexa Fluor 647 (Life Technologies), que és capaç d'emetre fluorescència si s'excita a una longitud d'ona de vermell llunyà (633 nm).

Cèl·lules SBL es van transfectar amb els constructes pFlectin-DsRedmon, pcALT1-EGFP o pcALT2-EGFP, i després de 48 hores es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs que s'uneix a la proteïna GM130, i una hora més amb l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. Les cèl·lules es van visualitzar en un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 561 nm (Flectin-DsRedmon, en vermell), 488 nm (cALT1-EGFP i cALT2-EGFP, en verd) i 633 nm (GM130, en blau).

Les figures 23, 24 i 25 mostren les imatges representatives de cèl·lules transfectades amb els plasmidis d'expressió de Flectin-DsRedmon, cALT1-EGFP i cALT2-EGFP, respectivament, incubades en presència de l'anticòs que detecta GM130, juntament amb una imatge de solapament (*merge*) per detectar la possible colocalització de GM130 i les proteïnes assajades. Per visualitzar la colocalització amb més detall s'adjunta una imatge ampliada de la zona marcada amb un requadre blanc a la imatge de solapament (figura 23B, figura 24B i figura 25B).

En les imatges ampliades se senyala part de l'aparell de Golgi amb fletxes blanques, i es marquen les regions d'interès (ROI) sobre les que es mesuren els histogrames representatius de les intensitats d'emissió de fluorescència en escala de grisos per a cada fluoròfor en la distància fixada a la ROI (figura 23C i D, figura 24C i figura 25C).

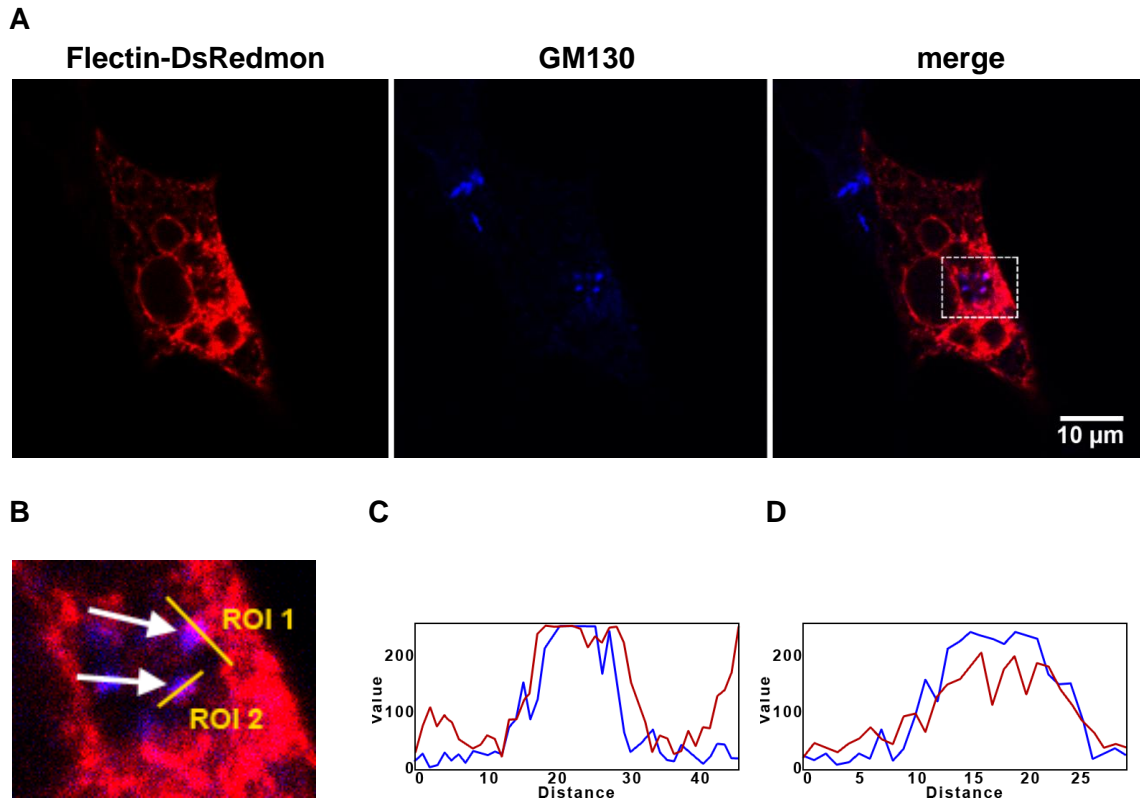


Figura 23. Localització en aparell de Golgi de Flectin-DsRedmon. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg del plasmidi pFlectin-DsRedmon. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs GM130, que posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 561 nm (Flectin-DsRedmon) i 633 nm (GM130). S'adjunta la imatge de solapament (*merge*). B. Ampliació de la zona marcada amb un requadre blanc. Amb línies grogues es marquen les ROI 1 i ROI 2. Les fletxes blanques indiquen aparell de Golgi. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 1. D. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 2. Els histogrames indiquen la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

En cèl·lules SBL es pot observar una colocalització parcial d'F-lectina i la proteïna marcador d'aparell de Golgi GM130, identificable per la coloració violeta en la imatge de solapament ampliada resultant de la superposició dels fluoròfors vermell (Flectin-DsRedmon) i blau (GM130). De la mateixa manera, els histogrames de les dues ROI mesurades indiquen una coincidència en les intensitats dels dos fluoròfors en el mateix espai.

Aquests resultats suggereixen que F-lectina es troba parcialment localitzada en l'aparell de Golgi.

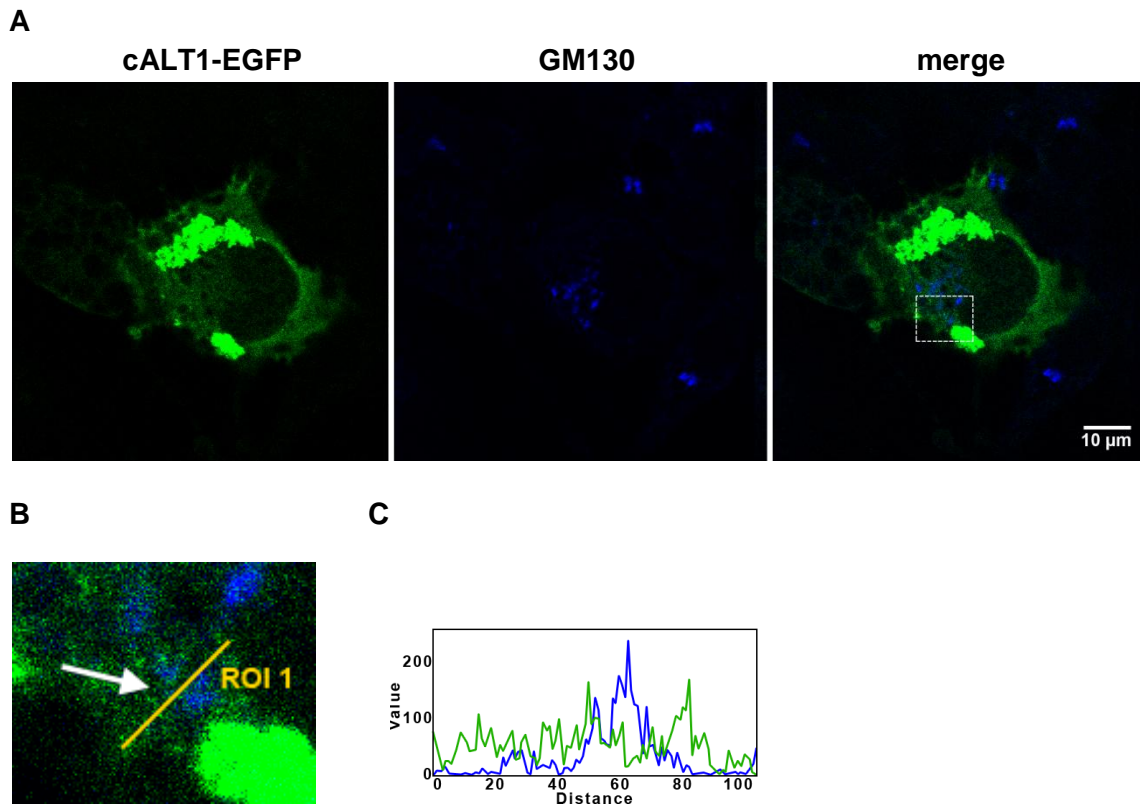


Figura 24. Localització en aparell de Golgi de cALT1-EGFP. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 μg del plasmidi pcALT1-EGFP. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs GM130, que posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 488 nm (cALT1-EGFP) i 633 nm (GM130). S'adjunta la imatge de solapament (*merge*). B. Ampliació de la zona marcada amb un requadre blanc. Amb línia groga es marca laROI 1. La fletxa blanca indica aparell de Golgi. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 1. Els histogrames indiquen la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

D'altra banda, en cèl·lules SBL transfectades només amb plasmidis d'expressió de cALT1 o cALT2, es pot observar que les isoformes de cALT no colocalitzen amb la proteïna GM130, o ho fan molt vagament en el cas de cALT2. En les imatges sense ampliar (figura 24A i figura 25A) es pot observar que les proteïnes cALT1 i cALT2 (marcades en verd) i GM130 (marcat en blau) no es troben en el mateix compartiment dins la cèl·lula. La superposició dels fluoròfors verd (cALT1-EGFP i cALT2-EGFP) i blau (GM130) s'hauria d'identificar amb coloració blanca a les imatges de solapament ampliades. En les imatges ampliades, no s'observa superposició de fluoròfors en les cèl·lules transfectades amb cALT1-EGFP i cALT2-EGFP (no hi ha estructures de

color blanc a les imatges de solapament, i els histogrames d'intensitat dels fluoròfors no se superposen en la ROI definida).

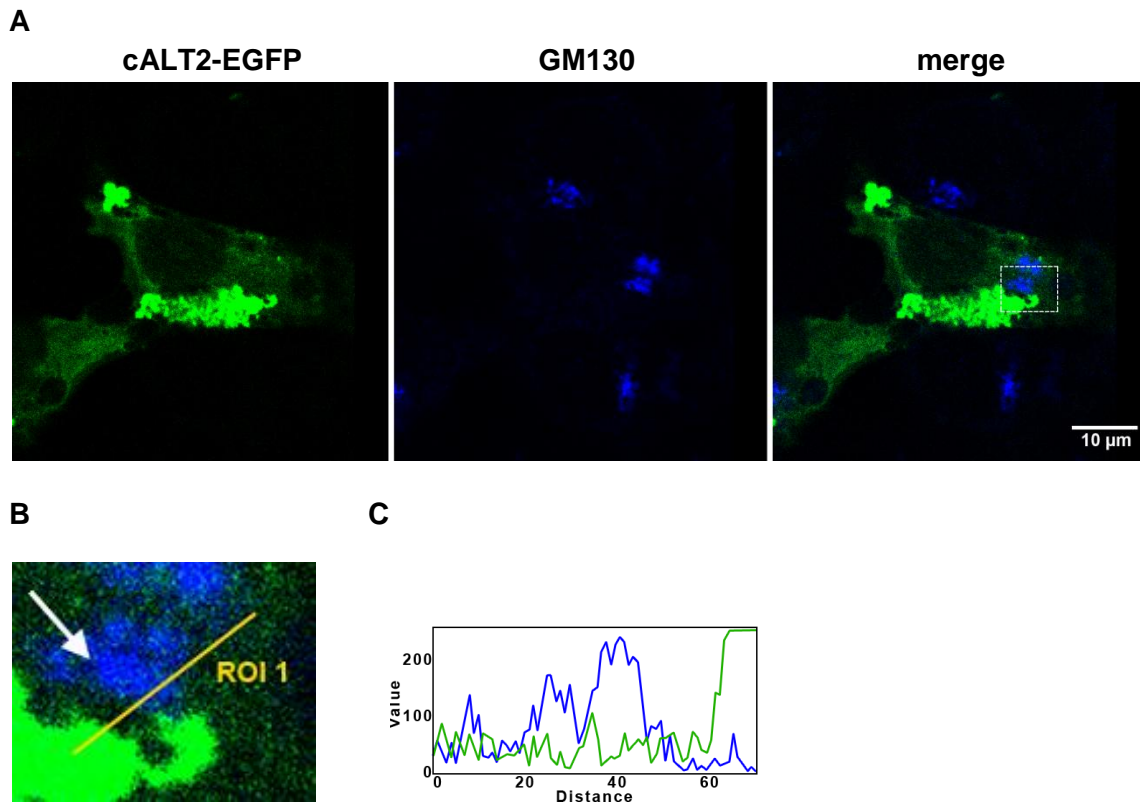


Figura 25. Localització en aparell de Golgi de cALT2-EGFP. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg del plasmidi pcALT2-EGFP. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs GM130, que posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 488 nm (cALT2-EGFP) i 633 nm (GM130). S'adjunta la imatge de solapament (*merge*). B. Ampliació de la zona marcada amb un requadre blanc. Amb línia groga es marca la ROI 1. La fletxa blanca indica aparell de Golgi. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 1. Els histogrames indiquen la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

Aquests resultats suggereixen que en cèl·lules SBL sobreexpressant cALT1 i cALT2, aquestes proteïnes no es localitzen de manera significativa en l'aparell de Golgi, o que la seva localització en aquest compartiment és molt residual.

4.3.2 Localització en vesícules de secreció de l'F-lectina, cALT1 i cALT2

Per comprovar que l'F-lectina es troba en vesícules de secreció es va realitzar una immunodetecció amb un anticòs que detecta la proteïna syntaxina-6 (STX-6, Abcam). La proteïna STX-6 es troba en el TGN i forma part de vesícules de secreció immadures (Bock et al, 1997; Klumperman et al, 1998; Holst et al, 2013; Shitara et al, 2013). La detecció d'aquest anticòs en el microscopi es fa a través d'un anticòs secundari, Alexa Fluor 647 (Life Technologies), que és capaç d'emetre fluorescència si s'excita a una longitud d'ona de vermell llunyà (633 nm).

En aquest cas es van utilitzar cèl·lules 293A, d'origen humà, donat que l'anticòs utilitzat, que detecta la proteïna de ratolí, no és capaç de detectar la STX-6 de llobarro que expressen les cèl·lules SBL.

Cèl·lules 293A es van transfectar amb els constructes Flectin-DsRedmon, cALT1-EGFP o cALT2-EGFP, i després de 48 hores es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs contra la STX-6, i una hora més amb l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. Les cèl·lules es van visualitzar en un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 561 nm (Flectin-DsRedmon, en vermell), 488 nm (cALT1-EGFP i cALT2-EGFP, en verd) i 633 nm (STX-6, en blau).

Les figures 26, 27 i 28 mostren les imatges representatives d'una cèl·lula transfectada amb els plasmidis d'expressió de Flectin-DsRedmon, cALT1-EGFP i cALT2-EGFP respectivament, i el seu marcatge amb l'anticòs que detecta STX-6, juntament amb una imatge de solapament (*merge*).

Per visualitzar la possible colocalització de STX-6 i les proteïnes assajades amb més detall, s'adjunta una imatge ampliada de la zona marcada amb un requadre blanc a la imatge de solapament (figura 26B, figura 27B i figura 28B). En les imatges ampliades se senyalen vesícules de secreció amb fletxes blanques, i es marquen les regions d'interès (ROI) sobre les que es mesuren els histogrames (figura 26C i D, figura 27C i D, i figura 28C i D). Els histogrames representen les intensitats de fluorescència en escala de grisos de cada fluoròfor a la ROI.

En cèl·lules 293A s'observa la colocalització dels marcatges de la proteïna de fusió Flectin-DsRedmon (en vermell), i l'anticòs contra STX-6 (en blau), visualitzada en forma de vesícules violeta. De la mateixa manera, les dues imatges d'histograma mostren els increments d'intensitat per a ambdós fluoròfors en les mateixes zones, indicant la presència dels fluoròfors al mateix lloc.

Els resultats mostren que l'F-lectina colocalitza parcialment amb vesícules de secreció, tal com suggeriria l'estudi bioinformàtic.

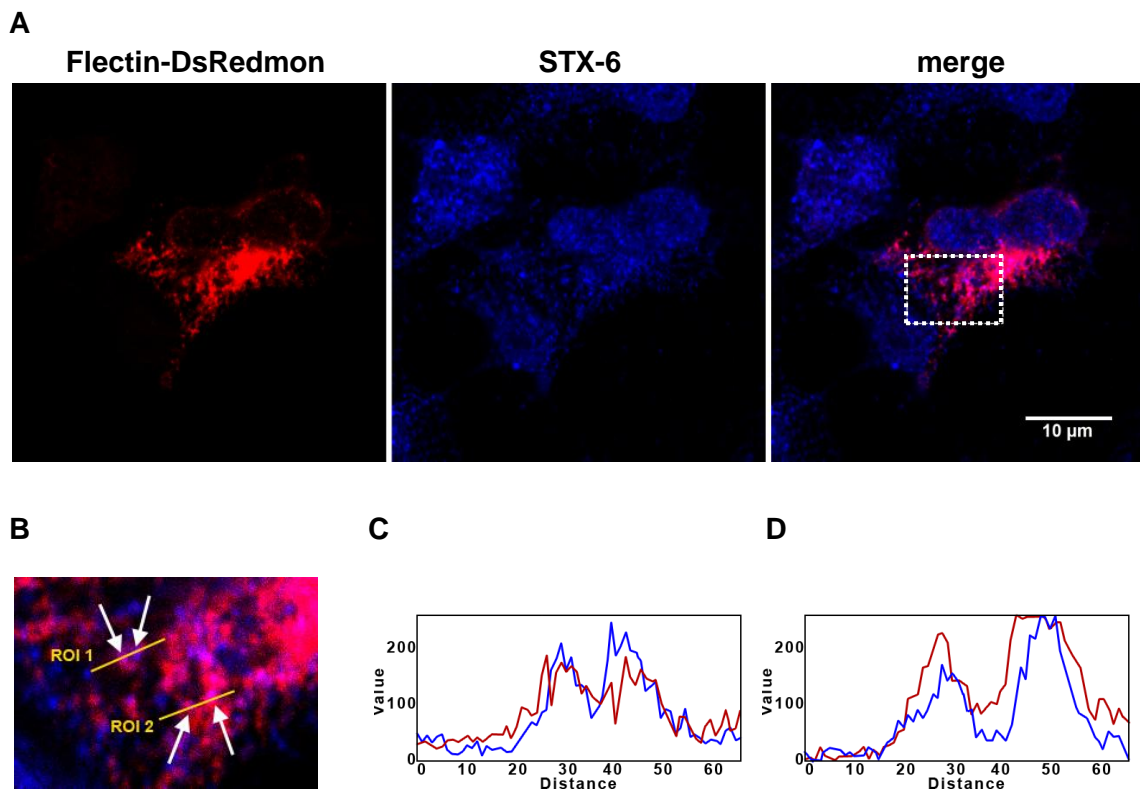


Figura 26. Localització en vesícules de secreció de Flectin-DsRedmon. Cèl·lules 293A es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg del plasmidi pFlectin-DsRedmon. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs STX-6, que posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 561 nm (Flectin-DsRedmon) i 633 nm (STX-6). S'adjunta la imatge de solapament (*merge*). B. Ampliació de la zona marcada amb un requadre blanc. Amb línies grogues es marquen les ROI 1 i ROI 2. Les fletxes blanques indiquen vesícules. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 1. D. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 2. Els histogrames indiquen la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

La colocalització dels marcatges de les proteïnes de fusió cALT1-EGFP i cALT2-EGFP (en verd) i l'anticòs contra STX-6 (en blau) es visualitza en forma de vesícules blanquinoses. Encara que es poden arribar a visualitzar algunes vesícules amb colocalització, majoritàriament no és el cas. A més, els histogrames indiquen que en les regions on hi ha colocalització és, aquesta és només parcial.

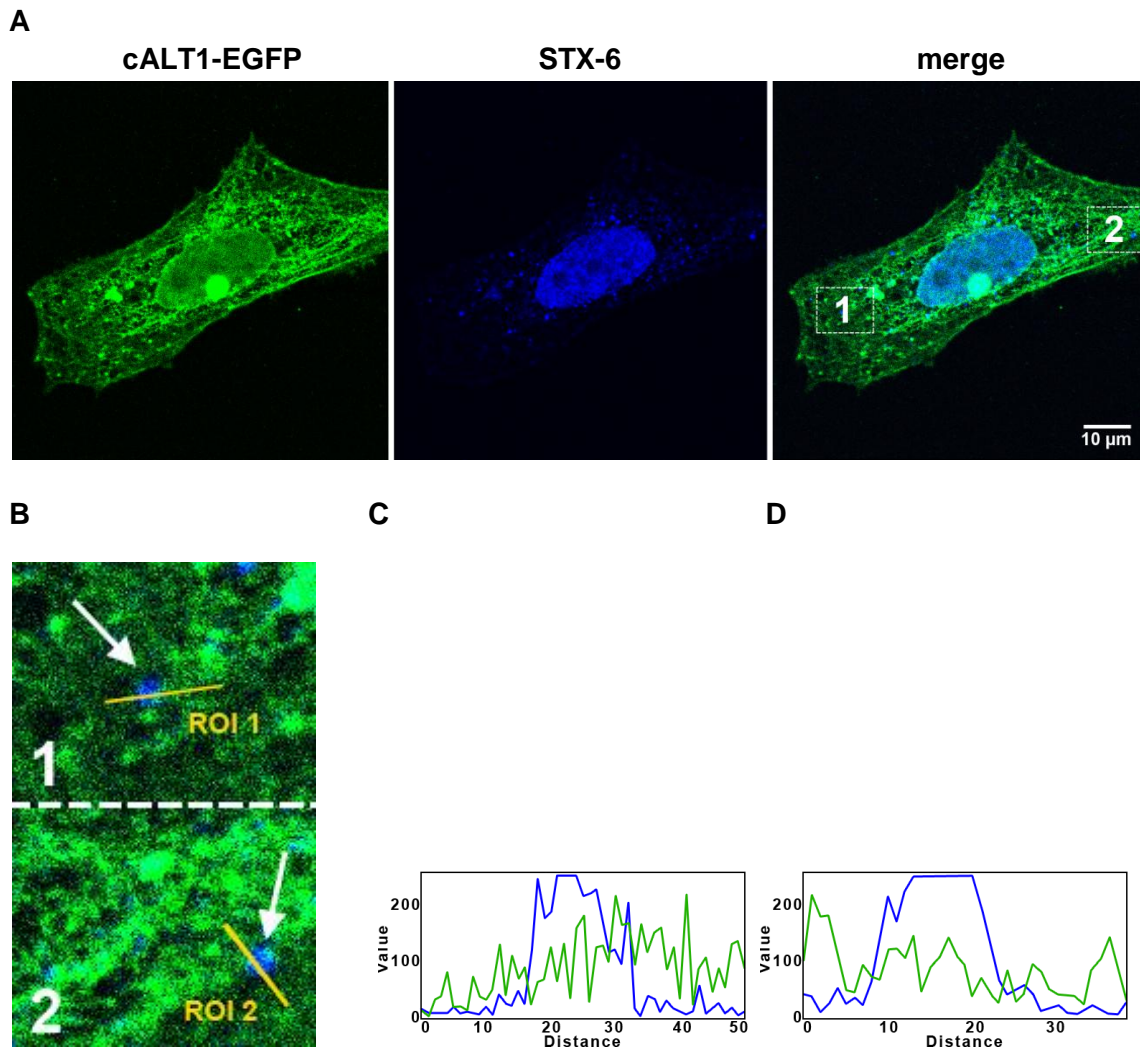


Figura 27. Localització en vesícules de secreció de cALT1-EGFP. Cèl·lules 293A es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg del plasmidi pcALT2-EGFP. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs STX-6, que posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 488 nm (cALT1-EGFP) i 633 nm (STX-6). S'adjunta la imatge de solapament (*merge*). B. Ampliació de les zones marcades amb un requadre blanc. Amb línies grogues es marquen les ROI 1 i ROI 2. Les fletxes blanques indiquen vesícules. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 1. D. Histograma d'intensitat d'escala grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 2. Els histogrames indiquen la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

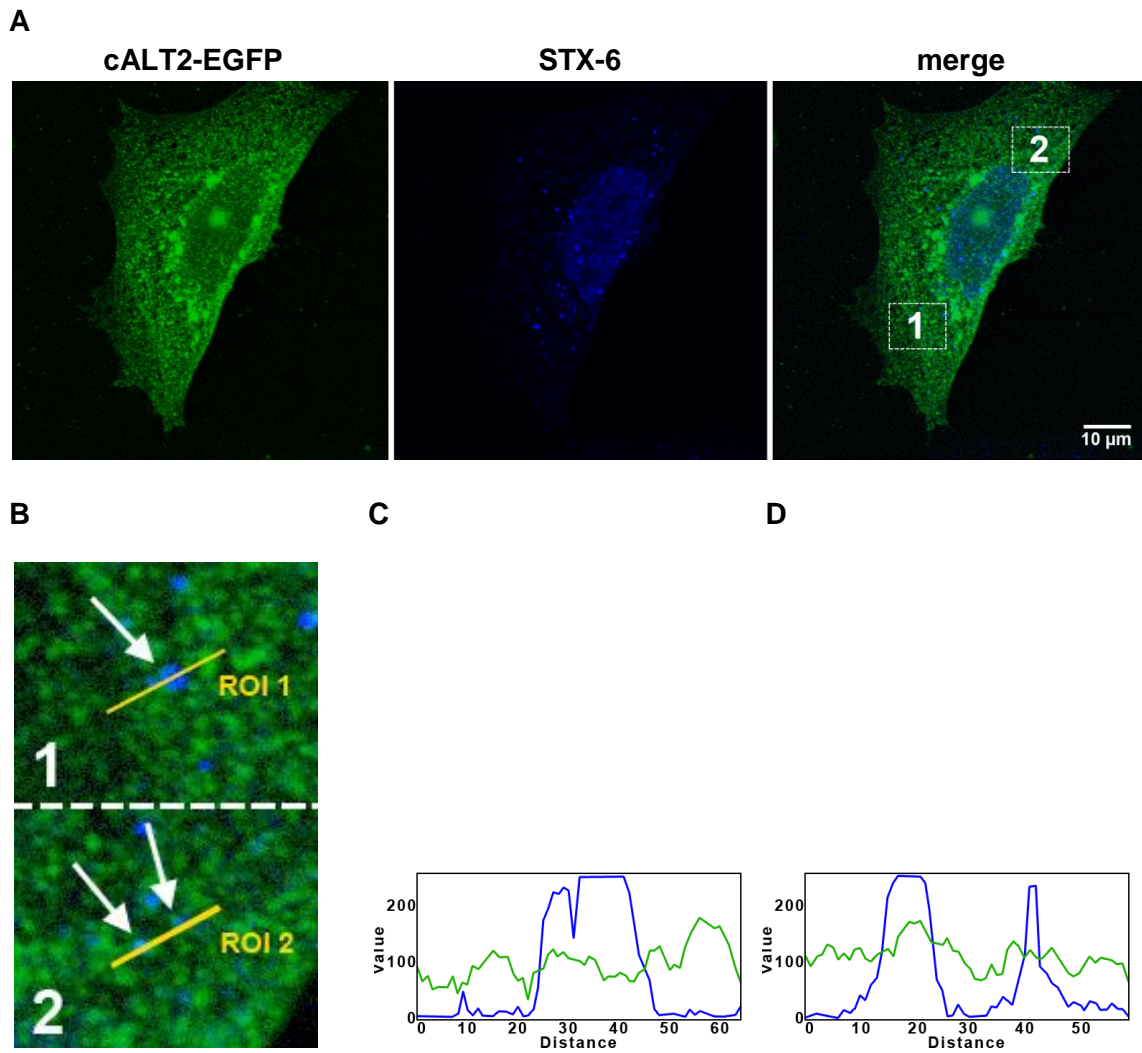


Figura 28. Localització en vesícules de secreció de cALT2-EGFP. Cèl·lules 293A es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg del plasmidi pcALT2-EGFP. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs STX-6, que posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 488 nm (cALT2-EGFP) i 633 nm (STX-6). S'adjunta la imatge de solapament (*merge*). B. Ampliació de les zones marcades amb un requadre blanc. Amb línies grogues es marquen les ROI 1 i ROI 2. Les fletxes blanques indiquen vesícules. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 1. D. Histograma d'intensitat d'escala grisos dels dos canals, a la zona de la ROI 2. Els histogrames indiquen la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

4.3.3 Efecte de la coexpressió d'F-lectina i cALT1 o cALT2 sobre la localització subcel·lular de cALT1 i cALT2 en cèl·lules SBL

Per determinar si la coexpressió d'F-lectina amb cALT1 o cALT2 presenta algun efecte sobre la localització subcel·lular de cALT1 i cALT2, cèl·lules SBL van ésser transfectades amb les parelles de plasmidis pcALT1-EGFP/pFlectin-DsRedmon i pcALT2-EGFP/pFlectin-DsRedmon, que sobreexpressen les proteïnes cALT1 i cALT2 fusionades al fluoròfor EGFP, i F-lectina fusionada al fluoròfor DsRedmon. Aquests constructes de fusió es van visualitzar en un microscopi confocal d'escaneig làser excitant-los amb una longitud d'ona de 488 i 561 nm, respectivament. Per comprovar la localització d'F-lectina sense presència d'ALT citosòlica d'orada, també es va incloure el control negatiu pEGFP/pFlectin-DsRedmon.

La figura 29 mostra imatges representatives de cèl·lules SBL transfectades amb les tres parelles de plasmidis. En les cèl·lules on es coexpressa F-lectina, s'observa una reorganització de la localització de les proteïnes de fusió cALT1-EGFP i cALT2-EGFP. Ambdues proteïnes presenten una colocalització parcial amb la proteïna de fusió Flectin-DsRedmon, en forma de vesícules perinuclears, que s'aprecia a les imatges obtingudes per solapament (*merge*) (figura 29B i C). D'altra banda, l'F-lectina deixa de formar vesícules disperses per tot el citoplasma (figura 29A) i passa a agrupar-se al voltant del nucli quan es coexpressa amb cALT1 o cALT2 (figura 29B i C).

Aquests resultats indiquen que la coexpressió d'F-lectina amb cALT1 o cALT2 promou la formació de vesícules de gran mida, de distribució fonamentalment perinuclear, i on colocalitzen parcialment F-lectina amb cALT1 i cALT2.

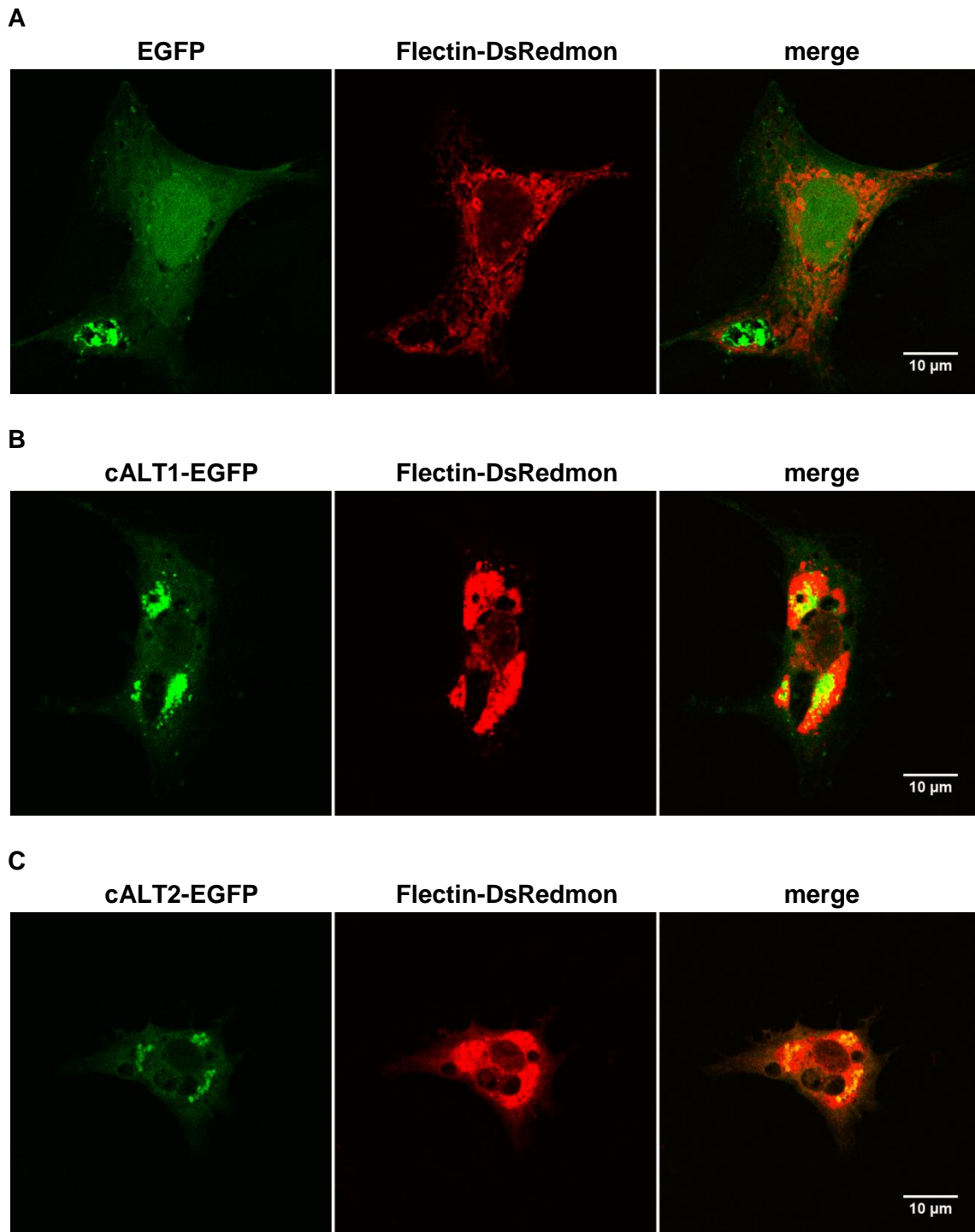


Figura 29. Colocalització de cALT1/F-lectin i cALT2/F-lectin en cèl·lules SBL. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg de les parelles de constructes de fusió fluorescents pcALT1-EGFP/pFlectin-DsRedmon (B), cALT2-EGFP/pFlectin-DsRedmon (C), i pEGFP/pFlectin-DsRedmon (A), utilitzat com a control per a la localització d'F-lectina. Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i van ésser analitzades amb un microscopi confocal d'escaneig amb làser. Imatges representatives preses a les longituds d'excitació d'EGFP (488 nm, representat en verd) i de DsRedmon (561 nm, representat en vermell). La colocalització de la fluorescència d'EGFP i DsRedmon s'aprecia amb coloració groga a la imatge de solapament (*merge*).

4.4 Confirmació per la tècnica de FRET de la interacció entre F-lectina i les isoformes cALT1 i cALT2

Quan s'identifiquen interaccions proteïna-proteïna utilitzant un mètode d'estudi, és important validar la interacció detectada amb un mètode alternatiu. Durant l'assaig doble híbrid realitzat, es van aïllar els cDNAs que codificaven per a quatre fragments de proteïnes amb potencial d'interaccionar amb cALT2. El mètode alternatiu escollit en aquest treball va ésser el càlcul de l'eficiència de FRET mitjançant el mètode del fotoblanqueig. Aquest mètode es va escollir per validar la interacció entre les quatre proteïnes aïllades i cALT2, i comprovar si la interacció es dona també amb l'altra isoforma citosòlica de l'ALT d'orada, cALT1.

Per comprovar la interacció entre dues proteïnes mitjançant el càlcul de l'eficiència de FRET pel mètode del fotoblanqueig es requereix disposar de les dues proteïnes que s'han d'assajar fusionades a fluoròfors diferents, que actuaran un com a donant i l'altre com a acceptor. Els fluoròfors utilitzats han de tenir espectres d'emissió del donant i d'excitació de l'acceptor solapants, per tal que el fluoròfor donant sigui capaç de transmetre la seva energia d'emissió al fluoròfor acceptor, que s'excitarà al rebre-la.

Els constructes que expressen cALT1 i cALT2 fusionats al fluoròfor donant (EGFP) van ésser pcALT1-EGFP i pcALT2-EGFP. Els constructes que expressen la proteïna F-lectina fusionada al fluoròfor acceptor (DsRedmon) van ésser pFlectin-DsRedmon i pDsRedmon-Flectin. El clonatge dels diferents constructes és el descrit al punt 4.3.

El constructe de fusió pFlectin-DsRedmon deixa el pèptid senyal d'F-lectina lliure, assegurant la localització nativa de la proteïna, però el fluoròfor DsRedmon es troba fusionat al domini C-terminal d'F-lectina, responsable de la interacció amb cALT2 detectada en l'estudi doble híbrid. D'altra banda, el constructe pDsRedmon-Flectin deixa lliure l'extrem C-terminal de l'F-lectina, però el fluoròfor DsRedmon n'apantalla el pèptid senyal. L'assaig d'eficiència de FRET es realitzà utilitzant els dos constructes.

Cèl·lules SBL es van créixer en cobreobjectes de vidre utilitzant plaques de 6 pous, a una densitat de 5×10^5 cèl·lules/pou. Després de 24 hores es van transfectar amb les combinacions de plasmidis descrites a continuació. Per a l'experiment on F-lectina queda amb el pèptid senyal lliure es van utilitzar com a controls negatius: pEGFP i pDsRedmonMCS-N, pEGFP i pFlectin-DsRedmon, pcALT1-EGFP i pDsRedmonMCS-N, pcALT2-EGFP i pDsRedmonMCS-N. A més, es va assajar la interacció de: pcALT1-EGFP i pFlectin-DsRedmon, pcALT2-EGFP i pFlectin-

DsRedmon. Per a l'experiment on F-lectina queda amb l'extrem C-terminal lliure els controls negatius van ser: pEGFP i pDsRedmon-C, pEGFP i pDsRedmon-Flectin, pcALT1-EGFP i pDsRedmon-C, pcALT2-EGFP i pDsRedmon-C. Les interaccions assajades foren: pcALT1-EGFP i pDsRedmon-Flectin, pcALT2-EGFP i pDsRedmon-Flectin. Quaranta-vuit hores després de la transfecció, les cèl·lules es van fixar per a la seva visualització al microscopi confocal.

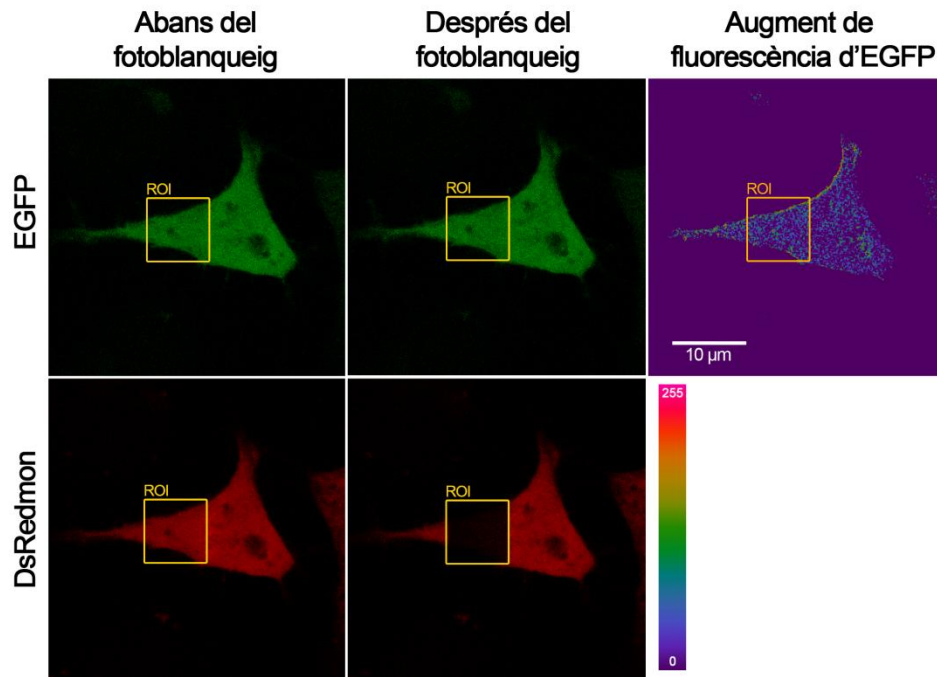
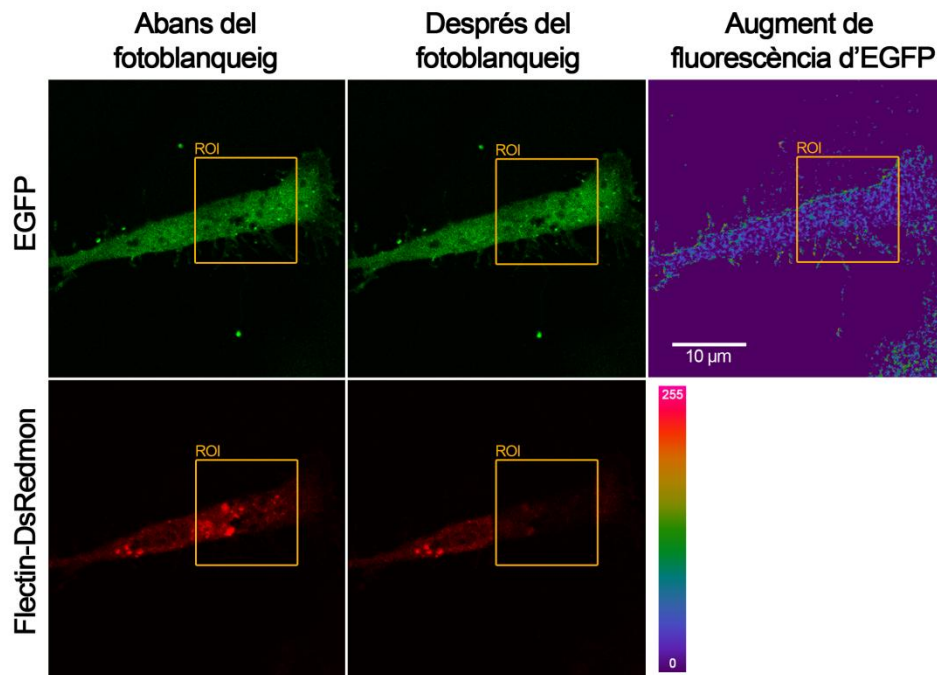
Per realitzar l'assaig d'eficiència de FRET, el fluoròfor donant (EGFP) i l'acceptor (DsRedmon) es van excitar a baixa energia utilitzant els làsers a 488 i 561 nm respectivament, per registrar l'emissió dels fluoròfors. Seguidament, les cèl·lules van ésser fotoblanquejades en una àrea determinada (ROI) a 561 nm, a una intensitat de làser del 100 %, per desnaturalitzar les molècules de fluoròfor acceptor, i es van excitar de nou a baixa energia per registrar l'emissió posterior al fotoblanqueig. La intensitat de senyal d'EGFP abans i després del fotoblanqueig es va utilitzar per mesurar l'eficiència de FRET.

Les figures 30 i 31, corresponents a l'assaig utilitzant F-lectina amb el pèptid senyal lliure, i les figures 32 i 33, corresponents a l'assaig utilitzant F-lectina amb l'extrem C-terminal lliure, són imatges adquirides al microscopi confocal representatives de les diferents condicions de cotransfecció en l'assaig. Les imatges representen l'adquisició de la intensitat de fluorescència dels fluoròfors EGFP i DsRedmon en una cèl·lula, abans i després del fotoblanqueig. L'àrea fotoblanquejada en una regió de la cèl·lula (ROI) està representada a la figura mitjançant un requadre groc. A més, per a cada condició s'adjunta una imatge que representa l'increment de la intensitat de fluorescència d'EGFP en escala de grisos convertida a pseudocolor (imatge a la dreta, a dalt de la figura), i l'escala de colors utilitzada, que va de 0 a 255 (imatge a la dreta, a sota de la figura).

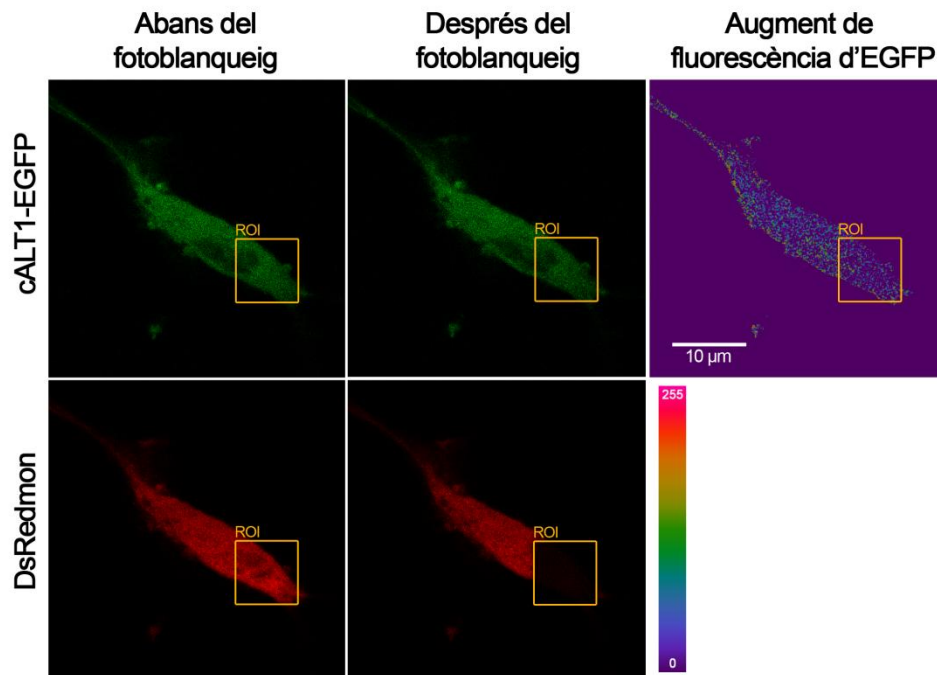
En el cas de l'assaig utilitzant F-lectina amb el pèptid senyal lliure, en les quatre condicions que representen els controls (figura 30), la intensitat del donant després del fotoblanqueig no augmenta. En el cas de les parelles de controls EGFP/DsRedmon, EGFP/Flectin-DsRedmon, cALT1-EGFP/DsRedmon i cALT2-EGFP/DsRedmon, les eficiències de FRET són del 1, 2, 2 i 2 % respectivament. En les parelles experimentals (figura 31) es poden observar valors d'intensitat de fluorescència d'EGFP majors després del fotoblanqueig. Les parelles cALT1-EGFP/Flectin-DsRedmon i cALT2-EGFP/Flectin-DsRedmon presenten valors d'eficiència de FRET del 12 i 8 % respectivament.

Respecte l'assaig on utilitzem F-lectina amb l'extrem C-terminal lliure, els resultats són similars als anteriors. En les parelles de controls (figura 32) EGFP/DsRedmon, EGFP/DsRedmon-Flectin,

cALT1-EGFP/DsRedmon i cALT2-EGFP/DsRedmon, les eficiències de FRET són del 0, 2, 4 i 4 % respectivament. En les parelles experimentals (figura 33) cALT1-EGFP/DsRedmon-Flectin i cALT2-EGFP/DsRedmon-Flectin presenten valors d'eficiència de FRET del 18 i 14 %.

A**B**

C



D

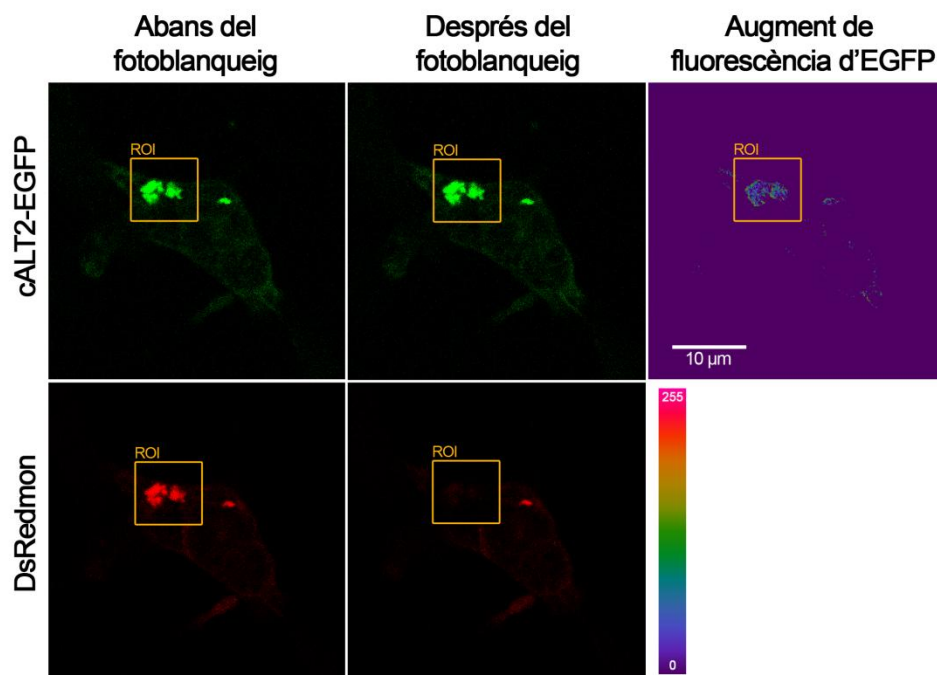


Figura 30. Anàlisi per FRET mitjançant fotoblanqueig de les parelles de proteïnes assajades com a controls negatius utilitzant el constructe Flectin-DsRedmon. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg de les parelles de plasmidis corresponents als controls de l'experiment: EGFP/DsRedmon (A), EGFP/ Flectin-DsRedmon (B), cALT1-EGFP/DsRedmon (C) i cALT2-EGFP/DsRedmon (D). Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i visualitzar a un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 488 nm (donant EGFP, en verd) i 561 nm (acceptor DsRedmon, en vermell). L'àrea marcada com a ROI es va fotoblanquejar a la longitud d'ona de 561 nm, i després es van tornar a prendre imatges a les longituds d'ona de 488 i 561 nm. L'increment de la intensitat de fluorescència d'EGFP convertida a pseudocolor (imatge de la dreta, dalt) indica en una escala de color les variacions en l'escala de grisos, que va de 0 a 255 (imatge de la dreta, sota).

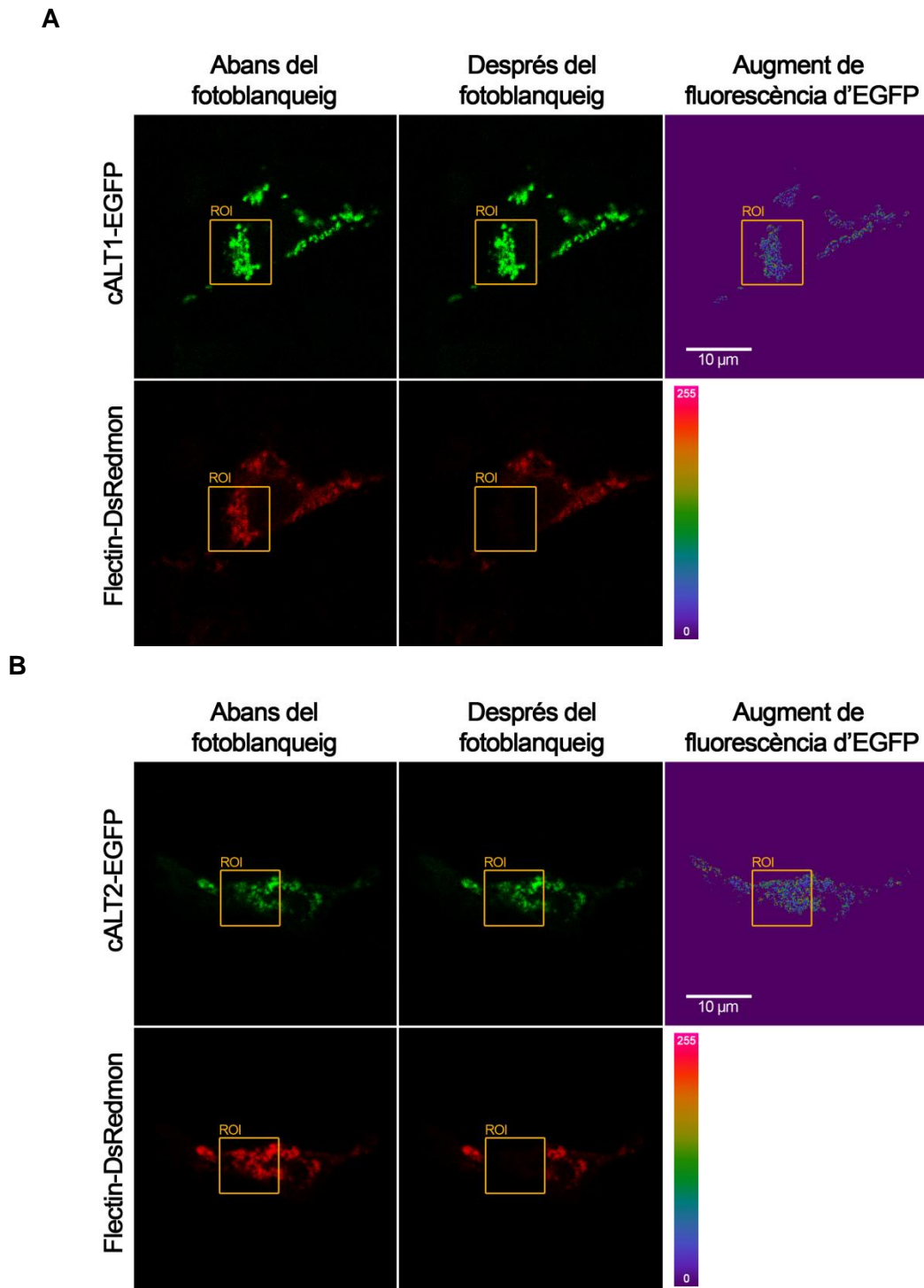
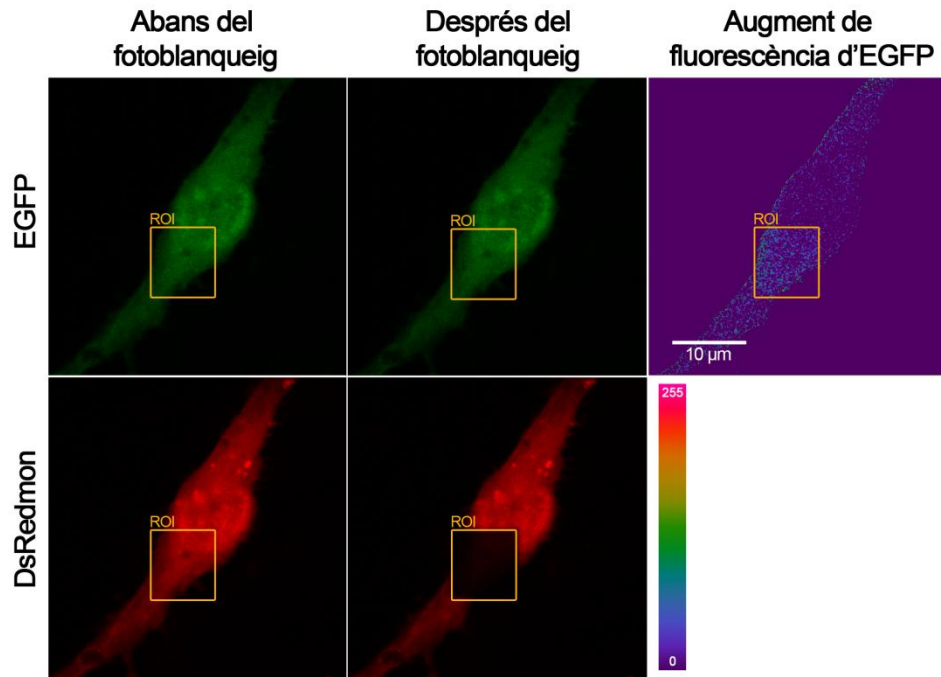
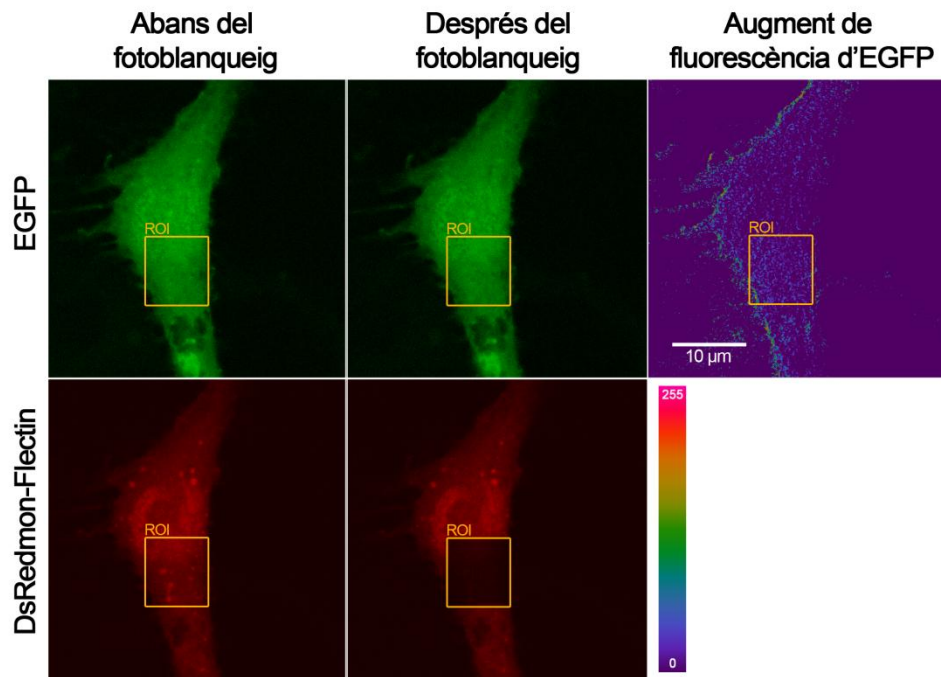


Figura 31. Anàlisi per FRET mitjançant fotoblanqueig de la interacció entre cALT1-EGFP i cALT2-EGFP amb Flectin-DsRedmon. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg dels plasmidis d'expressió de cALT1-EGFP i Flectin-DsRedmon (A) i cALT2-EGFP i Flectin-DsRedmon (B). Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i visualitzar a un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 488 nm (donant EGFP, en verd) i 561 nm (acceptor DsRedmon, en vermell). L'àrea marcada com a ROI es va fotoblanquejar a la longitud d'ona de 561 nm, i després es van tornar a prendre imatges a les longituds d'ona de 488 i 561 nm. L'increment de la intensitat de fluorescència d'EGFP convertida a pseudocolor (imatge de la dreta, dalt) indica en una escala de color les variacions en l'escala de grisos, que va de 0 a 255 (imatge de la dreta, sota).

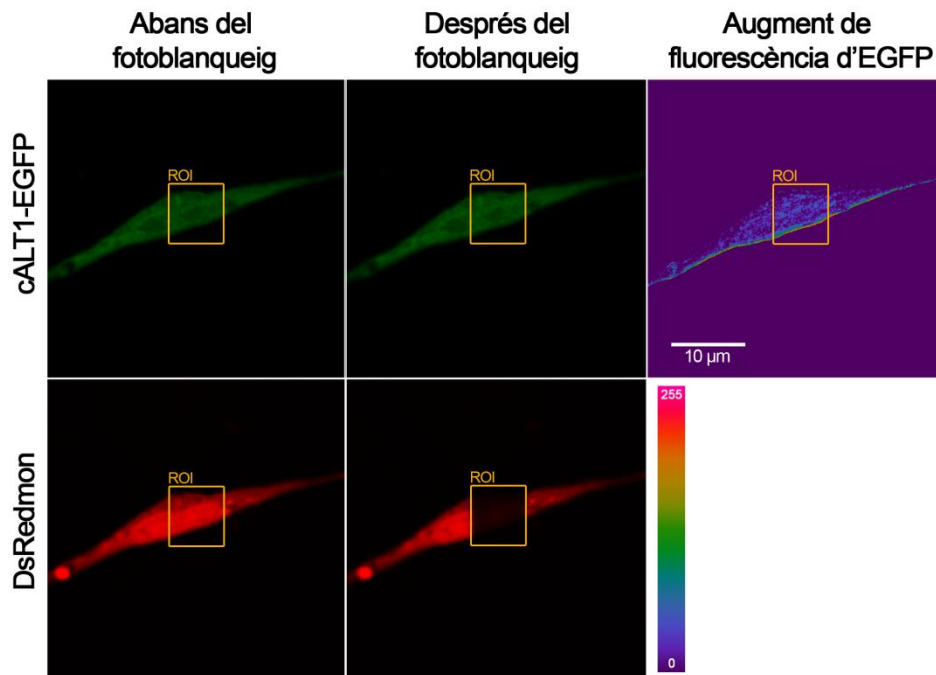
A



B



C



D

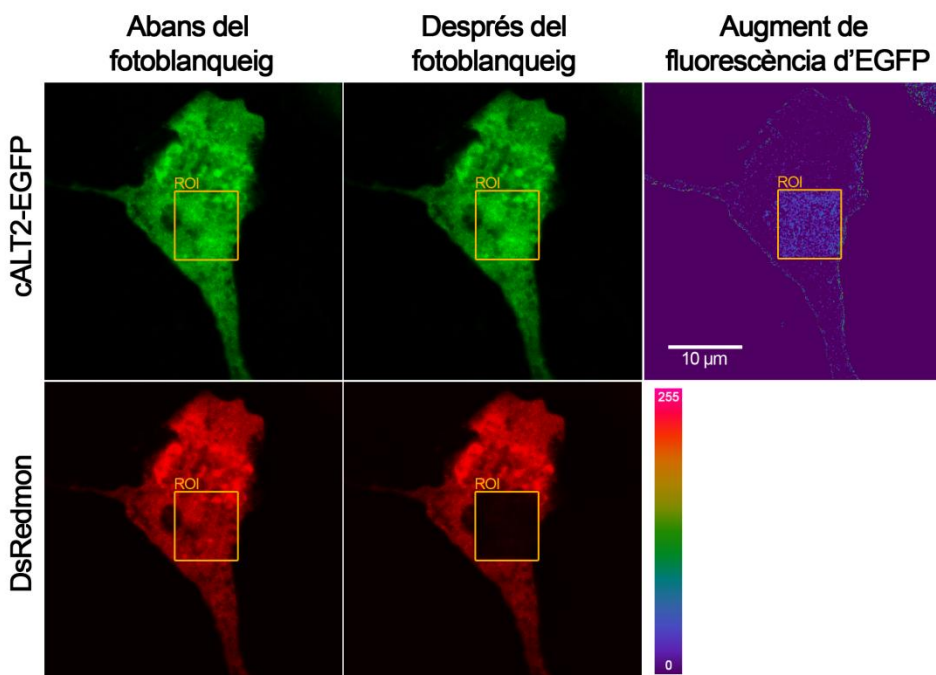
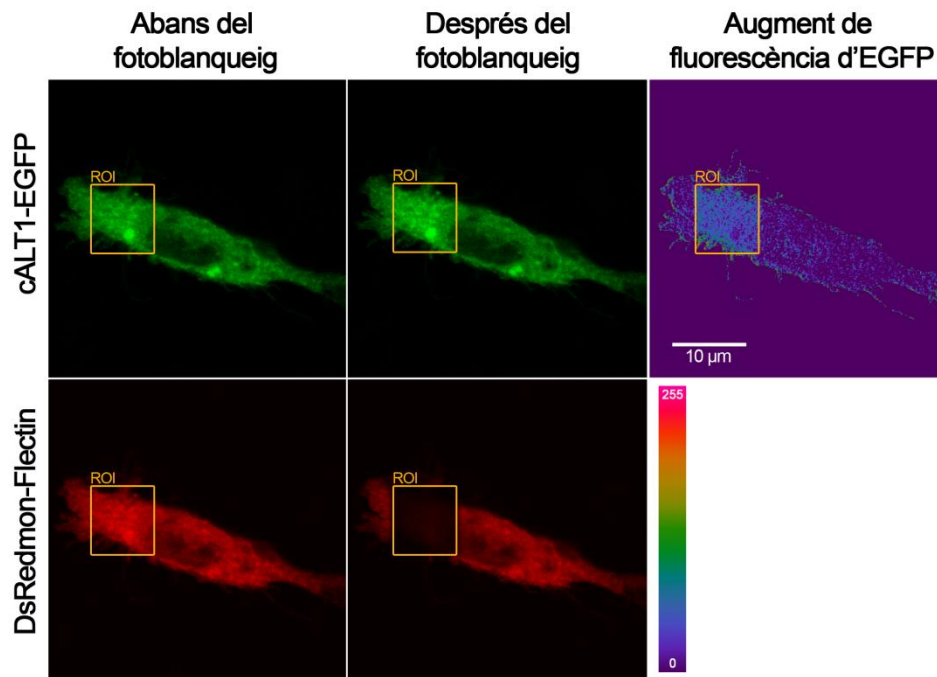


Figura 32. Anàlisi per FRET mitjançant fotoblanqueig de les parelles de proteïnes assajades com a controls negatius utilitzant el constructe DsRedmon-Flectin. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg de les parelles de plasmidis corresponents als controls de l'experiment: EGFP/DsRedmon (A), EGFP/DsRedmon-Flectin (B), cALT1-EGFP/DsRedmon (C) i cALT2-EGFP/DsRedmon (D). Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i visualitzar a un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 488 nm (donant EGFP, en verd) i 561 nm (acceptor DsRedmon, en vermell). L'àrea marcada com a ROI es va fotoblanquejar a la longitud d'ona de 561 nm, i després es van tornar a prendre imatges a les longituds d'ona de 488 i 561 nm. L'increment de la intensitat de fluorescència d'EGFP convertida a pseudocolor (imatge de la dreta, dalt) indica en una escala de color les variacions en l'escala de grisos, que va de 0 a 255 (imatge de la dreta, sota).

A



B

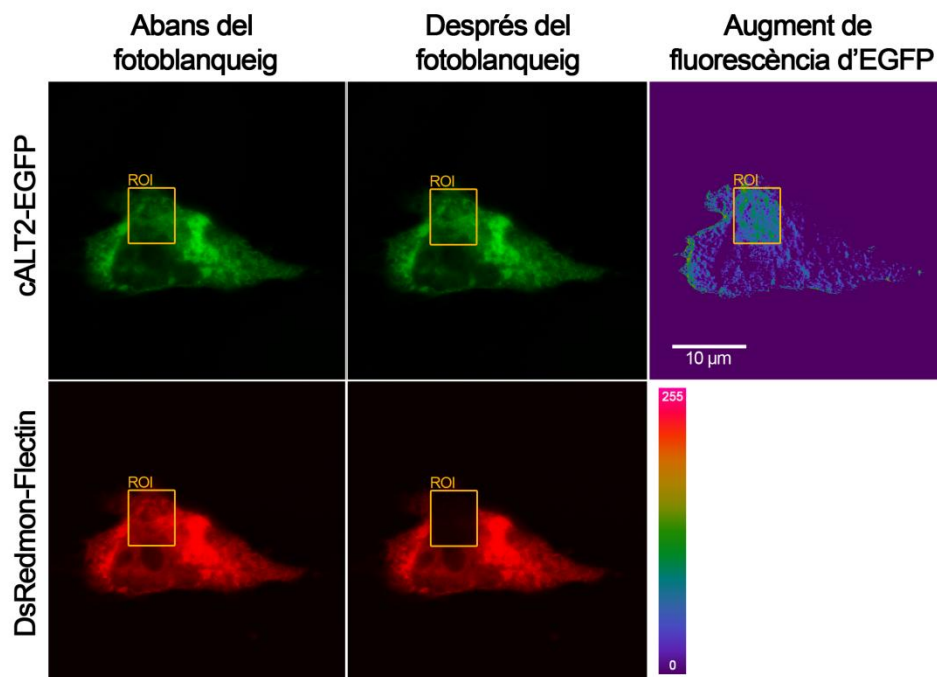


Figura 33. Anàlisi per FRET mitjançant fotoblanqueig de la interacció entre cALT1-EGFP i cALT2-EGFP amb DsRedmon-Flectin. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 μg dels plasmidis d'expressió de cALT1-EGFP i DsRedmon-Flectin (A) i cALT2-EGFP i DsRedmon-Flectin (B). Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i visualitzar a un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 488 nm (donant EGFP, en verd) i 561 nm (acceptor DsRedmon, en vermell). L'àrea marcada com a ROI es va fotoblanquejar a la longitud d'ona de 561 nm, i després es van tornar a prendre imatges a les longituds d'ona de 488 i 561 nm. L'increment de la intensitat de fluorescència d'EGFP convertida a pseudocolor (imatge de la dreta, dalt) indica en una escala de color les variacions en l'escala de grisos, que va de 0 a 255 (imatge de la dreta, sota).

Els valors d'eficiència de FRET representats a les figures 34 i 35 indiquen diferències significatives entre els controls (parelles EGFP/DsRedmon, EGFP/Flectin-DsRedmon, cALT1-EGFP/DsRedmon, cALT2-EGFP/DsRedmon a la figura 34; i EGFP/DsRedmon, EGFP/DsRedmon-Flectin, cALT1-EGFP/DsRedmon, cALT2-EGFP/DsRedmon a la figura 35) i les interaccions potencials assajades (cALT1-EGFP/Flectin-DsRedmon, cALT2-EGFP/Flectin-DsRedmon a la figura 34, i cALT1-EGFP/DsRedmon-Flectin, cALT2-EGFP/DsRedmon-Flectin a la figura 35).

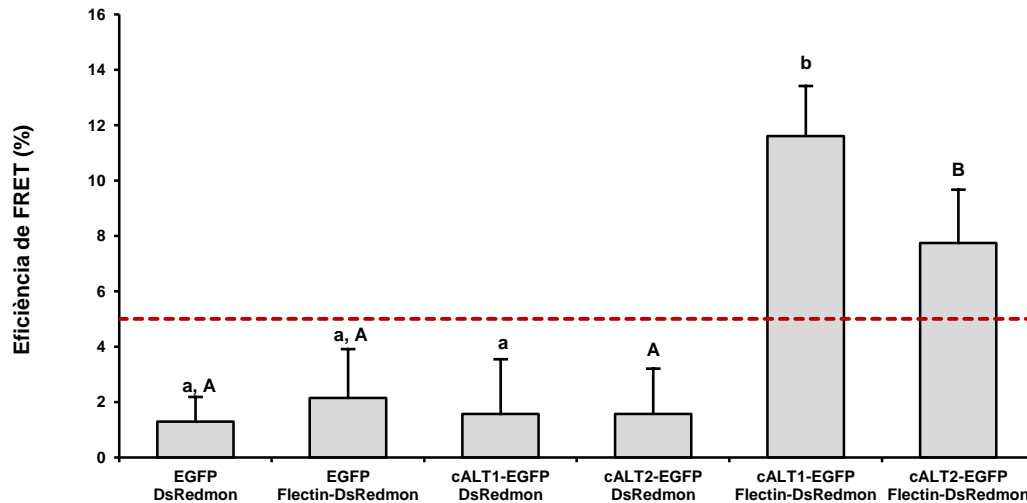


Figura 34. Quantificació de l'eficiència de FRET (%) per les diferents parelles de donant i acceptor assajades. Cèl·lules SBL es van cotransfectar amb combinacions de plasmidis d'expressió de les proteïnes fusionades als fluoròfors donant i acceptor (pEGFP/pDsRedmonMCS-N; pEGFP/ pFlectin-DsRedmon; pcALT1-EGFP/pDsRedmonMCS-N; pcALT2-EGFP/pDsRedmonMCS-N; pcALT1-EGFP/ pFlectin-DsRedmon; pcALT2-EGFP/ pFlectin-DsRedmon). Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i visualitzar a un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 488 nm (donant) i 561 nm (acceptor). Una àrea definida de la cèl·lula (ROI) es va fotoblanquejar a la longitud d'ona de 561 nm, i es van tornar a prendre imatges a les longituds d'ona de 488 i 561 nm. L'eficiència de FRET es basa en l'increment de la intensitat de fluorescència d'EGFP després del fotoblanqueig de l'acceptor DsRedmon. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SD de 3 a 5 cèl·lules de dos experiments independents. Les diferències significatives entre els grups s'expressen amb lletres minúscules en el cas de cALT1, i majúscules en el cas de cALT2 (test ANOVA d'una via, $p < 0.01$). La línia discontinua horitzontal situada al 5 % indica el llindar inferior teòric d'eficiència.

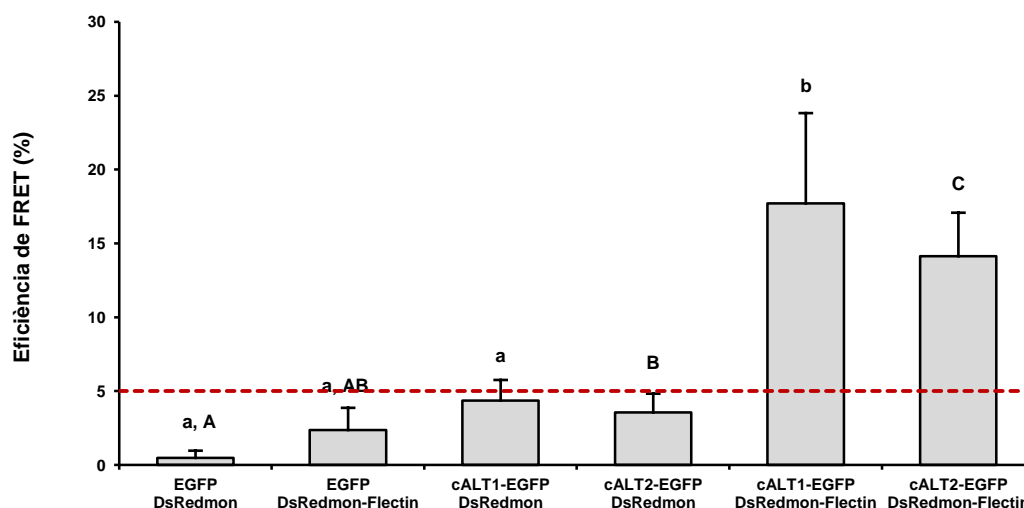


Figura 35. Quantificació de l'eficiència de FRET (%) per les diferents parelles de donant i acceptor assajades. Cèl·lules SBL es van cotransfectar amb totes les combinacions de plasmidis d'expressió de les proteïnes fusionades als fluoròfors donant i acceptor (pEGFP/pDsRedmon-C; pEGFP/pDsRedmon-Flectin; pcALT1-EGFP/pDsRedmon-C; pcALT2-EGFP/pDsRedmon-C; pcALT1-EGFP/pDsRedmon-Flectin; pcALT2-EGFP/pDsRedmon-Flectin). Després de 48 hores les cèl·lules es van fixar i visualitzar a un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 488 nm (donant) i 561 nm (acceptor). Una àrea definida de la cèl·lula (ROI) es va fotoblanquejar a la longitud d'ona de 561 nm, i es van tornar a prendre imatges a les longituds d'ona de 488 i 561 nm. L'eficiència de FRET es basa en l'increment de la intensitat de fluorescència d'EGFP després del fotoblanqueig de l'acceptor DsRedmon. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SD de 3 a 5 cèl·lules de dos experiments independents. Les diferències significatives entre els grups s'expressen amb lletres minúscules en el cas de cALT1, i majúscules en el cas de cALT2 (test ANOVA d'una via, $p < 0.05$). La línia discontinua horitzontal situada al 5 % indica el llindar inferior teòric d'eficiència.

Els resultats suggereixen que, tant en el cas de l'aproximació on es deixa el pèptid senyal d'F-lectina lliure, com en el cas on s'hi deixa la regió C-terminal, l'F-lectina fusionada al fluoròfor DsRedmon és capaç d'interaccionar amb les isoformes citosòliques d'ALT d'orada (cALT1 i cALT2) fusionades al fluoròfor EGFP. Aquesta interacció, detectada mitjançant l'eficiència de FRET, és major quan es deixa la regió C-terminal lliure, respecte la detectada en el cas on F-lectina presenta el pèptid senyal lliure. La fusió del fluoròfor DsRedmon a l'extrem C-terminal d'F-lectina podria dificultar i interferir parcialment en la interacció entre el domini C-terminal d'F-lectina i les proteïnes cALT, resultant en una menor eficiència de FRET.

4.4.1 Efecte de la coexpressió d’F-lectina i cALT1 o cALT2 sobre la localització subcel·lular de les tres proteïnes en cèl·lules SBL

Després d’haver observat que F-lectina podria seguir un patró de secreció per la via clàssica, on la proteïna es marca a l’aparell de Golgi per a la seva posterior secreció en vesícules, i de comprovar que la coexpressió d’F-lectina amb les dues isoformes d’ALT citosòlica, cALT1 i cALT2, promou la reorganització de la localització subcel·lular de les tres proteïnes a estructures vesiculars perinuclears de gran mida, ens vam proposar determinar si la coexpressió d’F-lectina conjuntament amb cALT1 o cALT2 té algun efecte sobre la localització d’F-lectina a l’aparell de Golgi i en vesícules de secreció.

Per aquest estudi es van utilitzar anticossos per immunodetectar GM130 (proteïna que forma part de la matriu de *cis*-Golgi) i STX-6 (proteïna que es troba en el sistema *trans*-Golgi i que forma part de les vesícules de secreció). La detecció d’aquests anticossos en el microscopi es fa a través d’un anticòs secundari, Alexa Fluor 647 (Life Technologies), que és capaç d’emetre fluorescència si s’excita a una longitud d’ona de vermell llunyà (633 nm).

4.4.1.1 Efecte de la coexpressió d’F-lectina i cALT1 o cALT2 sobre la localització d’F-lectina i les isoformes de cALT a l’aparell de Golgi en cèl·lules SBL

Cèl·lules SBL es van transfectar amb els constructes pFlectin-DsRedmon i pcALT1-EGFP, o pFlectin-DsRedmon i pcALT2-EGFP, i després de 48 hores es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l’anticòs que s’uneix a la proteïna GM130, i una hora més amb l’anticòs secundari Alexa Fluor 647. Les cèl·lules es van visualitzar en un microscopi confocal d’escaneig làser a les longituds d’ona de 561 nm (Flectin-DsRedmon, en vermell), 488 nm (cALT1-EGFP i cALT2-EGFP, en verd) i 633 nm (GM130, en blau).

Les figures 36 i 37 mostren imatges representatives d’una cèl·lula cotransfectada amb els plasmidis d’expressió de Flectin-DsRedmon i cALT1-EGFP o cALT2-EGFP, respectivament, i el seu marcatge amb l’anticòs que detecta GM130, juntament amb les imatges de solapament per a cada una de les combinacions (*merge1* a *merge4*).

Per determinar la presència de colocalització s’adjunta una imatge ampliada de la zona marcada amb un requadre blanc a la imatge de solapament (figura 36B, i figura 37B). En les imatges ampliades se senyala part de l’aparell de Golgi amb fletxes blanques, i es marquen les regions d’interès (ROI) sobre les que es mesuren els histogrames (figura 36C, i figura 37C). Els

histogrames representen les intensitats en escala de grisos de cada fluoròfor en la distància fixada a la ROI.

La colocalització de les parelles de proteïnes i el marcatge de l'aparell de Golgi es pot observar a la imatge ampliada com a zones blanques (resultat de la superposició dels colors verd, vermell i blau), i a l'histograma en forma de coincidència entre els pics d'intensitat de fluorescència dels tres cromòfors.

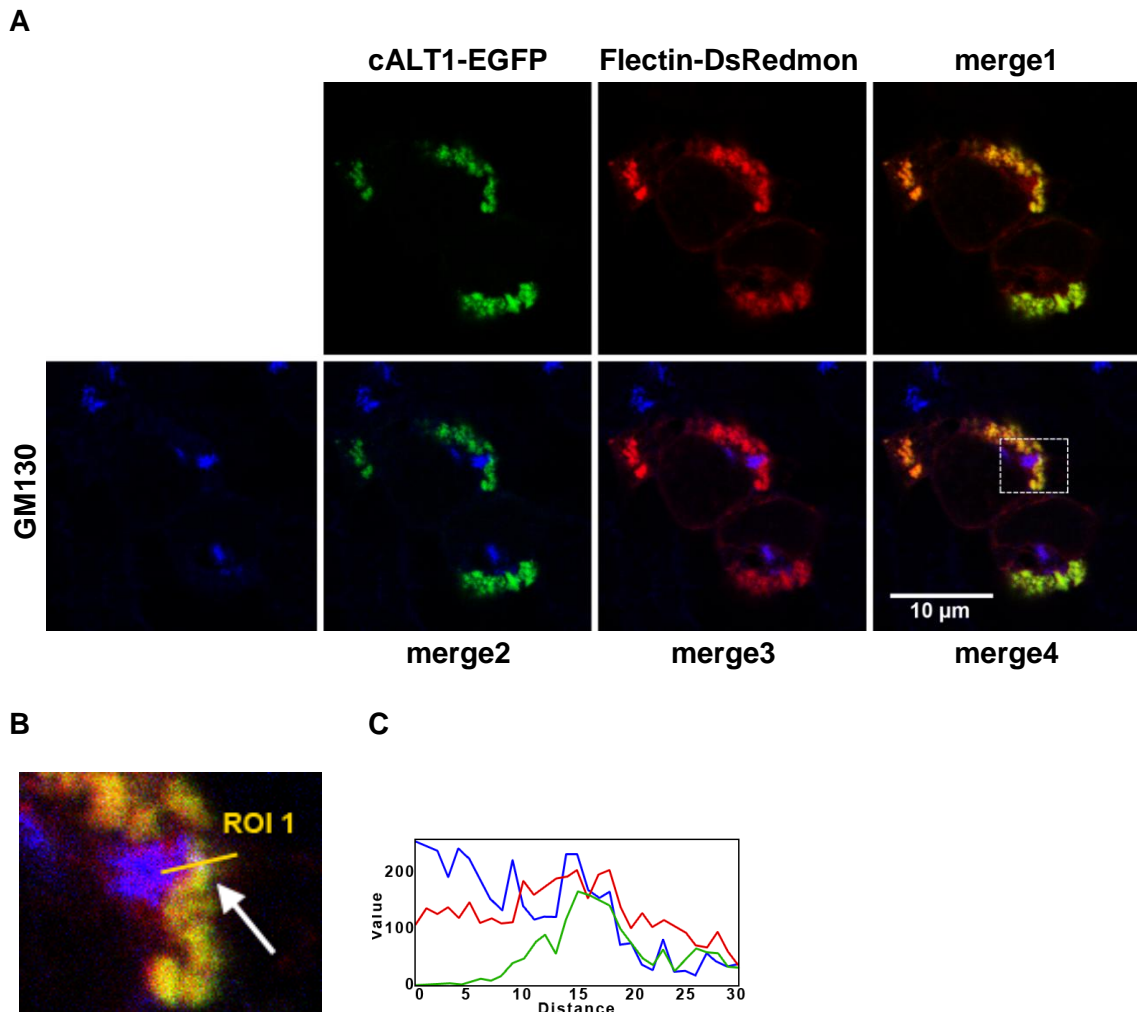


Figura 36. Efecte de la coexpressió de cALT1-EGFP i Flectin-DsRedmon sobre la localització de cALT1 i F-lectina en l'aparell de Golgi. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg dels plasmidis pcALT1-EGFP i pFlectin-DsRedmon. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs GM130, i posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 488 nm (cALT1-EGFP), 561 nm (Flectin-DsRedmon) i 633 nm (GM130). S'adjunten les imatges de solapament (*merge1* a *merge4*) per a cada una de les combinacions. B. Ampliació de la zona marcada amb un requadre blanc. Amb línia groga es marca la ROI. La fletxa blanca indica l'aparell de Golgi. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels tres canals, a la zona de la ROI 1. L'histograma indica la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

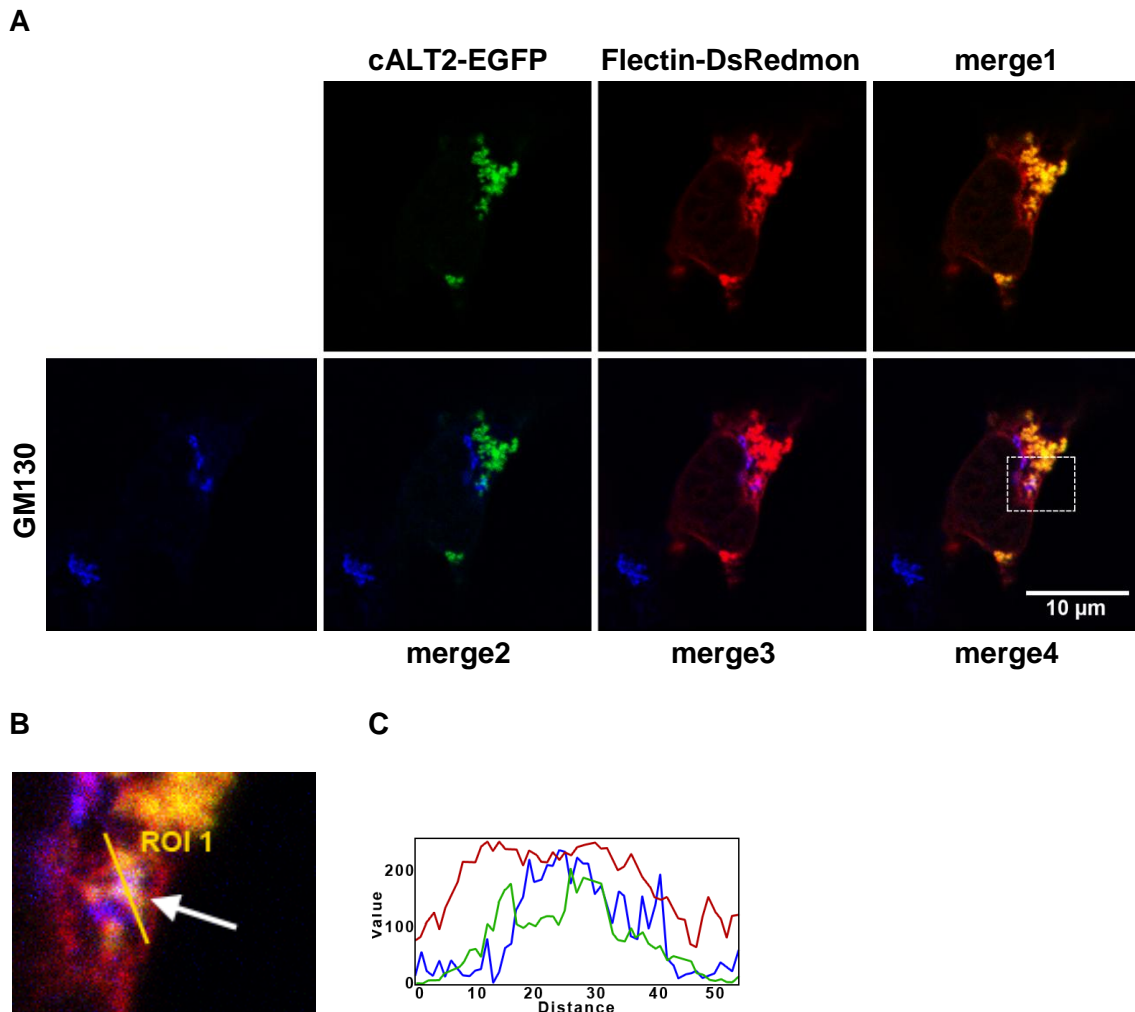


Figura 37. Efecte de la coexpressió de cALT2-EGFP i Flectin-DsRedmon sobre la localització de cALT2 i F-lectina en l'aparell de Golgi. Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg dels plasmidis pcALT2-EGFP i pFlectin-DsRedmon. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs GM130, i posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 488 nm (cALT2-EGFP), 561 nm (Flectin-DsRedmon) i 633 nm (GM130). S'adjunten les imatge de solapament (*merge1* a *merge4*) per a cada una de les combinacions. B. Ampliació de la zona marcada amb un requadre blanc. Amb línia groga es marca la ROI. La fletxa blanca indica l'aparell de Golgi. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels tres canals, a la zona de la ROI 1. L'histograma indica la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

Tant en el cas de la combinació de les proteïnes Flectin-DsRedmon i cALT1-EGFP com en el cas de Flectin-DsRedmon i cALT2-EGFP, es pot observar colocalització de les parelles de proteïnes i el marcatge de GM130, el que suggereix que la coexpressió d'F-lectina i cALT1 o cALT2 promou una reorganització de la localització subcel·lular d'F-lectina i les isoformes de cALT a estructures perinuclears grans d'aspecte vesicular on les tres proteïnes es troben parcialment localitzades en l'aparell de Golgi.

4.4.1.2 Efecte de la coexpressió d'F-lectina i cALT2 sobre la localització d'F-lectina i cALT2 a vesícules de secreció en cèl·lules SBL

Cèl·lules 293A es van transfectar amb el constructe pFlectin-DsRedmon i pcALT2-EGFP, i després de 48 hores es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs que s'uneix a la proteïna STX-6, i una hora més amb l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. Les cèl·lules es van visualitzar en un microscopi confocal d'escaneig làser a les longituds d'ona de 561 nm (Flectin-DsRedmon, en vermell), 488 nm (cALT2-EGFP, en verd) i 633 nm (STX-6, en blau).

La figura 38 mostra les imatges representatives d'una cèl·lula transfectada amb els plasmidis d'expressió de Flectin-DsRedmon i cALT2-EGFP, i el seu marcatge amb l'anticòs que detecta STX-6, juntament amb les imatges de solapament per a cada una de les combinacions (*merge1* a *merge4*).

Per visualitzar la colocalització s'adjunta una imatge ampliada de la zona marcada amb un requadre blanc a la imatge de solapament (figura 38B). En les imatges ampliades se senyalen vesícules de secreció amb fletxes blanques, i es marquen les ROI sobre les que es mesuren els histogrames (figura 38C i D). Els histogrames representen les intensitats en escala de grisos de cada fluoròfor en la distància fixada a la ROI.

La colocalització d'F-lectina, cALT2 i el marcatge de les vesícules de secreció es pot observar a la imatge ampliada com a zones blanques (resultat de la superposició dels colors verd, vermell i blau), i a l'histograma en forma de coincidència entre els pics d'intensitat de fluorescència dels tres cromòfors.

Tal i com es pot observar a les diferents imatges de solapament, com a la imatge ampliada, els tres marcatges (proteïnes Flectin-DsRedmon i cALT2-EGFP, i STX-6) coincideixen en formacions vesiculades, el que suggereix que la coexpressió d'F-lectina i cALT2 promou, a més d'una reorganització de la localització subcel·lular d'ambdues proteïnes a estructures perinuclears grans d'aspecte vesicular, la seva localització de manera parcial en vesícules de secreció.

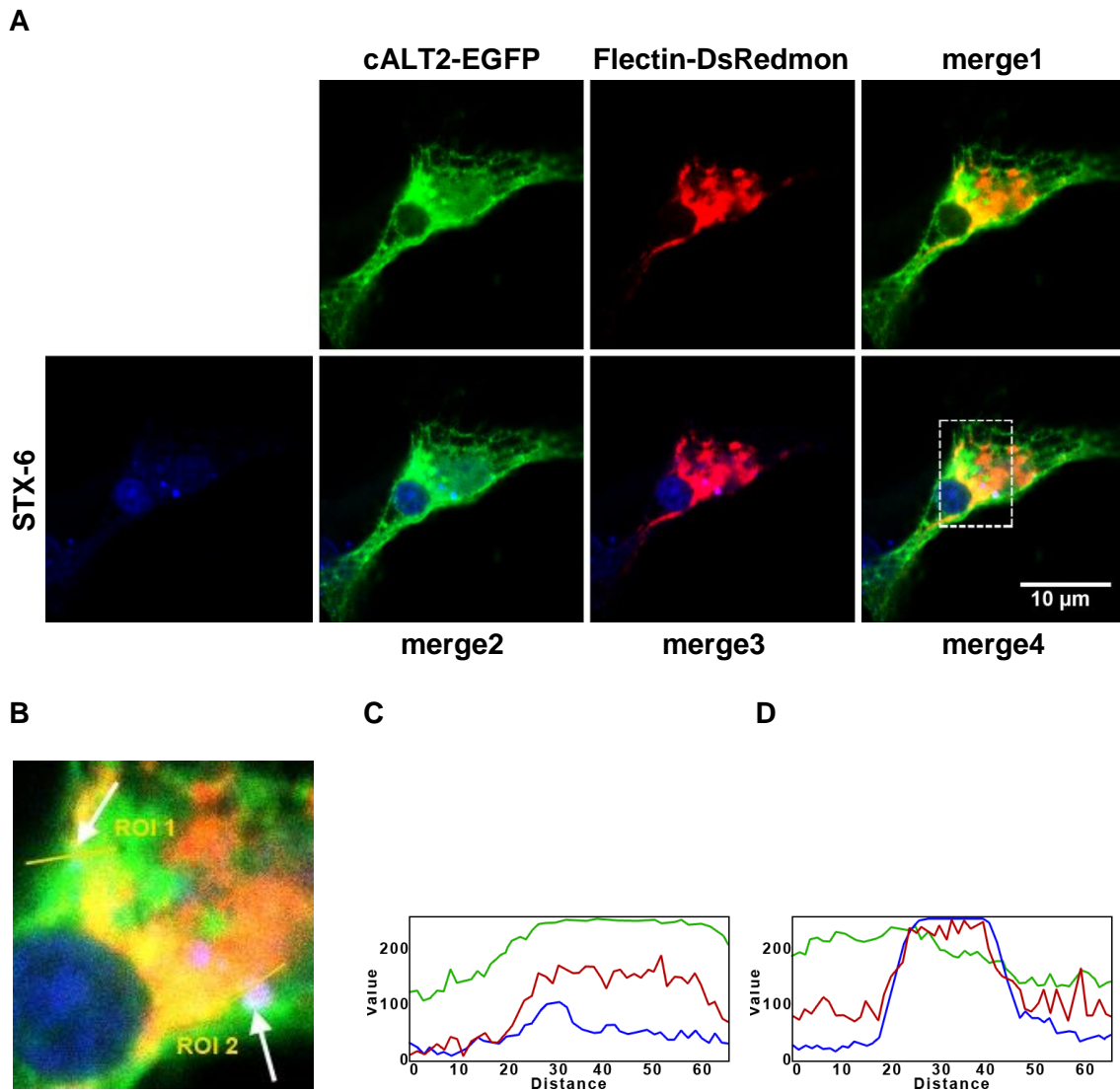


Figura 38. Efecte de la coexpressió de cALT2-EGFP i Flectin-DsRedmon sobre la localització de cALT2 i F-lectina en vesícules de secreció. Cèl·lules 293A es van sembrar en plaques de sis pous amb cobreobjectes i van ésser transfectades amb 4 µg de pcALT2-EGFP i pFlectin-DsRedmon. Després de 48 hores, les cèl·lules es van fixar i permeabilitzar. Es van incubar durant una hora amb l'anticòs STX-6, i posteriorment es va detectar mitjançant l'anticòs secundari Alexa Fluor 647. A. Imatges representatives preses utilitzant un microscopi confocal, a les longituds d'ona de 488 nm (cALT2-EGFP), 561 nm (Flectin-DsRedmon) i 633 nm (STX-6). S'adjunten les imatges de solapament (*merge1* a *merge4*) per a cada una de les combinacions. B. Ampliació de la zona marcada amb un requadre blanc. Amb línies grogues es marquen les ROI 1 i ROI 2. Les fletxes blanques indiquen les vesícules. C. Histograma d'intensitat d'escala de grisos dels tres canals, a la zona de la ROI 1. D. Histograma d'intensitat d'escala grisos dels tres canals, a la zona de la ROI 2. Els histogrames indiquen la superposició de les intensitats dels cromòfors a les zones marcades.

4.5 Efecte de la sobreexpressió d'F-lectina sobre l'activitat de l'ALT citosòlica d'orada en cèl·lules SBL

Donat que l'F-lectina colocalitza i interacciona amb cALT1 i cALT2, vam estudiar la regulació posttraduccional a què pot estar sotmesa l'activitat de les isoformes de l'ALT citosòlica d'orada a través de mecanismes d'interacció proteïna-proteïna amb l'F-lectina.

Per dur a terme aquest objectiu es van utilitzar constructes capaços d'expressar les proteïnes cALT1, cALT2 i F-lectina en un sistema cel·lular eucariota. Es tracta dels plasmidis pcDNA3-cALT1k2 (expressa cALT1), pcDNA3-cALT2 (expressa cALT2) i pcDNA3-Flectin (expressa F-lectina). El plasmidi pcDNA3-cALT2 es va clonar anteriorment al laboratori (Anemaet et al, 2008). El constructe pcDNA3-cALT1k2 es va clonar a partir de cDNA aïllat a partir d'RNA total de fetge d'orada, utilitzant els encebadors MG1402/IMAL20. El plasmidi pcDNA3-Flectin es va clonar utilitzant els oligonucleòtids MG1037/MG1038 i el plasmidi pGEM-Flectin com a motllo.

Cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de 6 pous, a una densitat de 5×10^5 cèl·lules/pou. Al cap de 24 hores es van transfectar amb els plasmidis pcDNA3, pcDNA3-cALT1k2, pcDNA3-cALT2, pcDNA3-Flectin, i les combinacions pcDNA3-cALT1k2 amb pcDNA3-Flectin, i pcDNA3-cALT2 amb pcDNA3-Flectin. Com a control intern de transfecció i per normalitzar els resultats es va afegir el vector pCMV β a totes les condicions.

Les cèl·lules es van recollir després de 48 hores i se'n va aïllar l'extracte de proteïna total. Es quantificà la proteïna total i es mesurà l'activitat ALT a cadascun dels extractes. Per tal de normalitzar l'eficiència de la transfecció en cada condició, es va mesurar l'activitat β -galactosidasa en els extractes cel·lulars proteïcs.

L'activitat ALT es va expressar com a activitat específica (U/g), normalitzada amb l'activitat β -galactosidasa (unitats arbitràries).

Els resultats mostren un increment en l'activitat específica ALT d'aproximadament dues vegades, en les cèl·lules transfectades amb els plasmidis d'expressió pcDNA3-cALT1k2 i pcDNA3-cALT2. Les cèl·lules transfectades amb el plasmidi pcDNA3-Flectin mostren uns nivells d'activitat semblants als de les cèl·lules transfectades amb el vector buit. Les cèl·lules SBL transfectades amb els plasmidis d'expressió de cALT1 i cALT2 en combinació amb F-lectina mostren un increment significatiu de l'activitat ALT de més de dues vegades en el cas de cALT2,

i d'aproximadament tres vegades en el cas de cALT1 (figura 39), en comparació amb les cèl·lules que sobreexpressen cALT1 o cALT2 en absència d'F-lectina.

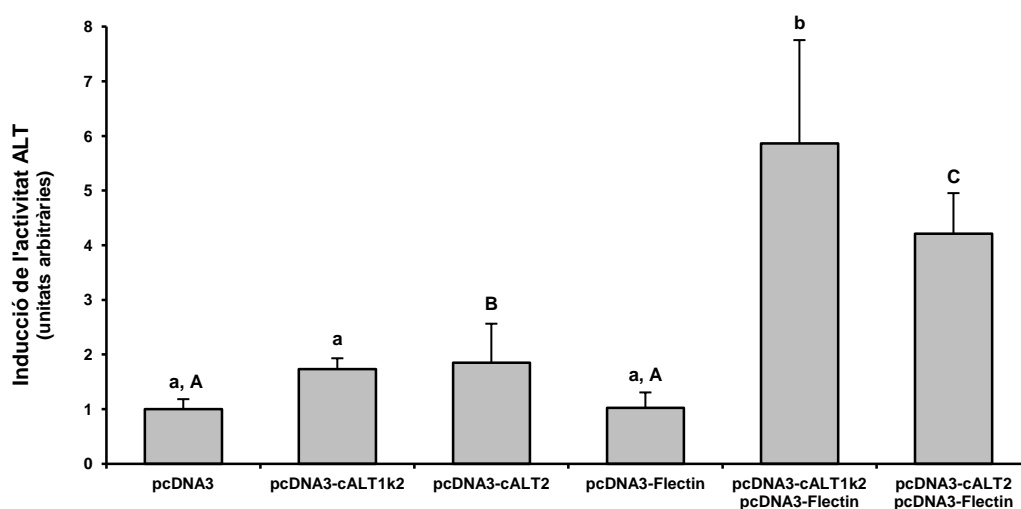


Figura 39. Efecte de l'expressió d'F-lectina sobre les activitats de cALT1 i cALT2 en cèl·lules SBL.

Les cèl·lules SBL es van sembrar en plaques de sis pous i es van transfectar amb 3 µg del vector buit (pcDNA3), els plasmidis d'expressió de cALT1, cALT2 i F-lectina (pcDNA3-cALT1k2, pcDNA3-cALT2 i pcDNA3-Flectin) i 3 µg de cada constructe d'expressió per les combinacions de cALT1 i cALT2 amb F-lectina (pcDNA3-cALT1k2 amb pcDNA3-Flectin, i pcDNA3-cALT2 amb pcDNA3-Flectin). Per tal d'igualar les quantitats de plasmidi total en les mescles, es van ajustar amb DNA *carrier*. A cada mescla es va afegir 0.5 µg del plasmidi pCMVβ per tal de normalitzar l'expressió entre les diferents mescles. Les cèl·lules es van recollir després de 48 hores, i l'activitat de l'enzim ALT es va determinar en els extractes cel·lulars. L'activitat ALT de les cèl·lules transfectades amb el vector buit es va fixar a 1. Els valors estan expressats com a mitjana ± SD de dos a tres experiments independents realitzats per duplicat. Les diferències significatives entre els grups s'expressen amb lletres minúscules en el cas de cALT1, i majúscules en el cas de cALT2 (test ANOVA d'una via, $p < 0.05$).

4.6 Distribució tissular de l'expressió d'F-lectina, cALT1 i cALT2.

Per comprovar en quins teixits la interacció entre l'F-lectina i les isoformes citosòliques de l'ALT d'orada pot tenir lloc *in vivo*, es va examinar la distribució tissular de l'F-lectina i les isoformes citosòliques d'ALT.

Es van dissenyar els oligonucleòtids MG1122q i MG1123q, per amplificar un fragment de 129 pb d'F-lectina, i es van utilitzar els oligonucleòtids dissenyats prèviament al laboratori per amplificar un fragment de 201 pb de cALT1 (JDRT2C5S i IMAL11), i un fragment de 63 pb de cALT2 (JDc2s i JDc2as).

Es va realitzar un assaig de qRT-PCR per determinar els nivells d'mRNA d'F-lectina, cALT1 i cALT2, relatiu als nivells d'RNA ribosomal 18S i beta-actina, considerats com a gens d'expressió constitutiva. L'assaig es va realitzar utilitzant RNA total aïllat a partir de brànquies, cervell, cor, fetge, teixit adipós, intestí, melsa, múscul esquelètic i ronyó, de peixos alimentats (figura 40).

L'F-lectina s'expressa de manera molt abundant en el fetge, i en menors nivells en ronyó i teixit adipós. No es va detectar l'expressió d'F-lectina en la resta de teixits.

De manera consistent amb els resultats prèviament publicats pel nostre grup (Anemaet et al, 2008), la isoforma cALT1 s'expressa majoritàriament en fetge i intestí, i a nivells lleugerament més baixos al cervell. La seva expressió és, per contra, minoritària en el cor, teixit adipós, melsa, múscul esquelètic i ronyó. La seva expressió en brànquies no es va detectar. La isoforma cALT2 s'expressa preferentment a cor i brànquies, i en menor nivell en greix, melsa, fetge, i la resta de teixits.

Conseqüentment, la interacció de l'F-lectina amb cALT1 i cALT2 és possible en el fetge, tot i que també podria donar-se en ronyó, i fins i tot en greix.

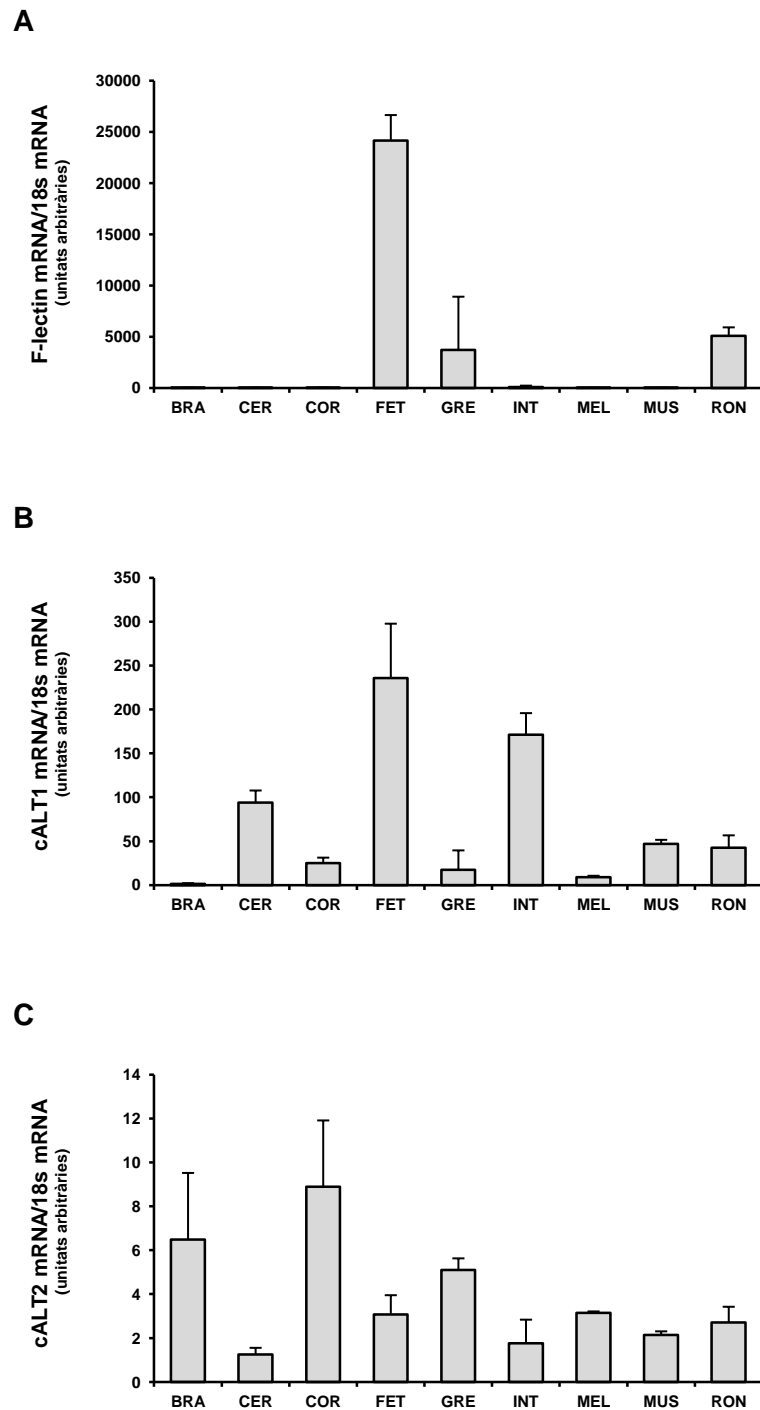


Figura 40. Distribució tissular dels RNA missatgers d'F-lectina, cALT1 i cALT2 de *S. aurata*. L'assaig de qRT-PCR dels nivells d'mRNA de l'F-lectina (A), cALT1 (B) i cALT2 (C) es va determinar utilitzant RNA total de brànquies (BRA), cervell (CER), cor (COR), fetge (FET), teixit adipós (GRE), intestí (INT), melsa (MEL), múscul esquelètic (MUS) i ronyó (RON), aïllats a partir de peixos alimentats. Els nivells d'mRNA d'F-lectina, cALT1 i cALT2 s'expressen relatius als nivells d'RNA ribosomal 18S, i s'expressen com a mitjana \pm SD (n=4).

4.7 Efecte de l'administració de lipopolisacàrid en orades

Per estudiar els efectes *in vivo* de la interacció entre F-lectina i les isoformes citosòliques de l'ALT de *S. aurata* es va injectar intraperitonealment una solució de LPS. LPS és un component de la paret dels bacteris que conté diferents monosacàrids en ramificacions de la seva estructura (Stenutz et al, 2006). El serotip d'LPS utilitzat (O26:B6) conté fucosa, entre d'altres monosacàrids.

Es van utilitzar orades, mantingudes en les condicions d'alimentació i estabulació detallades al punt 3.1.1. Els peixos van ésser privats d'aliment les 24 hores anteriors a l'inici de l'experiment. Les orades es van dividir en dos grups. Al primer grup se li va administrar solució salina, i al segon grup se li va administrar LPS (1 mg/kg de peix). La meitat dels peixos de cada grup es van sacrificar a les 4 hores, i la resta a les 24 hores després del tractament. Es van recollir mostres de sang i fetge per als posteriors assajos.

4.7.1 Efecte de l'administració de lipopolisacàrid sobre l'expressió d'F-lectina, i les diferents isoformes d'ALT.

Per estudiar l'efecte de l'LPS sobre l'expressió de l'F-lectina i les isoformes d'ALT, es va aïllar RNA total a partir de les mostres de fetge obtingudes, i es va dur a terme un assaig de qRT-PCR per detectar els nivells d'mRNA d'F-lectina i de les diferents isoformes d'ALT (cALT1, cALT2 i mALT). Com a control positiu de la infecció amb LPS, es van mesurar els nivells d'mRNA de la interleucina 1b (Il-1b), una citocina proinflamatòria que augmenta els seus nivells en orada després del tractament amb LPS (Sepulcre et al, 2009). Els encebadors utilitzats i les mides dels amplicons van ésser en cada cas els següents: MG1122q i MG1123q, 129 pb, per a F-lectina; JDRT2C5S i IMAL11, 201 pb, per cALT1; JDC2s i JDC2as, 63 pb, per cALT2; MC13 i MC14, 96 pb, per mALT; MG1205q i MG1206q (descrits a Sepulcre et al, 2009), 165 pb, per Il-1b. D'altra banda, de les mateixes mostres de fetge es van obtenir extractes de proteïna total, per assajar-ne l'activitat ALT total.

Els nivells d'expressió de la Il-1b van ésser significativament més elevats en els peixos tractats amb LPS que en els peixos control, a les 4 i a les 24 hores després de la injecció (figura 41B), suggerint que l'administració de LPS va promoure l'activació de la resposta immune. L'expressió d'F-lectina es va incrementar significativament en el fetge dels peixos 24 hores després del tractament amb LPS (figura 41A). A les 4 hores després del tractament amb LPS, encara que els nivells d'expressió de la Il-1b havien augmentat significativament, no es va poder observar cap efecte sobre els nivells d'expressió de l'F-lectina.

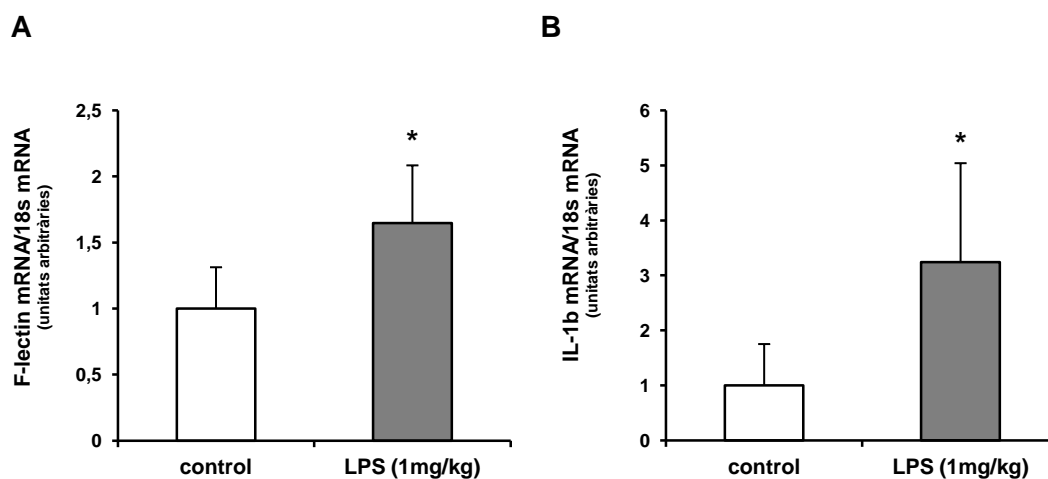


Figura 41. Efecte de l'administració d'LPS sobre els nivells d'expressió d'mRNA d'F-lectin i IL-1b en fetge de *S. aurata*. Els nivells d'mRNA per F-lectina (A), IL-1b (B) es van assajar mitjançant qRT-PCR a partir d'RNA total obtingut de fetge de peixos, 24 hores després del tractament amb una solució salina (control) o LPS (1 mg/kg de peix). Els nivells d'RNA d'F-lectin i IL-1b s'expressen relatiu als nivells d'RNA ribosomal 18S. Els valors s'expressen com a mitjana \pm SD de quatre a sis mostres (t de Student, * $p < 0.05$).

D'altra banda, els nivells d'activitat específica ALT a les 24 hores després del tractament van augmentar significativament en el fetge dels peixos tractats amb LPS respecte els tractats amb solució control, tal com es mostra a la figura 42. Aquest augment va ésser aproximadament del 25 %. No hi va haver canvis significatius en els nivells d'activitat específica en els extractes de proteïna total de fetge a les 4 hores posteriors al tractament amb LPS.

Els nivells d'expressió de cALT1, cALT2 i mALT determinats a nivell d'mRNA, no han mostrat tenir canvis significatius en cap de les condicions analitzades (resultats no mostrats).

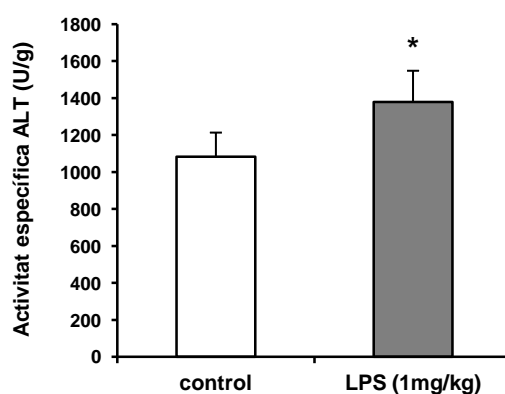


Figura 42. Efecte de l'administració d'LPS sobre l'activitat ALT en fetge de *S. aurata*. Els peixos van ésser injectats intraperitonealment amb solució salina (control) i LPS (1 mg/kg de peix), i es van recollir mostres de fetge a les 24 hores. Es va aïllar extracte de proteïna total de fetge i se'n va assajar l'activitat ALT. Els valors s'expressen com a mitjana \pm SD de 5 a 7 peixos (t de Student, * $p < 0.05$).

4.7.2 Efecte de l'administració de lipopolisacàrid sobre el metabolisme intermediari

Per estudiar l'efecte de l'LPS sobre el metabolisme intermediari en l'orada es van assajar els nivells de metabòlits en sèrum i les activitats d'enzims clau en la glicòlisi, la gluconeogènesi i la via de les pentoses fosfat en fetge.

Per obtenir el sèrum, es va coagular la sang d'orades sacrificades a les 4 i a les 24 hores després del tractament amb solució salina o LPS (1 mg/kg), i es va centrifugar a 6000 x g durant 10 minuts per sedimentar el coàgul. El sèrum es va recollir per analitzar els nivells de glucosa i de triglicèrids (figura 43) utilitzant un autoanalitzador COBAS MIRA S (Roche) a 30 °C de temperatura.

Els nivells de glucosa a les 24 hores no van canviar significativament, tot i que s'observà una tendència a augmentar en els peixos tractats amb LPS. En canvi, els nivells de triglicèrids van augmentar significativament a les 24 hores després del tractament. Aquest augment va ésser d'un 70 % aproximadament. No hi va haver canvis significatius en els nivells de glucosa ni triglicèrids a les 4 hores després del tractament.

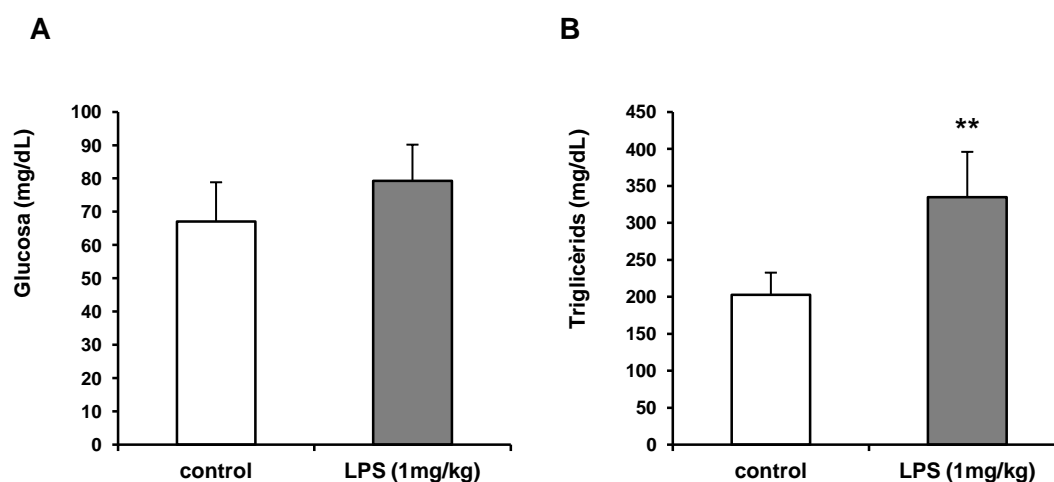


Figura 43. Efecte de l'administració d'LPS sobre els nivells de metabòlits en sèrum de *S. aurata*. Els peixos van ésser tractats amb solució salina (control) i LPS (1 mg/kg de peix), i es van recollir mostres de sang a les 24 hores. La sang es va deixar coagular i es va centrifugar a 6000 x g durant 10 minuts per aïllar-ne el sèrum. Es va analitzar la concentració de glucosa (A) i de triglicèrids (B) en el sèrum. Els valors s'expressen com a mitjana ± SD de 5 a 7 peixos (t de Student, **p<0.01).

Els extractes de proteïna total es van obtenir a partir de mostres de fetge a les 4 i les 24 hores després del tractament amb solució salina o LPS (1 mg/kg). Les mostres de fetge es van polvoritzar i homogeneïtzar. Es van separar la resta de components cel·lulars per centrifugació a 10000 x g durant 30 minuts, i es va retirar l'extracte de proteïna total per analitzar les

diferents activitats enzimàtiques. En els extractes de fetge es van assajar els nivells d'activitat dels enzims PFK1 i PK (glicòlisi), FBP (gluconeogènesi), 6-PGDH i G6PDH (via de les pentoses fosfat) utilitzant un autoanalitzador COBAS MIRA S (Roche), a 30 °C de temperatura.

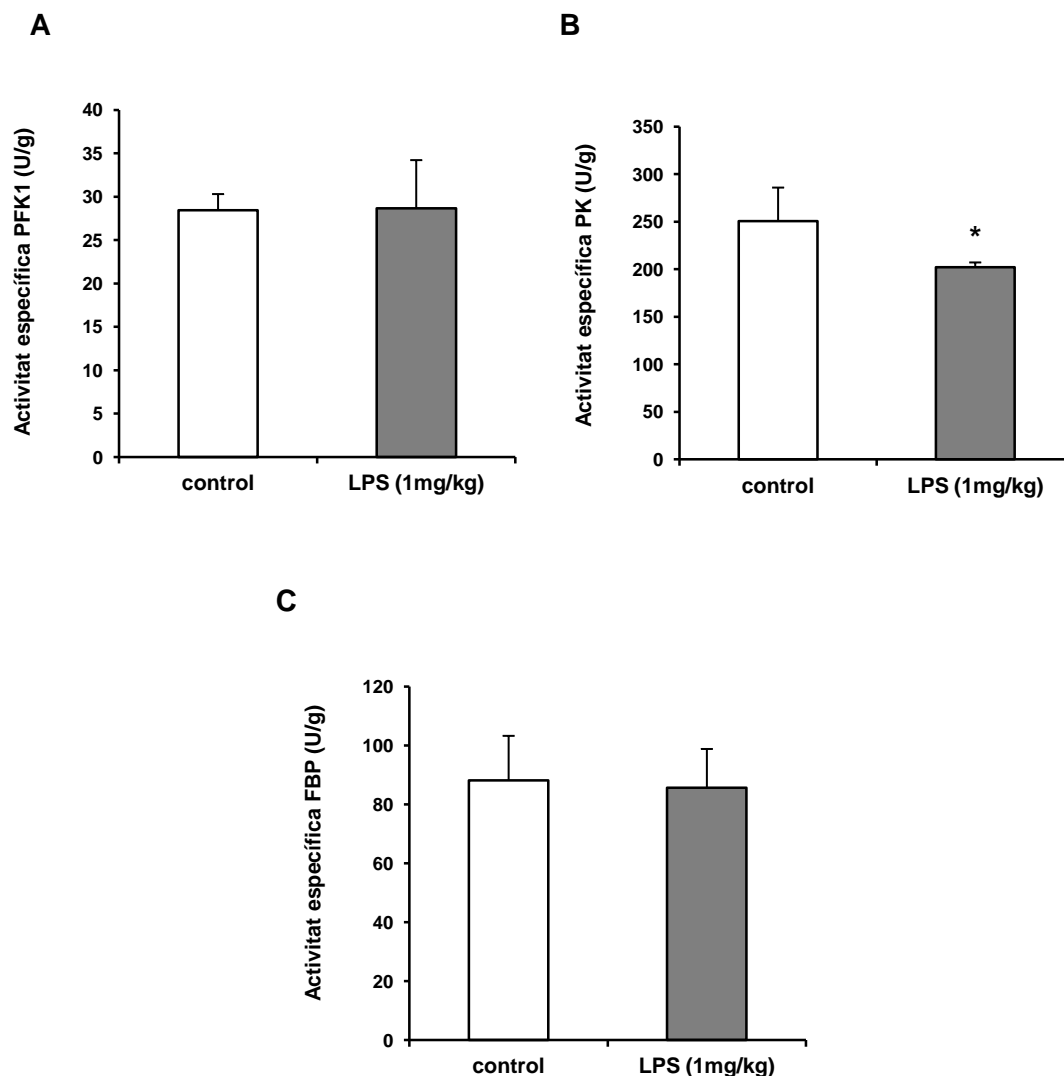


Figura 44. Efecte de l'administració d'LPS sobre els nivells d'activitat d'enzims glicolítics i gluconeogènics en fetge de *S. aurata*. Els peixos van ésser injectats intraperitonealment amb solució salina (control) i LPS (1 mg/kg de peix) i es van prendre mostres de fetge a les 24 hores després del tractament. Es van obtenir els extractes de proteïna total de fetge, i es van assajar les activitats PFK1 (A), PK (B) i FBP (C). Els valors s'expressen com a mitjana \pm SD de 5 a 7 peixos (t de Student, * $p < 0.05$).

La figura 44 mostra els nivells d'activitat de tres enzims clau implicats en la glicòlisi (PFK1 i PK) i la gluconeogènesi (FBP). Tant en el cas de l'enzim PFK1 com en el cas de l'enzim FBP no s'observen diferències significatives entre les diferents condicions. En el cas de l'enzim PK, en canvi, s'observa una disminució significativa del 20 % de l'activitat en el fetge dels peixos 24 hores després del tractament amb LPS 1 mg/kg.

A la figura 45 es poden observar els valors d'activitat dels enzims 6-PGDH i G6PDH, implicats en la via de síntesi de les pentoses fosfat. Es va observar un augment significatiu en les activitats 6-PGDH i G6PDH en el fetge de peixos 24 hores després del tractament amb LPS. En els dos casos l'augment de l'activitat va ésser del 20 % respecte els peixos control.

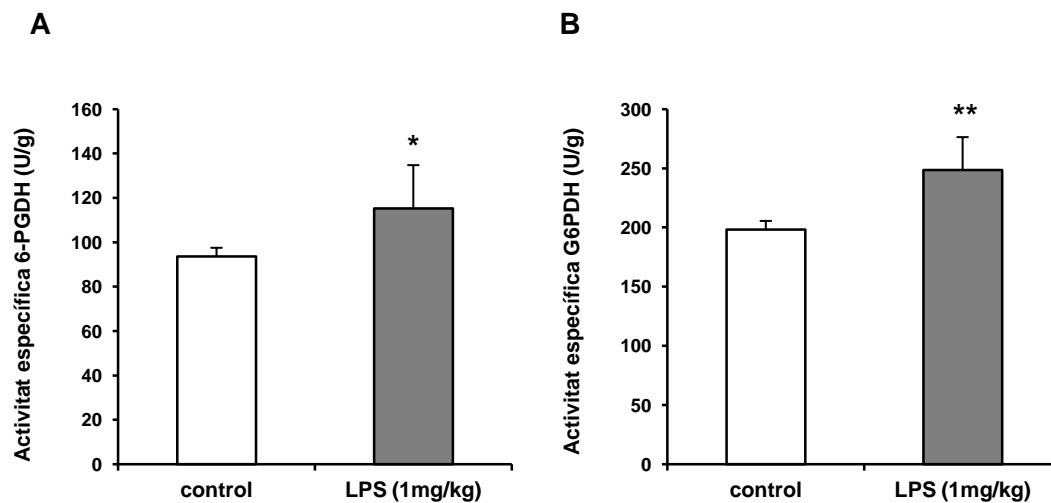


Figura 45. Efecte de la injecció d'LPS en els nivells d'activitat d'enzims de la via de les pentoses en fetge de *S. aurata*. Els peixos van ésser injectats intraperitonealment amb solució salina (control) i LPS (1 mg/kg de peix) i es van prendre mostres de fetge a les 24 hores després del tractament. Es van obtenir els extractes de proteïna total de fetge, i es van assajar les activitats 6-PGDH (A) i G6PDH (B). Els valors s'expressen com a mitjana ± SD de 5 a 7 peixos (t de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.8 Efecte bactericida de cALT2 d'orada

Recentment s'ha descrit una nova funció per a l'ALT en diferents espècies. L'ALT d'un organisme cefalocordat que evolutivament es troba entre els vertebrats i els invertebrats, *Branchiostoma japonicus*, és capaç d'unir-se específicament a les molècules de LPS de la paret bacteriana, inhibir-ne el creixement i causar la lisis cel·lular de bacteris Gram-negatius (Jing et al, 2011). Estudis més recents duts a terme utilitzant l'expressió recombinant d'ALT de diferents espècies (incloent plantes, vertebrats i llevats) demostren els diferents graus d'inhibició del creixement bacterià (McAllister et al, 2013). En aquest mateix estudi es va detectar en els enzims ALT una regió homòloga a la regió d'unió a endotoxines de l'LPS *Binding Protein* (LBP) (Wong et al, 2007). El grau d'homologia es relaciona directament amb l'efecte bactericida, suggerint que aquesta regió és la responsable de la seva activitat bactericida.

Per tal de determinar si l'ALT citosòlica d'orada és capaç d'inhibir el creixement bacterià com els seus homòlegs en altres espècies, es van realitzar dues aproximacions: un estudi previ *in silico* per determinar si la regió d'unió a endotoxina comú en LBP i ALT de les diferents espècies analitzades (McAllister et al, 2013) es troba també present en l'ALT d'orada, i un estudi experimental per determinar si extractes de cALT2 d'orada són capaços d'inhibir el creixement bacterià.

La figura 46 mostra un alineament de les possibles regions d'unió a endotoxines que podem trobar en els enzims ALT. Tal com estava prèviament descrit a l'estudi anàleg (McAllister et al, 2013), les isoformes citosòlica ALT1 i mitocondrial ALT2 humanes tenen regions homòlogues a les regions d'unió a endotoxines de l'LBP. La isoforma cALT2 d'orada (que conté la seqüència proteica de cALT1) presenta la mateixa homologia amb LBP que les isoformes humanes, la qual cosa suggereix que les seves propietats bactericides podrien ésser semblants.

HsLBP	-----DSSIRVQGRWKVRKSSFFKLQGSFD-----	24
HsALT1	EETGICVVPVPGSGFGQREGTYHFRMTILPPEKLRLLLEKLSRFHA	45
HsALT2	EETGICVVPVPGSGFGQREGTYHFRMTILPPVEKLRKTVLQKVKDFHI	45
SacALT	EEEGICLVPGSGFGQREGTFHFRMTILPPEKLRKLVLLQRLRDFHQ	45
	. . : : * : : * : : * : : . :	

Figura 46. Comparació de les possibles regions d'unió a endotoxina en ALT. Detall de l'alineament de les seqüències d'aminoàcids de LBP i diferents isoformes ALT. Els residus idèntics es troben remarcats en gris fosc mentre que els residus conservats i semi-conservats estan remarcats en gris (a la línia sota l'aliniament, "*" indica residus idèntics; "." indica substitucions conservatives; ":" indica substitucions semi-conservatives). L'alineament es va fer utilitzant el programa informàtic Clustal Omega (Clustal Omega 1.2.1). HsLBP: *Homo sapiens* LBP, AAB31143.1; HsALT1: *Homo sapiens* ALT1, NP_005300.1 ; HsALT2: *Homo sapiens* ALT2, NP_597700.1; SacALT: *Sparus aurata* cALT2, AY206502.1.

Per dur a terme la segona aproximació experimental es van utilitzar cèl·lules bacterianes d'*Escherichia coli* de la soca XL1-Blue. Aquesta soca permet el creixement selectiu dels bacteris en medi LB amb la presència de l'antibiòtic tetraciclina, sense la necessitat de transformar les cèl·lules amb un plasmidi de resistència a l'antibiòtic.

Es va partir de bacteris *E. coli* XL1-Blue a una dilució prèvia de 1/1000, per tal d'ajustar el nombre de colònies a un recompte òptim, i es van utilitzar 0.2 µl d'aquesta dilució per mesclar-los amb 50 µl de medi LB i 50 µl d'extracte de proteïna total procedent de cèl·lules SBL transfectades prèviament amb els plasmidis pcDNA3, pcDNA3-cALT2, pcDNA3-Flectin o pcDNA3-cALT2 conjuntament amb pcDNA3-Flectin (provinents dels experiments del punt 4.5). Els 100 µl de cada mescla es van repartir en plaques LB/tetraciclina i es van incubar a 37 °C durant 16 hores. Les colònies crescudes en cada placa es van recomptar, i es va obtenir el nombre d'unitats formadores de colònia (UFC) per a cada condició. Els resultats es van normalitzar tenint en compte la quantitat de proteïna total en cada extracte cel·lular.

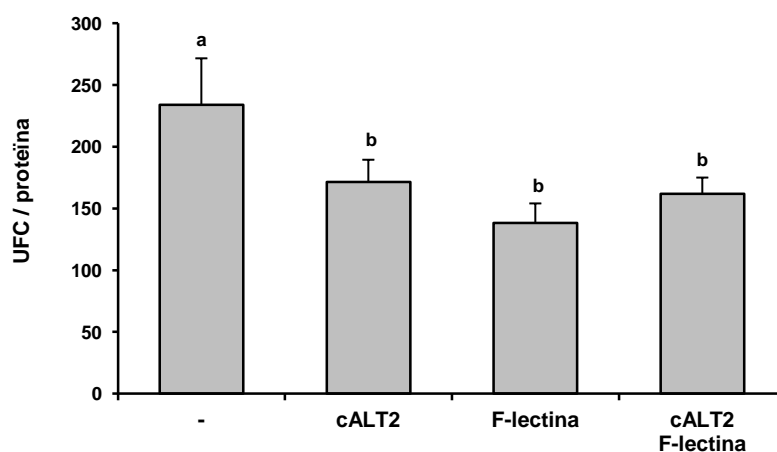


Figura 47. Efecte de la incubació amb extractes de proteïna de cèl·lules sobreexpressant cALT2, F-lectina o ambdues sobre el creixement bacterià. Una mescla de 50 µl de cultiu *E. coli* XL1-Blue i 50 µl d'extracte de proteïna total de cèl·lules SBL transfectades prèviament amb els plasmidis pcDNA3 (-), pcDNA3-cALT2 (cALT2), pcDNA3-Flectin (F-lectina) o pcDNA3-cALT2 i pcDNA3-Flectin (cALT2 F-lectina) es va sembrar en plaques LB/tetraciclina i es van incubar a 37 °C durant 16 hores. Es va realitzar un recompte de les UFC, i es va normalitzar segons la quantitat de proteïna en cada extracte cel·lular. Els valors s'expressen com a mitjana ± SD de tres cultius bacterians independents (test ANOVA d'una via, $p < 0.05$).

Tal com es mostra a la figura 47, en les mescles on hi ha present els extractes proteics de cèl·lules SBL que sobreexpressen tant la proteïna cALT2, F-lectina o ambdues, el nombre d'UFC és significativament menor que en les cèl·lules on els extractes cel·lulars no sobreexpressaven cap de les dues proteïnes.

Aquests resultats ens indiquen que, tant la proteïna cALT2 com l'F-lectina d'orada, són capaces de provocar una inhibició del creixement bacterià.

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

Per detectar proteïnes que potencialment interaccionen amb les isoformes citosòliques d'ALT hem dut a terme un assaig de doble híbrid en llevats amb cALT2 (la isoforma citosòlica ALT amb un exó més que cALT1) com a proteïna esquer i una biblioteca de cDNA de fetge d'orada com a presa. Aquesta metodologia ens ha permès identificar quatre fragments de pèptids que corresponen a quatre proteïnes diferents que potencialment interaccionen amb cALT2: F-lectina, RPS20, RBP2 i HABP2. La presència d'aquestes proteïnes ha estat descrita anteriorment en altres espècies de peixos, encara que cap d'elles ha estat prèviament relacionada amb l'ALT (Cameron et al, 2002; Kasahara et al, 2007; Bianchet et al, 2010; Yoshida et al, 2013). Les quatre proteïnes identificades estan implicades, d'una manera o d'una altra, en processos immunològics o inflamatoris.

Les proteïnes d'unió al retinol, com **RBP2**, són membres de la família d'unió a lípids intracel·lulars. Es tracta de polipèptids de baix pes molecular que s'uneixen i transporten retinoides, àcids grassos i sals biliars (Veerkamp et al, 1993; Banaszak, 1994). El retinol és la forma alcohòlica de la vitamina A, essencial per la visió, creixement, desenvolupament, reproducció i diferenciació de teixits epitelials, i és la forma que s'absorbeix a la mucosa intestinal i s'allibera als teixits. (Li, 1999). Els nivells de vitamina A són un factor clau en la distribució per l'organisme de cèl·lules limfoides innates. La deficiència d'aquestes cèl·lules en l'intestí es tradueix en una deficiente expressió de pèptids antimicrobians i IL-22, resultant en una activitat immunitària defectuosa a la mucosa (Kim et al, 2015).

HABP2 és una serina proteasa que es produeix principalment al fetge i que es troba circulant en el plasma com a zimogen inactiu. Tenint com a criteri l'homologia estructural per predir-ne la funció, HABP2 podria estar implicada en processos de coagulació, fibrinòlisi, inflamació i regulació de l'activitat del factor de creixement (Kanse i Etscheid, 2011). Inicialment es va aïllar com a proteïna d'unió a l'àcid hialurònic (Choi-Miura et al, 1996), però aquesta propietat d'unió a polianions carregats negativament es va estendre a l'heparina i als àcids nucleics. Altres components del sistema hemostàtic han mostrat tenir efectes duals en inflamació i processos de remodelació, com ara la protrombina, la proteïna C reactiva o el factor VIIa sobre les plaquetes, leucòcits, endoteli i cèl·lules musculars (Petäjä, 2011; Sen et al, 2011).

Estudis duts a terme per determinar el paper que exerceix HABP2 en cèl·lules endotelials en un context d'inflamació van mostrar un augment de l'expressió a nivell d'mRNA i proteïna d'HABP2 durant l'activació aguda de dany pulmonar promoguda per LPS (Mambetsariev et al,

2010). En un model de fibroblast pulmonar es va observar que HABP2 és capaç d'induir la senyalització que porta a una migració i proliferació cel·lular, així com l'alliberament d'IL-8 (Etscheid et al, 2005, 2008). L'IL-8, a la seva vegada, és capaç de disparar els nivells d'expressió d'HABP2 en cèl·lules endotelials del sistema microvascular del pulmó (Wygrecka et al, 2007). En aquest teixit, doncs, sembla existir algun mecanisme recíproc per mantenir un estat hemostàtic durant la inflamació.

Pel que fa al cas d'**RPS20**, es va aïllar una proteïna catiònica antimicrobiana del citosol de macròfags de ratolí activats per IFN, que es va designar com a ubiquicidina, i era altament similar a la proteïna ribosomal S30 (Hiemstra et al, 1999). Més tard aquesta proteïna també es va aïllar de la mucosa del còlon humana degut a la seva activitat antibacteriana, juntament amb la proteïna ribosomal L39 (Tollin et al, 2003). De l'epiteli del còlon humà també se'n va aïllar la proteïna ribosomal S19, que actuava com a quimioattractant de monòcits (Nishiura et al, 1996) i la proteïna ribosomal L30 (Howell et al, 2003).

El mucus epidèrmic d'espècies de peixos conté proteïnes i pèptids antimicrobians, importants en la immunitat innata. Un pèptid antibacterià que compartia similituds amb el fragment 40S de la proteïna ribosomal S30 es va aïllar del mucus epidèrmic de la truita irisada (Fernandes i Smith, 2002). En extractes de mucus epidèrmic de bacallà atlàntic (*Gadus morhua*) es va trobar activitat antimicrobiana contra *Bacillus megaterium*, *E. coli* i *Candida albicans*. Es van realitzar estudis que van permetre identificar, entre d'altres, tres proteïnes ribosomals de 60S, L40, L36A i L35 (Bergsson et al, 2005). Tots aquests resultats mostren que les proteïnes ribosomals, que desenvolupen múltiples funcions en la cèl·lula, tenen un paper específic en la immunitat.

Hem decidit continuar els estudis amb l'**F-lectina** fonamentalment per dos motius. En l'assaig de doble híbrid en llevat, a diferència de les altres proteïnes, on es van aïllar fragments de més o menys extensió, en l'F-lectina hem aïllat gairebé tot el domini C-terminal de la proteïna. L'estructura de l'F-lectina, com analitzarem posteriorment, conté dos dominis molt semblants que es repeteixen en tàndem, fet que ens va dur a suposar que el fragment identificat en l'assaig de doble híbrid podria presentar un plegament semblant a la proteïna nativa. D'altra banda, l'F-lectina presenta un motiu de poliasparagines en l'extrem C-terminal. Aquest motiu es troba també a la cua N-terminal de la seqüència de l'exó extra que presenta cALT2. S'ha descrit prèviament que els dominis rics en asparagines i glutamines poden formar cremalleres polars que permeten la formació d'agregats, i podrien estar implicats en la mediació de les interaccions entre proteïnes (Perutz et al, 2002).

Els peixos són la primera classe de vertebrats que posseeixen tant immunitat innata com adaptativa. Donat la limitada capacitat de la seva immunitat adaptativa de defensar-se dels patògens, la resposta de la immunitat innata és essencial per als peixos per lluitar contra les infeccions (Whyte, 2007; Magnadóttir, 2006). Els components de la immunitat innata són els pèptids antimicrobians, les molècules del complement, les citocines, els receptors de patrons de reconeixement (com ara els TLR) i els membres de la família de les lectines (Zhu et al, 2013).

Les lectines són proteïnes que es caracteritzen per tenir una estructura amb la presència de CRDs, i tenir la capacitat d'unir-se als carbohidrats terminals de glicoproteïnes i glicolípid. Són molècules de reconeixement de patrons importants en la immunitat innata (Yu et al, 2003). Poden establir interaccions amb microorganismes i iniciar la resposta immunitària, així com també fer tasques d'aglutinació, immobilització i opsonització de potencials patògens. La classificació de les lectines en famílies es duu a terme mitjançant l'especificitat d'unió als carbohidrats, els dominis estructurals i les propietats d'opsonització (Vasta et al, 2011).

La família de les F-lectines ha estat identificada més recentment. Els seus membres es caracteritzen per presentar un motiu CRD de seqüència d'aminoàcids únic, un plegament estructural nou, i l'especificitat per unir-se a molècules de L-fucosa (Vasta et al, 2012). Inicialment, es va descriure en anguila com a una aglutinina (AAA), i presentava una estructura tridimensional oligomèrica, amb una alta multiplicitat de formes, de fins a set isoformes. Tot i que es va aïllar en sèrum, l'AAA és d'origen hepàtic (Honda et al, 2000). Des de llavors, s'han descrit múltiples isoformes d'F-lectina en diverses espècies de peixos, incloent-hi el llobarro ratllat (Odom i Vasta, 2005), l'orada (Cammarata et al, 2007), el llobarro (Salerno et al, 2009), la tilapia del Nil (Argayosa i Lee, 2009) i la perca de riu japonesa (Qiu et al, 2011). Encara que la majoria d'estudis s'han realitzat en espècimens adults, l'F-lectina s'expressa també en larves i en teixit juvenil (Parisi et al, 2010).

Mentre que l'AAA exhibeix un únic CRD, la majoria de les F-lectines descrites en altres peixos contenen dos dominis CRD units en tàndem. Els dominis d'unió a carbohidrats N-CDR i C-CDR es troben en orientacions oposades, i tenen diferents afinitats per als sacàrids de fucosa (Bianchet et al, 2010; Qiu et al, 2010; Cammarata et al, 2012). La unió a fucosa descrita per a la lectina AAA està mediada per ponts d'hidrogen amb les cadenes del residu His⁵², Arg⁷⁹ i Arg⁸⁶, que emergeixen d'una butxaca superficial, i per forces de Van der Waals amb un pont disulfur inusual, format per dues cisteïnes contínues Cys⁸² i Cys⁸³, i una butxaca apolar formada pels residus His²⁷, Phe⁴⁵, Leu²³ i Tyr⁴⁶. En el cas de la seqüència de llobarro ratllat, on l'estructura consta de dos dominis de tipus F-lectina disposats en tàndem, s'observa que el domini N-

terminal és més similar a la seqüència d'AAA que no pas el domini C-terminal. Els residus que formen els enllaços per ponts d'hidrogen es troben conservats, així com el pont de cisteïnes en el domini N-terminal. Tot i que els residus que conformen la butxaca apolar no es troben conservats en cap dels dos dominis, el que s'observa és una butxaca de dimensions diferents, però amb propietats de polaritat similars (Vasta et al, 2012). L'F-lectina aïllada en aquesta tesi presenta una alta homologia amb les seqüències descrites per llobarro, llobarro blanc i llobarro ratllat. Els residus clau per a la unió a la fucosa es troben conservats, i corresponen als residus His⁶³, Arg⁹⁰, Arg⁹⁷, Cys⁹³, Cys⁹⁴ i Phe⁵⁶ per a la cadena N-terminal, i His²⁰⁹, Arg²³⁶, Arg²⁴² i Phe²⁰² per a la cadena C-terminal. Com en el cas de les F-lectines de llobarro, llobarro blanc i llobarro ratllat, tal com podem observar en els alineaments de les seqüències, el pont de cisteïnes es troba només en el domini N-terminal.

L'orientació oposada dels dos dominis, així com el fet que les butxaques d'unió a la fucosa presentin propietats diferenciades entre el domini N i C-terminal, dóna suport a la idea que les F-lectines en circulació poden ser capaces d'entrecreuar molècules fucosilades presents en diferents tipus de cèl·lules, i poden funcionar com a opsonines.

S'ha mostrat recentment que l'F-lectina mostra activitat enfront bacteris patògens (Salerno et al 2009, Cammarata et al, 2012), i que la seva expressió incrementa després de la injecció d'LPS (Qiu et al, 2011). Encara que el plegament d'F-lectina s'observa també en factors de coagulació i proteïnes d'adhesió de membrana, indicant un origen comú d'aquests sistemes (Kairies et al, 2001), l'F-lectina es troba restringida a les espècies que es recolzen en la resposta del sistema immunitari innat per lluitar contra les infeccions (Bianchet et al, 2010). Possiblement, l'F-lectina podria exercir un paper important suplint les funcions de proteïnes presents en organismes amb un sistema immunitari adaptatiu basat en immunoglobulines.

En *S. aurata*, l'F-lectina s'expressa principalment en fetge i, en menors quantitats, en teixit adipós i ronyó. Tant cALT1 com cALT2 es troben presents en el fetge, i també en major o menor mesura en gairebé tots els teixits. Aquesta distribució tissular suggereix que és possible la interacció de l'F-lectina amb les isoformes citosòliques d'ALT *in vivo*, ja que les proteïnes es troben als mateixos tipus cel·lulars.

Els nostres estudis de microscòpia confocal en cèl·lules SBL que expressen l'F-lectina i cALT1 o cALT2 d'orada, com a proteïnes de fusió fluorescents, mostren que els parells de cALT1 / F-lectina i cALT2 / F-lectina colocalitzen dins de la cèl·lula. A més, hem observat que la coexpressió tant de cALT1 com de cALT2 amb F-lectina promou un canvi, al menys de manera

parcial, en la localització subcel·lular de les dues isoformes citosòliques d'ALT, ja que canvien d'una localització citosòlica quan s'expressen soles, a un patró vesicular quan s'expressen amb F-lectina.

L'F-lectina té un pèptid senyal, predit computacionalment, que ajudaria a la proteïna a entrar a la via secretora. Aquest pèptid senyal permetria que l'F-lectina es detectés com una proteïna de secreció i sortís de l'ER com a càrrega secretora. El transport de la càrrega secretora va de l'ER a l'aparell de *cis*-Golgi, passa a través de l'aparell de Golgi a la TGN, d'on surt per formar una vesícula secretora (Lippincott-Schwartz et al, 2000; Bonifacino i Glick, 2004). Hem detectat la presència d'F-lectina en el compartiment *cis*-Golgi (colocalitza F-lectina amb GM130, una proteïna *cis*-Golgi), TGN i les vesícules de secreció immadures (colocalitza amb STX-6, una proteïna que està present en aquests compartiments). Aquest fet ens porta a hipotetitzar que l'F-lectina, com suggereixen els estudis *in silico*, és secretada per la cèl·lula. Aquest fet és també consistent amb la bibliografia, on l'F-lectina és aïllada a partir de sèrum (Honda et al, 2000; Odom i Vasta, 2005; Cammarata et al, 2007; Argayosa i Lee, 2009; Salerno et al, 2009). Els nostres estudis indiquen que les isoformes citosòliques d'ALT podrien interactuar amb l'F-lectina en algun moment abans del transport fins al compartiment *cis*-Golgi, i aquesta interacció promouria l'addició de cALT1 i cALT2 a la càrrega secretora. De fet, quan es coexpressen cALT1 i cALT2 amb l'F-lectina, es detecten en *cis*-Golgi, TGN i en vesícules de secreció immadures, colocalitzant amb l'F-lectina en aquests compartiments. La coexpressió de cALT1 o cALT2 juntament amb F-lectina fa que les isoformes d'ALT citosòliques aconseguixin entrar a la via secretora, tot i que el mecanisme encara es desconeix.

A més dels estudis de colocalització, es van realitzar assajos de FRET per demostrar que cALT1 i cALT2 interactuen amb F-lectina. Aquests estudis es van realitzar amb F-lectina fusionada al fluoròfor en les dues posicions terminals. Pel que fa a la proteïna en la seva localització nativa, els estudis són els realitzats amb el fluoròfor fusionat amb el domini C-terminal d'F-lectina, deixant el pèptid senyal lliure. S'ha observat una interacció molecular entre els parells cALT1 / F-lectina i cALT2 / F-lectina (fusionats als seus respectius fluoròfors), la qual cosa suggereix que les isoformes citosòliques d'ALT interactuen amb F-lectina. Es va observar una interacció encara més intensa quan el fluoròfor es va fusionar a la regió N-terminal d'F-lectina, deixant a la regió C-terminal d'F-lectina lliure per interactuar. Això és consistent amb el fet que el domini C-terminal d'F-lectina és potencialment el responsable de la interacció, ja que precisament aquest domini es va identificar en el cribratge de doble híbrid en llevats. El fet que ambdues

isoformes d'ALT, cALT1 i cALT2, interactuïn amb F-lectina indica que el motiu poliasparagina de cALT2 no és essencial per a la interacció amb F-lectina.

Tenint en compte la possibilitat que aquestes proteïnes puguin interaccionar en el fetge i en el mateix compartiment dins de la cèl·lula, vam investigar si F-lectina té la capacitat de modificar l'activitat de l'ALT. Els nostres estudis *in vitro* en cèl·lules SBL demostren que cALT1 i cALT2, quan se sobreexpressen juntament amb F-lectina, augmenten la seva activitat de manera significativa, suggerint que l'F-lectina regula l'activitat d'ambdues isoformes citosòliques d'ALT d'una manera similar. Els estudis realitzats mitjançant FRET recolzen la hipòtesi de que l'F-lectina modula l'activitat de cALT1 i cALT2 per interacció proteïna-proteïna.

S'ha descrit que en peixos el tractament intraperitoneal amb LPS activa la resposta inflamatòria (Sepucre et al, 2009), i promou l'expressió d'F-lectina (Cammarata et al, 2007; Qiu et al, 2011). En els nostres estudis hem injectat intraperitonealment *S. aurata* amb LPS del serotip O26: B6. Aquest serotip d'LPS conté fucosa al seu O-antigen (Stenutz et al, 2006), per assegurar-nos la detecció del monosacàrid per l'F-lectina. En el fetge de *S. aurata*, el tractament amb LPS dispara la resposta inflamatòria, com podem veure reflectit amb l'augment d'un component important en la via d'expressió de citoquines, IL-1b (Plouffe et al, 2005). Addicionalment, es va produir un augment en l'expressió d'F-lectina. L'activitat de l'ALT s'incrementa en el fetge, però els nivells d'mRNA de les isoformes d'ALT (tant citosòliques com també mitocondrial) no es veuen alterats, la qual cosa suggereix que l'augment en l'activitat d'ALT no és conseqüència d'un augment en l'expressió de les isoformes de l'enzim, sinó de la regulació posttraduccional com a possible conseqüència de la interacció d'F-lectina amb les isoformes citosòliques. Donat que el tractament amb LPS incrementa l'expressió d'F-lectina i aquesta és capaç d'augmentar l'activitat de l'ALT en els compartiments subcel·lulars on poden interactuar, pensem que l'augment d'activitat de l'ALT després de la injecció de LPS és a causa de l'efecte d'F-lectina sobre l'enzim.

El tractament d'orades amb LPS, a més de promoure un increment en l'activitat citosòlica d'ALT, modula els nivells de metabòlits i altres activitats enzimàtiques clau en el metabolisme intermediari. Aquest és el cas dels triglicèrids en sèrum, i dels enzims hepàtics G6PDH i 6-PGDH de la via de les pentoses fosfat. L'augment de la G6PDH també s'ha observat en adipòcits estimulats amb LPS, donat que aquesta via proporciona NADPH a les cèl·lules, un cofactor necessari en els processos antioxidants i senyals inflamatòries (Park et al, 2006). D'altra banda, l'augment dels triglicèrids en sèrum es produeix en rates després de l'administració de LPS fet que simula els efectes de la malaltia metabòlica produïda per una inflamació contínua (Wang

et al, 2014). La disminució de l'activitat PK en el fetge dels peixos tractats amb LPS es deu probablement a la inhibició al·lostèrica de l'activitat PK causada pel glutamat i l'alanina, els nivells dels quals podrien estar incrementats com a resultat de l'activació de les isoformes citosòliques de l'ALT (Fenton i Hutchinson, 2009). En aquest sentit, el nostre grup va observar prèviament que la inhibició de l'activitat ALT ciosòlica amb AOA comporta una disminució dels nivells hepàtics de glutamat i alanina en orada, promovent un increment de l'activitat PK en fetge (González et al, 2012).

L'F-lectina per si mateixa és capaç d'enllaçar residus de fucosa, un sucre que està present en l'O-antigen de l'LPS, i ésser la responsable de l'opsonització de bacteris (Argayosa i Lee, 2009) i de promoure la fagocitosi pels macròfags (Salerno et al, 2009), suggerint el paper de la lectina en la resposta de defensa immunitària. De tota manera, els mecanismes de transducció dels senyals no estan clars. La via de les lectines en el sistema immunitari innat es basa en la interacció de lectines amb els sacàrids que es troben a la superfície dels microbis per activar els enzims i el sistema del complement i, finalment, estimular la resposta inflamatòria (Boshra et al, 2006). En el cas de MBL, la lectina s'associa amb ficolina i amb els enzims MASP, que al seu torn activen el sistema del complement (Nakao et al, 2006). La proteïna efectora de l'F-lectina en la via de les lectines és encara desconeguda, però no podem descartar la possibilitat que l'ALT estigui implicada en aquesta via, ja que la interacció amb F-lectina augmentaria l'activitat específica en un entorn d'infecció.

Recentment, s'ha descrit una nova funció per a l'ALT, suggerint la seva potencial implicació en la fase aguda de resposta del sistema immunitari. L'ALT recombinant de la família dels *Amphioxus*, una espècie que es troba a mig camí entre els invertebrats i els vertebrats, té la capacitat d'unir-se als bacteris Gram-negatius a través de l'LPS de la paret bacteriana, i n'inhibeix el creixement causant una lisi cel·lular (Jing i Zhang, 2011). Estudis amb diferents isoformes d'ALT d'una gran varietat d'espècies, incloent mamífers, llevats i plantes, mostren que l'alt grau de conservació entre l'ALT i la regió d'unió a endotoxines de l'LBP correlaciona amb la capacitat dels homòlegs ALT per unir-se a l'LPS i inhibir el creixement d'*E. coli* (McAllister et al, 2013).

L'LPS, el component majoritari de la paret de bacteris Gram-negatius, activa de manera pobre el sistema immunitari quan segueix unit a la membrana (Kitchens et al, 1998). La proteïna LBP és una lípid transferasa encarregada de catalitzar la transferència de l'LPS de la paret bacteriana al CD14 (Schumann et al, 1990). LBP i CD14 catalitzen també el moviment de l'LPS directament a lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), on perd la seva activitat biològica i

mitjançant les quals serà excretat pel fetge (Wurfel et al, 1994; Kitchens et al, 2001). El processament i l'eliminació de l'LPS mediat per LBP i CD14 no sempre acaba amb la resposta immunitària a l'LPS. Aquesta és desencadenada per les molècules TLR4 i la proteïna de diferenciació mieloide 2 (MD-2) (Triantafilou i Triantafilou, 2002; Miyake, 2004). El TLR4 és una proteïna transmembrana encarregada d'impulsar la cascada de senyalització, tot i que requereix l'associació amb MD-2 per poder reconèixer l'LPS. Aquesta associació es fa a nivell de l'ER, on MD-2 permet la glicosilació de TLR4, que facilitarà que el complex arribi a la superfície cel·lular (Ohnishi et al, 2003).

En peixos, encara que el TLR4 no es trobi present en el genoma d'algunes espècies (Oshiumi et al, 2003; Jault et al, 2004), en els organismes on s'ha descrit, com ara en peix zebra, aquest no és capaç de reconèixer l'LPS. És més, en aquesta espècie, el TLR4 no promou l'activació de la cascada de senyalització, sinó que la inhibeix (Sepulcre et al, 2009). Diversos estudis de seqüenciació genòmica en peixos, indiquen que les molècules MD-2 i CD14 es troben absents (Iliev et al, 2005; Sepulcre et al, 2009; Pietrerri et al, 2013). Aquest fet podria explicar que vertebrats com els peixos i els amfibis, siguin més resistents als efectes tòxics de l'LPS (Berczi et al, 1966). En estudis amb leucòcits de diferents espècies de peixos, l'activació de les cèl·lules immunitàries es fa a concentracions d'LPS tres ordres de magnitud superiors als requerits per l'activació en mamífers (Stafford et al, 2003; Sepulcre et al, 2007; Zou et al, 2007). De tota manera, i donat que l'LPS té múltiples efectes biològics en peixos, encara que sigui a altes concentracions, és possible que l'LPS sigui reconegut per algun altre mecanisme (Sepulcre et al, 2009; Pietretti i Wiegertjes, 2014).

En l'estudi que es va realitzar per determinar la capacitat d'ALT de diferents espècies per unir-se a l'LPS (McAllister et al, 2013), es va detectar en els enzims ALT una regió homòloga a la regió d'unió a endotoxines de l'LBP (Wong et al, 2007). El grau d'homologia es relaciona directament amb l'efecte bactericida, suggerint que aquesta regió és la responsable de la seva activitat bactericida. En aquesta tesi, es va realitzar l'alineament múltiple de la seqüència de les ALT citosòliques d'orada amb l'ALT1, ALT2 i LBP humanes, i es va confirmar que hi ha un alt grau d'homologia amb la seqüència d'orada. En el cas dels aminoàcids de l'ALT humana detectats com a homòlegs amb la regió d'unió a endotoxines de l'LBP, el grau d'homologia entre les seqüències humana i d'orada és del 100 %. De manera consistent amb l'estudi *in silico*, es va voler comprovar la capacitat de l'ALT citosòlica d'orada per inhibir el creixement de bacteris. La incubació de cultius bacterians de la soca XL1-Blue d'*E. coli* amb extractes de cèl·lules que sobreexpressin cALT2 d'orada promou una inhibició del creixement bacterià. Per

tant, l'efecte d'inhibició del creixement suggerit per a les ALT de diferents espècies s'emula també en l'ALT d'orada.

Suggerim doncs que l'ALT citosòlica d'orada és capaç, per si mateixa, de detectar la presència d'LPS, unir-s'hi, i contribuir a una activitat antibacteriana per un mecanisme que encara desconeixem. Donat la seva homologia amb la seqüència d'unió a endotoxines de l'LBP humana, i el fet anteriorment mencionat que l'LBP com a tal no s'ha detectat en moltes espècies de peixos, considerem que les isoformes citosòliques de l'ALT d'orada podrien estar suplint les funcions d'LBP en els peixos com l'orada.

Els nivells d'expressió de l'F-lectina augmenten quan tractem els peixos amb LPS, simulant l'efecte d'una infecció bacteriana (Qiu et al, 2011). En el cas de l'orada, es va duplicar la seva expressió en fetge 24 hores després del tractament. En el cas de les isoformes d'ALT (ja no només les citosòliques, sinó també la mitocondrial), aquest efecte no es dona. No obstant, sí que podem veure efectes en l'activitat ALT just després del tractament. L'augment de l'activitat ALT que s'observa es pot atribuir als efectes que té la interacció de l'F-lectina amb les isoformes citosòliques d'ALT. Així, a part de promoure un augment en l'activitat ALT hepàtica, hem observat que la interacció entre cALT1 i cALT2 amb l'F-lectina indueix a què les isoformes d'ALT, que són citosòliques i no tenen cap pèptid senyal que els permeti entrar com a càrrega secretora, passin a formar part de vesícules de secreció. El mecanisme pel qual l'F-lectina arrossega les ALT citosòliques d'orada a la via secretora actualment el desconeixem, però podria ésser semblant al proposat en el cas de TLR4 i MD-2. La proteïna TLR4, un receptor de patrons de reconeixement, necessita ésser glicosilada per poder entrar a la via de secreció i situar-se a la membrana citoplasmàtica, on serà capaç d'exercir la seva funció. La proteïna MD-2 sembla ésser que permetria aquesta glicosilació (Ohnishi et al, 2003). De la mateixa manera, l'F-lectina podria estar promovent la glicosilació de les isoformes citosòliques d'ALT, fet que suposaria que l'ALT formés part de la càrrega secretora de la cèl·lula.

En aquest context, l'ALT alliberada, unida a l'F-lectina, seria capaç d'arribar als bacteris a través del torrent sanguini i l'espai intersticial, en part per la seva capacitat intrínseca d'unir-se a l'LPS, i en part guiada per l'F-lectina. De la mateixa manera, l'acció de l'ALT per inhibir el creixement bacterià es veuria incrementada, ja que la interacció amb l'F-lectina augmenta l'activitat ALT de manera significativa. Es tractaria doncs d'un efecte sinèrgic entre dues proteïnes amb propietats antibacterianes: unió a l'LPS, opsonització dels organismes bacterians i inhibició del creixement. El fet que hi hagi un mecanisme així, que podria ésser independent de la cascada

de resposta inflamatòria, podria explicar que es requereixin altes concentracions d'LPS per a la seva activació (Berczi et al, 1966).

Encara que el mecanisme proposat no es podria donar en humans, ja que l'F-lectina és una proteïna que es troba només en peixos i amfibis, hi ha altres proteïnes humanes que comparteixen propietats estructurals amb l'F-lectina, i que podrien estar mimetitzant-ne la funció (Kairies et al, 2001). D'aquesta manera, es podria explicar el fet que es trobin nivells d'ALT moderadament elevats en sèrum durant processos inflamatoris, sense que hi hagi una aparent destrucció hepàtica (Clark et al, 2003). La presència d'ALT en sèrum no seria per tant un efecte de l'alliberament del contingut citoplasmàtic causat per la destrucció de cèl·lules hepàtiques, sinó que seria promoguda per un mecanisme de secreció per part de les cèl·lules hepàtiques en resposta a la infecció.

No podem oblidar la importància del metabolisme en el sistema immunològic dels peixos. En aquest sentit, l'estat nutricional dels peixos és molt important, ja que modula la resistència a les infeccions. Els desequilibris en la dieta dels peixos poden causar disfuncions immunitàries, especialment visibles quan es realitzen substitucions en l'oferta d'aminoàcids (Kiron, 2012). De qualsevol manera, l'ALT no seria la primera proteïna metabòlica implicada en immunitat. L'apolipoproteïna A-I té activitat antibacteriana (Tada et al, 1993), i és produïda localment a la pell del peix com a part de la defensa innata (Concha et al, 2003).

Fins i tot en els estudis recents en humans està emergint l'immunometabolisme, així com l'augment de l'associació entre els trastorns metabòlics i els processos d'inflamació (Mathis i Shoelson, 2011). No és sorprenent que enzims clau com ALT juguin un doble paper en els sistemes de metabolisme i la immunitat. És més, no és trivial suggerir que l'ALT d'orada podria estar implicada en la regulació del sistema immunitari seguint diferents mecanismes. Tenint en compte les potencials interaccions d'ALT amb la resta de proteïnes identificades en l'estudi de doble híbrid en llevats (RPS20, RBP2 i HBP2), és possible fins i tot que estigui actuant no només unida a l'F-lectina, sinó formant un clúster amb més proteïnes.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. L'assaig de doble híbrid en llevat utilitzant cALT2 com a proteïna esquer i una biblioteca de cDNA de fetge d'orada com a presa ha permès fer la criba de 6.12×10^5 clons i l'aïllament de 8 colònies positives independents. La seqüenciació dels fragments nucleotídics corresponents a les 8 colònies positives, va permetre identificar els fragments de quatre proteïnes amb potencialitat d'interacció amb cALT2, que corresponen a l'F-lectina, RPS20, RBP2 i HABP2. Addicionalment, es va obtenir un fragment de 90 nucleòtids que no vam poder identificar. Mitjançant RACE-PCR s'ha completat la clonació de les seqüències codificants de les proteïnes F-lectina, RPS20, RBP2 i HABP2 d'orada, que presenten 312 aa, 119 aa, 135 aa i 628 aa, respectivament.
2. L'F-lectina d'orada presenta alta homologia amb les seqüències prèviament descrites de llobarro, llobarro blanc i llobarro ratllat, la qual cosa ha permès predir l'estructura terciària de la proteïna. El fragment aïllat mitjançant l'assaig de doble híbrid en llevat correspon a tot el domini C-terminal de la proteïna. Els aminoàcids importants en la interacció de l'F-lectina amb la fucosa es troben conservats respecte les seqüències descrites anteriorment, i s'han predit per homologia els dominis d'unió a carbohidrats.
3. La seqüència de l'F-lectina conté un pèptid senyal de secreció predit computacionalment en els primers 18 aa.
4. La proteïna resultant de la fusió d'F-lectina amb el fluoròfor DsRedmon unit a l'extrem C-terminal presenta una localització subcel·lular en forma de vesícules al voltant del nucli i disperses pel citoplasma. La proteïna de fusió quan se sobreexpressa en cèl·lules SBL colocalitza amb un marcador de *cis*-Golgi (GM130), i quan se sobreexpressa en cèl·lules 293A colocalitza amb un marcador de *trans*-Golgi i vesícules de secreció (STX-6). Les proteïnes de fusió de les isoformes citosòliques d'ALT amb el fluoròfor fusionat a l'extrem C-terminal de la proteïna es visualitzen difoses per tot el citoplasma, i no colocalitzen amb els marcadors de l'aparell de Golgi ni de vesícules de secreció en els tipus cel·lulars SBL i 293A, respectivament.
5. L'expressió conjunta en cèl·lules SBL de les proteïnes de fusió, construïdes a partir de les isoformes citosòliques de l'ALT d'orada unides al fluoròfor EGFP i la proteïna de fusió de l'F-lectina unida al fluoròfor DsRedmon a la posició C-terminal, mostra la formació de vesícules perinuclears de gran mida. Les proteïnes de fusió colocalitzen amb els

marcadors de *cis*-Golgi (GM130) i de vesícules de secreció (STX-6) quan se sobreexpressen en cèl·lules SBL i 293A, respectivament.

6. Mitjançant estudis de FRET s'ha detectat la interacció entre les proteïnes de fusió d'F-lectina amb el fluoròfor DsRedmon i de cALT1 i cALT2 amb el fluoròfor EGFP. Els valors d'eficiència de la interacció, en el cas de fusionar DsRedmon a la posició C-terminal de l'F-lectina, són per a les parelles F-lectina-cALT1 i F-lectina-cALT2 del 12 % i 8 %, respectivament. Els valors passen a ésser del 18 i 14 %, respectivament, quan el fluoròfor DsRedmon es fusiona a la posició N-terminal de l'F-lectina. El fet de deixar el domini C-terminal lliure comporta un augment en l'eficiència de la interacció.
7. La sobreexpressió de les proteïnes cALT1 o cALT2 conjuntament amb F-lectina en cèl·lules SBL promou un increment de l'activitat ALT de tres vegades en el cas de cALT1, i de gairebé dues vegades en el cas de cALT2, respecte l'expressió de cALT1 i cALT2 en absència d'F-lectina.
8. L'F-lectina s'expressa majoritàriament en el fetge d'orada. Els nivells d'expressió en teixit adipós i ronyó són baixos, i en la resta de teixits són pràcticament indetectables.
9. L'administració intraperitoneal d'1 mg/kg d'LPS promou un increment de l'expressió d'F-lectina i IL-1b en el fetge d'orades 24 hores després del tractament. El tractament amb LPS augmenta l'activitat ALT hepàtica sense que es vegin afectats els nivells d'mRNA de cALT1, cALT2 i mALT.
10. L'administració d'1 mg/kg d'LPS promou un augment dels triglicèrids en el sèrum d'orada 24 hores després del tractament. També s'observa un lleuger descens en l'activitat de l'enzim glicolític PK, i un augment de les activitats dels enzims 6-PGDH i G6PDH de la via de les pentoses fosfat en els extractes de fetge de les orades sotmeses al tractament.
11. Les isoformes cALT1 i cALT2 d'orada presenten un elevat grau de conservació dels residus implicats en la unió a endotoxines descrits per la proteïna amb propietats antibacterianes LBP humana.
12. La incubació de bacteris *E. coli* de la soca XL1-Blue amb extractes de cèl·lules SBL que sobreexpressen cALT2, F-lectina i cALT2 conjuntament amb F-lectina promou, en els tres casos, una inhibició del creixement de colònies bacterianes.

REFERÈNCIES

7. REFERÈNCIES

A

Adibi P, Sadeghi M, Mahsa M, Rozati G, Mohseni M. Prediction of coronary atherosclerotic disease with liver transaminase level. *Liver International*. **2007**;27(7):895-900.

Alexis MN, Papaparaskeva-Papoutsoglou E. Aminotransferase activity in the liver and white muscle of *Mugil capito* fed diets containing different levels of protein and carbohydrate. *Comp Biochem Physiol B*. **1986**;83(1):245-9.

Anderson PM, Broderius MA, Fong KC, Tsui KN, Chew SF, Ip YK. Glutamine synthetase expression in liver, muscle, stomach and intestine of *Bostrichthys sinensis* in response to exposure to a high exogenous ammonia concentration. *J Exp Biol*. **2002** Jul;205(Pt 14):2053-65.

Andoh T, Nagasawa H. Stimulation of insulin secretion by amino acids in starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst.* **1998**;62,107-113.

Andoh T. Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *Gen Comp Endocrinol*. **2007** May 1;151(3):308-17.

Anemaet IG, González JD, Salgado MC, Giralt M, Fernández F, Baanante IV, Metón I. Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol*. **2010** Sep;45(3):119-32.

Anemaet IG, Metón I, Salgado MC, Fernández F, Baanante IV. A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *Int J Biochem Cell Biol*. **2008**;40(12):2833-44.

Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F, Hauri HP. The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol*. **1999** Oct;1(6):330-4.

Argayosa AM, Lee YC. Identification of (L)-fucose-binding proteins from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) serum. *Fish Shellfish Immunol*. **2009** Sep;27(3):478-85.

Aridor M, Weissman J, Bannykh S, Nuoffer C, Balch WE. Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol*. **1998** Apr 6;141(1):61-70.

Arion WJ, Lange AJ, Walls HE, Ballas LM. Evidence for the participation of independent translocation for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with orthophosphate, inorganic pyrophosphate, and carbamyl phosphate. *J Biol Chem*. **1980** Nov 10;255(21):10396-406.

Atherton WD, Aitken A. Growth, nitrogen metabolism and fat metabolism in *Salmo gairdneri*, rich. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **1970**;36(4):719-747.

Auerswald L, Jurss K, Schiedek D, Bastrop R. The Influence of Salinity Acclimation on Free Amino Acids and Enzyme Activities in the Intestinal Mucosa of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Comp. Biochem. Physiol. A*. **1997**;116(2):149-155.

B

Baanante IV, García de Frutos P, Bonamusa L, Fernández F. Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P2 and PFK-2. *Comp Biochem Physiol B*. **1991**;100(1):11-17.

Ballantyne J. Amino acid metabolism. In: *Fish Physiology, Vol. 20, Nitrogen Excretion* (Wright PA, Anderson PM eds.) New York Academic Press. **2001**:77-107.

Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem*. **1994**;45:89-151.

Bannykh SI, Balch WE. Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *J Cell Biol*. **1997** Jul 14;138(1):1-4.

Baños N, Baró J, Castejón C, Navarro I, Gutiérrez J. Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regul Pept*. **1998** Oct 16;77(1-3):55-62.

Bao B, Peatman E, Li P, He C, Liu Z. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection. *Dev Comp Immunol*. **2005**;29(11):939-50.

Baoprasertkul P, Xu P, Peatman E, Kucuktas H, Liu Z. Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21. *Fish Shellfish Immunol*. **2007** Dec;23(6):1218-30.

Bardella MT, Fraquelli M, Quatrini M, Molteni N, Bianchi P, Conte D. Prevalence of hypertransaminasemia in adult celiac patients and effect of gluten-free diet. *Hepatology*. **1995**;22(3):833-836.

Barlowe C, d'Enfert C, Schekman R. Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. **1993** Jan 15;268(2):873-9.

Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*. **1994** Jun 17;77(6):895-907.

Barr FA, Short B. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*. **2003** Aug;15(4):405-13.

Beamish FWH, Thomas, E. Effects of dietary protein and lipid on nitrogen losses in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*. **1984**;41(4):359-371.

Beckers CJ, Block MR, Glick BS, Rothman JE, Balch WE. Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature*. **1989** Jun 1;339(6223):397-8.

Bednarek SY, Ravazzola M, Hosobuchi M, Amherdt M, Perrelet A, Schekman R, Orci L. COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell*. **1995** Dec 29;83(7):1183-96.

Begum NA, Datta AG. Effect of adrenergic agonists and antagonists on alanine amino transferase, fructose-1:6-bisphosphatase and glucose production in hepatocytes. *Mol Cell Biochem*. **1992** Aug 18;113(2):93-103.

Begum NA, Datta AG. Effect of glucagon and some other alpha and beta adrenergic agonists and antagonists on alanine amino transferase of perfused rat liver. *Mol Cell Biochem*. **1991** Jun 26;105(1):7-13.

Beránek M, Drsata J, Palicka V. Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. *Mol Cell Biochem*. **2001** Feb;218(1-2):35-9.

- Berczi I, Bertók L, Bereznaï T. Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can J Microbiol.* **1966** Oct;12(5):1070-1.
- Bergot F, Breque J. Digestibility of starch by rainbow trout: Effects of the physical state of starch and of the intake level. *Aquaculture.* **1983**;34(3-4):203-212.
- Bergot F. Carbohydrate in rainbow trout diets: Effects of the level and source of carbohydrate and the number of meals on growth and body composition. *Aquaculture.* **1979**;18(2):157-167.
- Bergsson G, Agerberth B, Jörnvall H, Gudmundsson GH. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *FEBS J.* **2005** Oct;272(19):4960-9.
- Bergsson G, Agerberth B, Jörnvall H, Gudmundsson GH. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *FEBS J.* **2005** Oct;272(19):4960-9.
- Bever K, Chenoweth M, Dunn A. Amino acid gluconeogenesis and glucose turnover in kelp bass (*Paralabrax sp.*). *Am J Physiol.* **1981** Mar;240(3):R246-52.
- Bi X, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature.* **2002** Sep 19;419(6904):271-7.
- Bianchet MA, Odom EW, Vasta GR, Amzel LM. Structure and specificity of a binary tandem domain F-lectin from striped bass (*Morone saxatilis*). *J Mol Biol.* **2010** Aug 13;401(2):239-52.
- Bibiano Melo JF, Lundstedt LM, Metón I, Baanante IV, Moraes G. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **2006** Oct;145(2):181-7.
- Bird S, Zou J, Kono T, Sakai M, Dijkstra JM, Secombes C. Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by synteny. *Immunogenetics.* **2005a** Mar;56(12):909-23.
- Bird S, Zou J, Savan R, Kono T, Sakai M, Woo J, Secombes C. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *Dev Comp Immunol.* **2005b**;29(9):775-89.
- Bo J, Cai L, Xu JH, Wang KJ, Au DW. The marine medaka *Oryzias melastigma*--a potential marine fish model for innate immune study. *Mar Pollut Bull.* **2011**;63(5-12):267-76.
- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature.* **2001** Feb 15;409(6822):839-41.
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol.* **2001** Oct-Dec;25(8-9):853-73.
- Bonamusa L, García de Frutos P, Fernández F, Baanante IV. Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Mol Mar Biol Biotechnol.* **1992**;1:113-125.
- Bonifacino JS, Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* **2004** Jan 23;116(2):153-66.
- Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2003** May;4(5):409-14.
- Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.* **2003**;72:395-447.

- Boshra H, Li J, Sunyer JO. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **2006** Feb;20(2):239-62.
- Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, Telfer T, Lorenzen K, Little D, Ross L, Handisyde N, Gatward I, Corner R. Aquaculture: global status and trends. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **2010** Sep 27;365(1554):2897-912.
- Braunstein AE. Principal ways of assimilation & dissimilation of nitrogen in animals. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* **1957**;19:335-89.
- Brenden RA, Huizinga HW. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases.* **1986**; 9(2):163-167.
- Brown AJ, Voelker RA. Genetic and biochemical studies on glutamate-pyruvate transaminase from *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet.* **1980** Apr;18(3-4):303-9.
- Brown JR, Cameron JN. The induction of specific dynamic action in channel catfish by infusion of essential amino acids. *Physiol Zool.* **1991**;64(1): 276.
- Buck LT, Brill RW, Hochachka, PW. Gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Can. J. Zool.* **1992**;70:1254–1257.
- Bucking C, Wood CM. The alkaline tide and ammonia excretion after voluntary feeding in freshwater rainbow trout. *J Exp Biol.* **2008** Aug;211(Pt 15):2533-41.

C

- Caballero-Solares A, Viegas I, Salgado MC, Siles AM, Sáez A, Metón I, Baanante IV, Fernández F. Diets supplemented with glutamate or glutamine improve protein retention and modulate gene expression of key enzymes of hepatic metabolism in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture.* **2015**;444:79-87.
- Cameron MC, Denovan-Wright EM, Sharma MK, Wright JM. Cellular retinol-binding protein type II (CRBP II) in adult zebrafish (*Danio rerio*). cDNA sequence, tissue-specific expression and gene linkage analysis. *Eur J Biochem.* **2002** Sep;269(18):4685-92.
- Cammarata M, Benenati G, Odom EW, Salerno G, Vizzini A, Vasta GR, Parrinello N. Isolation and characterization of a fish F-type lectin from gilt head bream (*Sparus aurata*) serum. *Biochim Biophys Acta.* **2007** Jan;1770(1):150-5.
- Cammarata M, Salerno G, Parisi MG, Benenati G, Vizzini A, Vasta GR, Parrinello N. Primary structure and opsonic activity of an F-lectin from serum of the gilt head bream *Sparus aurata* (Pisces, Sparidae). *Italian Journal of Zoology.* **2012**, 79(1):34-43.
- Campbell JW, Aster PL, Vorhaben JE. Mitochondrial ammoniogenesis in liver of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Am J Physiol.* **1983** May;244(5):R709-17.
- Capilla E, Díaz M, Albalat A, Navarro I, Pessin JE, Keller K, Planas JV. Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2004** Aug;287(2):E348-57.
- Capilla E, Díaz M, Gutiérrez J, Planas JV. Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2002** Jul;283(1):E44-9.
- Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity.* **2012** Aug 24;37(2):199-207.

- Carter CG, He ZY, Houlihan DF, McCarthy ID, Davidson I. Effect of feeding on the tissue free amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Fish Physiol Biochem.* **1995** Apr;14(2):153-64.
- Carvalho CVA, Bianchini A, Tesser MB, Sampaio LA. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquaculture Research.* **2010**;41(4): 511-518.
- Caseras A, Metón I, Fernández F, Baanante IV. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim Biophys Acta.* **2000** Sep 7;1493(1-2):135-41.
- Caseras A, Metón I, Vives C, Egea M, Fernández F, Baanante IV. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr.* **2002** Dec;88(6):607-14.
- Castellana B, Iliiev DB, Sepulcre MP, MacKenzie S, Goetz FW, Mulero V, Planas JV. Molecular characterization of interleukin-6 in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol Immunol.* **2008** Jul;45(12):3363-70.
- Chang M, Collet B, Nie P, Lester K, Campbell S, Secombes CJ, Zou J. Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Virol.* **2011** Aug;85(16):8403-12.
- Chen CH, Huang MH, Yang JC, Nien CK, Yang CC, Yeh YH, Yueh SK. Prevalence and etiology of elevated serum alanine aminotransferase level in an adult population in Taiwan. *Journal of gastroenterology and hepatology.* **2007**;22(9):1482-1489.
- Chen SL, Li W, Meng L, Sha ZX, Wang ZJ, Ren GC. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.* **2007** Mar;22(3):172-81.
- Chen YA, Scheller RH. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2001** Feb;2(2):98-106.
- Cheung PY, Fong CC, Ng KT, Lam WC, Leung YC, Tsang CW, Yang M, Wong MS. Interaction between pyridoxal kinase and pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes. *J Biochem.* **2003** Nov;134(5):731-8.
- Cho CY, Bureau DP. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research.* **2001**;32(s1):349-360.
- Choi-Miura NH, Tobe T, Sumiya J, Nakano Y, Sano Y, Mazda T, Tomita M. Purification and characterization of a novel hyaluronan-binding protein (PHBP) from human plasma: it has three EGF, a kringle and a serine protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator. *J Biochem.* **1996** Jun;119(6):1157-65.
- Christiansen DC, Klungsoyr L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp Biochem Physiol B.* **1987**;88(3):701-11.
- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *The American journal of gastroenterology.* **2003**;98(5):960-967.
- Clary DO, Griff IC, Rothman JE. SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell.* **1990** May 18;61(4):709-21.
- Cohen DE, Anania FA, Chalasani N. An assessment of statin safety by hepatologists. *The American journal of cardiology.* **2006**;97(8):S77-S81.
- Cole AM, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem.* **1997** May 2;272(18):12008-13.

Cole DW, Cole R, Gaydos SJ, Gray J, Hyland G, Jacques ML, Powell-Dunford N, Sawhney C, Au WW. Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *Int J Hyg Environ Health*. **2009** Jul;212(4):369-77.

Collie NL, Ferraris RP. Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Volume 4, Metabolic Biochemistry* (Hochachka PW, Mommsen TP, eds.). Elsevier Science, Amsterdam. **1995**:221-239.

Concha MI, Molina S, Oyarzún C, Villanueva J, Amthauer R. Local expression of apolipoprotein A-I gene and a possible role for HDL in primary defence in the carp skin. *Fish Shellfish Immunol*. **2003** Mar;14(3):259-73.

Couto A, Enes P, Peres H, Oliva-Teles A. Effect of water temperature and dietary starch on growth and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2008** Sep;151(1):45-50.

Cowey CB, Knox D, Walton MJ, Adron JW. The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr*. **1977** Nov;38(3):463-70.

Cowey CB, Luquet P. Physiological basis of protein requirements of fishes. Critical analysis of allowances. In: *IVth Int. Symp. on Protein Metabolism and Nutrition* (INRA, ed.). Clermont-Ferrand (France), INRA publ. **1983**:365-384.

Cowey CB, Walton MJ. Intermediary metabolism. In: *Fish Nutrition* (Halver JE, Hardy RW, eds.). Elsevier Science, USA. **1989**:259-329.

D

Dabrowski K, Leray C, Nonnotte G, Colin DA. Protein digestion and ion concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Rich.) digestive tract in sea- and fresh water. *Comp. Biochem. Physiol*. **1986**;83(1):27-39.

Dabrowsky K, Guderley H. Intermediary Metabolism. In: *Fish Nutrition* (Halver JE, Hardy RW, eds.). Elsevier Science, USA. **2002**:309-365.

Dave G, Johansson-Sjöbeck ML, Larsson A, Lewander K, Lidman U. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. **1975** Nov 1;52(3):423-30.

De Rosa G, Burk TL, Swick RW. Isolation and characterization of mitochondrial alanine aminotransferase from porcine tissue. *Biochim Biophys Acta*. **1979** Mar 16;567(1):116-24.

DeAngelis RA, Markiewski MM, Lambris JD. Liver regeneration: a link to inflammation through complement. *Adv Exp Med Biol*. **2006**;586:17-34.

DeRosa G, Swick RW. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem*. **1975** Oct 25;250(20):7961-7.

DeVries ME, Ran L, Kelvin DJ. On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin Immunol*. **1999** Apr;11(2):95-104.

Díaz M, Antonescu CN, Capilla E, Klip A, Planas JV. Fish glucose transporter (GLUT)-4 differs from rat GLUT4 in its traffic characteristics but can translocate to the cell surface in response to insulin in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. **2007** Nov;148(11):5248-57.

Diaz R, Mayorga LS, Weidman PJ, Rothman JE, Stahl PD. Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature*. **1989** Jun 1;339(6223):398-400.

Dietrich LE, Boeddinghaus C, LaGrassa TJ, Ungermann C. Control of eukaryotic membrane fusion by N-terminal domains of SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta*. **2003** Aug 18;1641(2-3):111-9.

Dixon B, Stet RJ. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev Comp Immunol*. **2001** Oct-Dec;25(8-9):683-99.

Drakenberg K, Sara VR, Falkmer S, Gammeltoft S, Maake C, Reinecke M. Identification of IGF-1 receptors in primitive vertebrates. *Regul Pept*. **1993** Jan 22;43(1-2):73-81.

Duff SM, Rydel TJ, McClerren AL, Zhang W, Li JY, Sturman EJ, Halls C, Chen S, Zeng J, Peng J, Kretzler CN, Evdokimov A. The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure. *Arch Biochem Biophys*. **2012** Dec 1;528(1):90-101.

E

Egea M, Metón I, Baanante IV. Sp1 and Sp3 regulate glucokinase gene transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Mol Endocrinol*. **2007** Apr;38(4):481-92.

Egea M, Metón I, Córdoba M, Fernández F, Baanante IV. Role of Sp1 and SREBP-1a in the insulin-mediated regulation of glucokinase transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol*. **2008** Jan 15;155(2):359-67.

Eisenächer K, Krug A. Regulation of RLR-mediated innate immune signaling--it is all about keeping the balance. *Eur J Cell Biol*. **2012** Jan;91(1):36-47.

Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol*. **2001** Oct-Dec;25(8-9):827-39.

Emdin M, Passino C, Michelassi C, Donato L, Pompella A, Paolicchi A. Additive prognostic value of gamma-glutamyltransferase in coronary artery disease. *International journal of cardiology*. **2009**;136(1):80-85.

Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2006** Jan;143(1):89-96.

Enes P, Peres H, Couto A, Oliva-Teles A. Growth performance and metabolic utilization of diets including starch, dextrin, maltose or glucose as carbohydrate source by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Physiol Biochem*. **2010** Dec;36(4):903-10.

Enes P, Peres H, Sanchez-Gurmaches J, Navarro I, Gutiérrez J, Oliva-Teles A. Insulin and IGF-I response to a glucose load in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*. **2011**;315: 321-326.

Etscheid M, Beer N, Dodt J. The hyaluronan-binding protease upregulates ERK1/2 and PI3K/Akt signalling pathways in fibroblasts and stimulates cell proliferation and migration. *Cell Signal*. **2005** Dec;17(12):1486-94.

Etscheid M, Kress J, Seitz R, Dodt J. The hyaluronic acid-binding protease: a novel vascular and inflammatory mediator? *Int Immunopharmacol*. **2008** Feb;8(2):166-70.

F

Fabbi A, Lenzi M. Non-invasive markers of inflammation in autoimmune hepatitis. *Liver International*. **2013**;33(9):1295-1297.

- Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. In: *Seminars in liver disease*. **2001**:15-22.
- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. **1996** Apr 5;272(5258):50-3.
- Felig P. The glucose-alanine cycle. *Metabolism*. **1973** Feb;22(2):179-207.
- Fenton AW, Hutchinson M. The pH dependence of the allosteric response of human liver pyruvate kinase to fructose-1,6-bisphosphate, ATP, and alanine. *Arch Biochem Biophys*. **2009** Apr 1;484(1):16-23.
- Fernandes JM, Smith VJ. A novel antimicrobial function for a ribosomal peptide from rainbow trout skin. *Biochem Biophys Res Commun*. **2002** Aug 9;296(1):167-71.
- Fernandes JM, Smith VJ. A novel antimicrobial function for a ribosomal peptide from rainbow trout skin. *Biochem Biophys Res Commun*. **2002** Aug 9;296(1):167-71.
- Fernández F, Miquel AG, Córdoba M, Varas M, Meton I, Caseras A, Baanante IV. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J Exp Mar Biol Ecol*. **2007**;343(1):1-10.
- Fernández F, Miquel AG, Cumplido LR, Guinea J, Ros E. Comparisons of faecal collection methods for digestibility determinations in gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology*. **1996**;49:735-738.
- Fernández F, Miquel AG, Guinea J, Martínez R. Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the effect of diet composition and ration size. *Aquaculture*. **1998**;166(1-2):67-84.
- Ferraris RP, Ahearn GA. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol Part A*. **1984**;77(3):397-413.
- Fideu MD, Soler G, Ruiz-Amil M. Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp Biochem Physiol B*. **1983**;74(4):795-9.
- Figueiredo-Silva AC, Corraze G, Kaushik S, Peleteiro JB, Valente LM. Modulation of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) intermediary metabolic pathways by dispensable amino acids. *Amino Acids*. **2010** Nov;39(5):1401-16.
- Ford I, Mooijaart SP, Lloyd S, Murray HM, Westendorp RG, de Craen AJ, Packard CJ, Buckley B, Barlow C, Preiss D. The inverse relationship between alanine aminotransferase in the normal range and adverse cardiovascular and non-cardiovascular outcomes. *International journal of epidemiology*. **2011**;40(6):1530-1538.
- Forn-Cuní G, Reis ES, Dios S, Posada D, Lambris JD, Figueras A, Novoa B. The evolution and appearance of C3 duplications in fish originate an exclusive teleost c3 gene form with anti-inflammatory activity. *PLoS One*. **2014** Jun 13;9(6):e99673.
- French CJ, Mommsen TP, Hochachka PW. Amino acid utilisation in isolated hepatocytes from rainbow trout. *Eur J Biochem*. 1981 Jan;113(2):311-7.
- Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol*. **2000** Apr;10(3):229-42.
- Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. **2002** May;2(5):346-53.
- Furné M, Morales AE, Trenzado CE, García-Gallego M, Carmen Hidalgo M, Domezain A, Sanz Rus A. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *J Comp Physiol B*. **2012** Jan;182(1):63-76.

Furuichi M, Yone Y. Change of Blood Sugar and Plasma Insulin Levels of Fishes in Glucose Tolerance Test. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **1981**;47(6):761-764.

Furuichi M, Yone Y. Effect of Dietary Dextrin Levels on the Growth and Feed Efficiency, the Chemical Composition of Liver and Dorsal Muscle, and the Absorption of Dietary Protein and Dextrin in Fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **1980**; 46(2):225-229.

Furuichi M, Yone Y. Effect of insulin on blood sugar levels of fishes. *Bull jpn Soc Sci fish*. **1982**;48:1289-1291.

Fynn-Aikins K, Hughes SG, Vanderberg GW. Protein utilization and liver aminotransferase activity in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comp. Bioch. Physiol*. **1995**,111A:163-170.

G

García de Frutos P, Bonamusa L, Baanante IV. Metabolic changes in fish liver during the starved-to-fed transition. *Comp Biochem Physiol A*. **1991**;98(2):329-331.

García de Frutos P, Bonamusa L, Fernández F, Baanante IV. Fructose 2,6-bisphosphate in liver of *Sparus aurata*: influence of nutritional state. *Comp Biochem Physiol B*. **1990**;96(1):63-5.

García-Campusano F, Anaya VH, Robledo-Arratia L, Quezada H, Hernández H, Riego L, González A. ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol*. **2009** Apr;55(4):368-74.

García-Castillo J, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics*. **2002** Jun;54(3):200-7.

Georgopoulos GB; Conides A J. Study on the effects of dietary starch on growth, food conversion and digestibility of adult gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Journal of Aquaculture in the Tropics*. **1999**;142:143-152.

Gerlier D, Lyles DS. Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: towards a rational model. *Microbiol Mol Biol Rev*. **2011** Sep;75(3):468-90.

Gerst JE. SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim Biophys Acta*. **2003** Aug 18;1641(2-3):99-110.

Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian medical association journal*. **2005**;172(3):367-379.

Glick BS, Rothman JE. Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature*. **1987** Mar 19-25;326(6110):309-12.

Glinghammar B, Rafter I, Lindström AK, Hedberg JJ, Andersson HB, Lindblom P, Berg AL, Cotgreave I. Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med*. **2009** May;23(5):621-31.

Goel C, Barat A, Pande V, Sahoo PK. Molecular cloning and characterization of mannose binding lectin homologue from snow trout (*Schizothorax richardsonii*). *Protein J*. **2015** Feb;34(1):1-8.

Goessling W, Massaro JM, Vasan RS, D'Agostino Sr RB, Ellison RC, Fox CS. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology*. **2008**;135(6):1935.

Gómez-Milán E, Cardenete G, Sánchez-Muros MJ. Annual variations in the specific activity of fructose 1,6-bisphosphatase, alanine aminotransferase and pyruvate kinase in the *Sparus aurata* liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **2007** May;147(1):49-55.

González JD, Caballero A, Viegas I, Metón I, Jones JG, Barra J, Fernández F, Baanante IV. Effects of alanine aminotransferase inhibition on the intermediary metabolism in *Sparus aurata* through dietary amino-oxyacetate supplementation. *Br J Nutr*. **2012** Jun;107(12):1747-56.

González JD, Silva-Marrero JI, Metón I, Caballero-Solares A, Viegas I, Fernández F, Miñarro M, Fàbregas A, Ticó JR, Jones JG, Baanante IV. Chitosan-Mediated shRNA Knockdown of Cytosolic Alanine Aminotransferase Improves Hepatic Carbohydrate Metabolism. *Mar Biotechnol (NY)*. **2015** Oct 16. [Epub ahead of print]

Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong EG, Fisch S, Haldar S, Cline GW, Kim JK, Peroni OD, Kahn BB, Jain MK. Regulation of gluconeogenesis by Krüppel-like factor 15. *Cell Metab*. **2007** Apr;5(4):305-12.

Gros P, Milder FJ, Janssen BJ. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*. **2008** Jan;8(1):48-58.

Guerin-Ancey, O. Étude expérimentale de l'excretion azotée du bar (*Dicentrarchus labrax*) en cours de croissance. II. Effets du jeune sur l'excretion d'ammoniac et d'urée. *Aquaculture*. **1976**;9:187-194.

Gunji T, Matsushashi N, Sato H, Iijima K, Fujibayashi K, Okumura M, Sasabe N, Urabe A. Risk factors for serum alanine aminotransferase elevation: A cross-sectional study of healthy adult males in Tokyo, Japan. *Digestive and Liver Disease*. **2010**;42(12):882-887.

Gupta GS. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. Springer Science & Business Media. **2012**.

Gutiérrez J, Asgård T, Fabbri E, Plisetskaya EM. Insulin-receptor binding in skeletal muscle of trout. *Fish Physiol Biochem*. **1991** Dec;9(4):351-60.

Gutiérrez J, Párrizas M, Carneiro N, Maestro JL, Maestro MA, Planas J. Insulin and IGF-I receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries: changes with reproductive cycle. *Fish Physiol Biochem*. **1993** Jul;11(1-6):247-54.

Gutiérrez J, Plisetskaya EM. Insulin binding to liver plasma membranes of coho salmon during smoltification. *Gen Comp Endocrinol*. **1991** Jun;82(3):466-75.

H

Hall JR, MacCormack TJ, Barry CA, Driedzic WR. Sequence and expression of a constitutive, facilitated glucose transporter (GLUT1) in Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Exp Biol*. **2004** Dec;207(Pt 26):4697-706.

Hall JR, Richards RC, MacCormack TJ, Ewart KV, Driedzic WR. Cloning of GLUT3 cDNA from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and expression of GLUT1 and GLUT3 in response to hypoxia. *Biochim Biophys Acta*. **2005** Sep 25;1730(3):245-52.

Hall JR, Short CE, Driedzic WR. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: Developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *J Exp Biol*. **2006** Nov;209(Pt 22):4490-502.

Hammond C, Helenius A. Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol*. **1995** Aug;7(4):523-9.

Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*. **1997** Aug 8;90(3):523-35.

Helenius A, Marquardt T, Braakman I. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol*. **1992** Aug;2(8):227-31.

Hemre GI, Lie O, Sundby A. Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*): metabolic responses to feeding and fasting. *Fish Physiol Biochem*. **1993** Apr;10(6):455-63.

Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*. **2002**;8:175-194.

Hickling DR, March BE. A comparative study of trout and chicks regarding dietary effects on glycogen concentration in liver and muscle during feeding and subsequent to feed withdrawal. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. **1982**;72(1):115-23.

Hiemstra PS, van den Barselaar MT, Roest M, Nibbering PH, van Furth R. Ubiquicidin, a novel murine microbicidal protein present in the cytosolic fraction of macrophages. *J Leukoc Biol*. **1999** Sep;66(3):423-8.

Hillestad M, Johnsen F. High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. *Aquaculture*. **1994**;124(1-4):109-116.

Hilton JW, Plisetskaya EM, Leatherland JF. Does oral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)? *Fish Physiol Biochem*. **1987** Oct;4(3):113-20.

Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol*. **1998** Dec 14;143(6):1485-503.

Hochachka PW, Somero GN. In: *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton, NJ. **1984**:525.

Holland MC, Lambris JD. The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol*. **2002** May;12(5):399-420.

Holland MC, Lambris JD. The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol*. **2002** May;12(5):399-420.

Honda S, Kashiwagi M, Miyamoto K, Takei Y, Hirose S. Multiplicity, structures, and endocrine and exocrine natures of eel fucose-binding lectins. *J Biol Chem*. **2000** Oct 20;275(42):33151-7.

Hopper S, Segal HL. Comparative properties of glutamic-alanine transaminase from several sources. *Arch Biochem Biophys*. **1964** Jun;105:501-5.

Howell SJ, Wilk D, Yadav SP, Bevins CL. Antimicrobial polypeptides of the human colonic epithelium. *Peptides*. **2003** Nov;24(11):1763-70.

I

Igawa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol Immunol*. **2006** Mar;43(7):999-1009.

Iliev DB, Roach JC, Mackenzie S, Planas JV, Goetz FW. Endotoxin recognition: in fish or not in fish? *FEBS Lett.* **2005** Dec 5;579(29):6519-28.

Ince BW, Thorpe A. Effects of insulin and of metabolite loading on blood metabolites in the European silver eel, (*Anguilla anguilla* L.). *Gen Comp Endocrinol.* **1974** Aug;23(4):460-71.

Ince BW, Thorpe A. Glucose and amino acid-stimulated insulin release in vivo in the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen Comp Endocrinol.* **1977** Feb;31(2):249-56.

Ince BW, Thorpe A. The effects of insulin on plasma amino acid levels in the Northern pike, *Esox lucius* L. *Journal of Fish Biology.* **1978**;12: 503–506.

Inui Y, Arai S, Yokote M. Gluconeogenesis in the eel. VI. Effects of hepatectomy, alloxan, and mammalian insulin on the behavior of plasma amino acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1975**;41(11):1105-1111.

Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999–2002. *The American journal of gastroenterology.* **2006**;101(1):76-82.

Ip YK, Chew SF, Randall DJ. Five tropical air-breathing fishes, six different strategies to defend against ammonia toxicity on land. *Physiol Biochem Zool.* **2004a** Sep-Oct;77(5):768-82.

Ip YK, Chew SF, Wilson JM, Randall DJ. Defences against ammonia toxicity in tropical air-breathing fishes exposed to high concentrations of environmental ammonia: a review. *J Comp Physiol B.* **2004b** Oct;174(7):565-75.

Ip YK, Lem CB, Chew SF, Wilson JM, Randall DJ. Partial amino acid catabolism leading to the formation of alanine in *Periophthalmodon schlosseri* (mudskipper): a strategy that facilitates the use of amino acids as an energy source during locomotory activity on land. *J Exp Biol.* **2001** May;204(Pt 9):1615-24.

Ip YK, Lim CK, Lee SL, Wong WP, Chew SF. Postprandial increases in nitrogenous excretion and urea synthesis in the giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri*. *J Exp Biol.* **2004c** Aug;207(Pt 17):3015-23.

Ishiguro M, Suzuki M, Takio K, Matsuzawa T, Titani K. Complete amino acid sequence of rat liver cytosolic alanine aminotransferase. *Biochemistry.* **1991a** Jun 18;30(24):6048-53.

Ishiguro M, Takio K, Suzuki M, Oyama R, Matsuzawa T, Titani K. Complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT) determined by a combination of conventional and mass spectral methods. *Biochemistry.* **1991b** Oct 29;30(43):10451-7.

J

Jacobsen M, Fausa O, Elgjo K, Schrumpf E. Hepatic lesions in adult coeliac disease. *Scandinavian journal of gastroenterology.* **1990**;25(7):656-662.

Jadhao SB, Yang RZ, Lin Q, Hu H, Anania FA, Shuldiner AR, Gong DW. Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology.* **2004** May;39(5):1297-302.

Janeway Jr CA, Travers P. Immunology. The immune system in health and disease. *Current Biology Ltd.* New York: Garland Publishing Inc. **1997**. London.

Jansonius JN, Eichele G, Ford GC, Kirsch JF, Picot D, Thaller C, Vincent MG, Gehring H, Christen P. Three-dimensional structure of mitochondrial aspartate aminotransferase and some functional derivatives: implications for its mode of action. *Biochem Soc Trans.* **1984** Jun;12(3):424-7.

Janssen G, Kuipers H, Willems G, Does R, Janssen M, Geurten P. Plasma activity of muscle enzymes: quantification of skeletal muscle damage and relationship with metabolic variables. *International journal of sports medicine*. **1989**;10(S3):S160-S168.

Jault C, Pichon L, Chluba J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol Immunol*. **2004** Jan;40(11):759-71.

Jeong K, Takeuchi T, Watabe T. Improvement of nutritional quality of carbohydrates ingredients by extrusion process in diets of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **1991**,57(8):1543-1549.

Jing X, Zhang S. An ancient molecule with novel function: Alanine aminotransferase as a lipopolysaccharide binding protein with bacteriocidal activity. *Dev Comp Immunol*. **2011** Jan;35(1):94-104.

Jürss K, Bastrop R. Amino acid metabolism in fish. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Volume 4, Metabolic Biochemistry* (Hochachka PW, Mommsen TP, eds.). Elsevier Science, Amsterdam. **1995**:159-189.

Jürss K, Bastrop R. Amino acid metabolism in fish. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. (Hochachka K and Mommsen TP eds.) Elsevier, Amsterdam. **1995**:159-189.

K

Kairies N, Beisel HG, Fuentes-Prior P, Tsuda R, Muta T, Iwanaga S, Bode W, Huber R, Kawabata S. The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** Nov 20;98(24):13519-24.

Kaletha K, Thebault M, Raffin JP. Comparative studies on heart and skeletal muscle AMP-deaminase from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B*. **1991**;99(4):751-4.

Kania PW, Sorensen RR, Koch C, Brandt J, Kliem A, Vitved L, Hansen S, Skjodt K. Evolutionary conservation of mannan-binding lectin (MBL) in bony fish: identification, characterization and expression analysis of three bona fide collectin homologues of MBL in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*. **2010** Dec;29(6):910-20.

Kanse SM, Etscheid M. Factor VII activating protease. Single nucleotide polymorphisms light the way. *Hamostaseologie*. **2011** Aug;31(3):174-6, 177-8.

Kappeler F, Klopfenstein DR, Foguet M, Paccaud JP, Hauri HP. The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J Biol Chem*. **1997** Dec 12;272(50):31801-8.

Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y, Jindo T, Kobayashi D, Shimada A, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto S, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-I T, Takeda H, Morishita S, Kohara Y. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*. **2007** Jun 7;447(7145):714-9.

Katunuma N, Mikumo K, Matsuda M, Okada M. Differences between the transaminases in mitochondria and soluble fraction. I. Glutamic-pyruvic transaminase. *J Vitaminol (Kyoto)*. **1962** Mar 10;8:68-73.

Kaushik SJ, Cowey CB. Ammoniogenesis and dietary factors affecting nitrogen excretion. In: *Nutritional Strategies & Aquaculture Waste* (Cowey CB, Cho CY, eds.). University of Guelph, Canada. **1991**:3-19.

Kaushik SJ, Oliva-Teles A. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture*. **1985**;50(1-2):89-101.

- Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. **2005** Aug;17(4):338-44.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. **2011** May 27;34(5):637-50.
- Keller P, Simons K. Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci*. **1997** Dec;110 (Pt 24):3001-9.
- Kilpatrick DC. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta*. **2002** Sep 19;1572(2-3):187-97.
- Kim MH, Taparowsky EJ, Kim CH. Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut. *Immunity*. **2015** Jul 21;43(1):107-19.
- Kim RN, Kim DW, Choi SH, Chae SH, Nam SH, Kim DW, Kim A, Kang A, Park KH, Lee YS, Hirai M, Suzuki Y, Sugano S, Hashimoto K, Kim DS, Park HS. Major chimpanzee-specific structural changes in sperm development-associated genes. *Funct Integr Genomics*. **2011** Sep;11(3):507-17.
- Kim SK, Kim YC. Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food Chem Toxicol*. **2002** Apr;40(4):545-9.
- Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM, Bodenheimer HC; Public Policy Committee of the American Association for the Study of Liver Disease. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*. **2008** Apr;47(4):1363-70.
- Kirchhausen T, Harrison SC. Protein organization in clathrin trimers. *Cell*. **1981** Mar;23(3):755-61.
- Kirchhausen T. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2000** Dec;1(3):187-98.
- Kirchner S, Kaushik S, Panserat S. Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2003** Feb;134(2):337-47.
- Kirchner S, Panserat S, Lim PL, Kaushik S, Ferraris RP. The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. *J Comp Physiol B*. **2008** Mar;178(3):429-38.
- Kirchner S, Seixas P, Kaushik S, Panserat S. Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **2005** Feb;140(2):333-40.
- Kiron V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*. **2012** Apr;173(1-2):111-133.
- Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest*. **2001** Aug;108(3):485-93.
- Kitchens RL, Wang P, Munford RS. Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways. *J Immunol*. **1998** Nov 15;161(10):5534-45.
- Klein SL, Strausberg RL, Wagner L, Pontius J, Clifton SW, Richardson P. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn*. **2002** Dec;225(4):384-91.
- Klumperman J, Schweizer A, Clausen H, Tang BL, Hong W, Oorschot V, Hauri HP. The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci*. **1998** Nov;111 (Pt 22):3411-25.
- Knapp E, Wieser W. Effect of temperature and food on the free aminoacids in tissue of roach (*Rutilus rutilus* L.) and rudd (*Scardinius erythrophthalmus* L.) *Comp Biochem Physiol*. **1981**;68:187-198.

Krasnov A, Teerijoki H, Mölsä H. Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim Biophys Acta*. **2001** Aug 30;1520(2):174-8.

Kreitzer G, Marmorstein A, Okamoto P, Vallee R, Rodriguez-Boulan E. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol*. **2000** Feb;2(2):125-7.

Kuge O, Dascher C, Orci L, Rowe T, Amherdt M, Plutner H, Ravazzola M, Tanigawa G, Rothman JE, Balch WE. Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *J Cell Biol*. **1994** Apr;125(1):51-65.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. **2011** Feb;30(1):16-34.

Kumar V, Sahu NP, Pal AK, Kumar S, Sinha AK, Ranjan J, Baruah K. Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet. *Fish Physiol Biochem*. **2010** Sep;36(3):491-9.

L

Lafer EM. Clathrin-protein interactions. *Traffic*. **2002** Aug;3(8):513-20.

Lai M, Hyatt BJ, Nasser I, Curry M, Afdhal NH. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *Journal of hepatology*. **2007**;47(6):760-767.

Laing KJ, Purcell MK, Winton JR, Hansen JD. A genomic view of the NOD-like receptor family in teleost fish: identification of a novel NLR subfamily in zebrafish. *BMC Evol Biol*. **2008** Feb 6;8:42.

Lansard M, Panserat S, Plagnes-Juan E, Seilliez I, Skiba-Cassy S. Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids*. **2010** Aug;39(3):801-10.

Larsson A, Lewander K. Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. **1973** Feb 1;44(2):367-74.

Lee DJ, Putnam GB. The response of rainbow trout of varying protein-energy ratios in a test diet. *J Nutr*. **1973** Jun;103(6):916-22.

Lee K-G, Mitchell A, Shibamoto T. Antioxidative activities of aroma extracts isolated from natural plants. *Biofactors*. **2000**;13(1):173-178.

Legate NJ, Bonen A, Moon TW. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *Gen Comp Endocrinol*. **2001** Apr;122(1):48-59.

Lehninger A, Nelson DV, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. New York: *Worth Publishers*, **2000**.

Leklem JE. Vitamin B6. In: *Handbook of vitamins* (Machlin LJ, eds.) Marcel Dekker New York. **1991**:341-392.

Leong JS, Jantzen SG, von Schalburg KR, Cooper GA, Messmer AM, Liao NY, Munro S, Moore R, Holt RA, Jones SJ, Davidson WS, Koop BF. *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics*. **2010** Apr 30;11:279.

Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Démollière C, Duden R, Emr SD, Riezman H, Cosson P. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*. **1994** Dec 30;79(7):1199-207.

- Li E. Structure and function of cytoplasmic retinoid binding proteins. *Mol Cell Biochem.* **1999** Feb;192(1-2):105-8.
- Li JH, Shao JZ, Xiang LX, Wen Y. Cloning, characterization and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: the first evidence of Th2-type cytokine in fish. *Mol Immunol.* **2007** Mar;44(8):2078-86.
- Li P, Mai K, Trushenski J, Wu G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids.* **2009** May;37(1):43-53.
- Liangpunsakul S, Chalasani N. Unexplained elevations in alanine aminotransferase in individuals with the metabolic syndrome: results from the third National Health and Nutrition Survey (NHANES III). *The American journal of the medical sciences.* **2005**;329(3):111-116.
- Liau Y-F, Chu C-M. Hepatitis B virus infection. *The Lancet.* **2009**; 373(9663):582-592.
- Lieschke GJ, Trede NS. Fish immunology. *Curr Biol.* **2009** Aug 25;19(16):R678-82.
- Lim CB, Chew SF, Anderson PM, Ip YK. Reduction in the rates of protein and amino acid catabolism to slow down the accumulation of endogenous ammonia: a strategy potentially adopted by mudskippers (*Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*) during aerial exposure in constant darkness. *J Exp Biol.* **2001** May;204(Pt 9):1605-14.
- Lim CK, Wong WP, Lee SM, Chew SF, Ip YK. The ammonotelic African lungfish, *Protopterus dolloi*, increases the rate of urea synthesis and becomes ureotelic after feeding. *J Comp Physiol B.* **2004** Oct;174(7):555-64.
- Lindblom P, Rafter I, Copley C, Andersson U, Hedberg JJ, Berg AL, Samuelsson A, Hellmold H, Cotgreave I, Glinghammar B. Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum--differential tissue expression using novel antibodies. *Arch Biochem Biophys.* **2007** Oct 1;466(1):66-77.
- Lioudaki E, S Ganotakis E, P Mikhailidis D. Liver enzymes: potential cardiovascular risk markers? *Current pharmaceutical design.* **2011**;17(33):3632-3643.
- Lippincott-Schwartz J, Roberts TH, Hirschberg K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2000**;16:557-89.
- Liu R, Pan X, Whittington PF. Increased hepatic expression is a major determinant of serum alanine aminotransferase elevation in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* **2009** Mar;29(3):337-43.
- Liu Z, Hu Y, Yang X, Tan A, Gao Y, Qin X, Liang Y, Mo Z, Peng T. Combinative analysis of factors influence serum alanine aminotransferase activity in adult male population from southern China. *Clinical biochemistry.* **2012**;45(18):1683-1688.
- Liu Z, Que S, Xu J, Peng T. Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review. *Int J Med Sci.* **2014** Jun 26;11(9):925-35.
- Lorenzo C, Hanley A, Rewers M, Haffner S. The association of alanine aminotransferase within the normal and mildly elevated range with lipoproteins and apolipoproteins: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetologia.* **2013**;56(4):746-757.
- Love RM. The Chemical Biology of Fishes. Academic Press, London. **1980**:943.
- Lowenstein JM. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol Rev.* **1972** Apr;52(2):382-414.
- Lun LM, Zhang SC, Liang YJ. Alanine aminotransferase in amphioxus: Presence, localization and up-regulation after acute lipopolysaccharide exposure. *J Biochem Mol Biol.* **2006** Sep 30;39(5):511-5.

Lupiáñez J, Sánchez-Lozano M, García-Rejón L, De la Higuera M. Long-term effect of a high-protein non carbohydrate diet on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. **1989**; 79: 91-101.

Lushchak VI, Husak VV, Storey KB. Regulation of AMP-deaminase activity from white muscle of common carp *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **2008** Feb;149(2):362-9.

Lushchak VI, Smirnova YD, Storey KB. AMP-deaminase from sea scorpion white muscle: Properties and redistribution under hypoxia. *Comp Biochem Physiol B*. **1998**;119(3): 611-618.

M

MacDonald M, Neufeldt N, Park BN, Berger M, Ruderman N. Alanine metabolism and gluconeogenesis in the rat. *Am J Physiol*. **1976** Aug;231(2):619-26.

Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*. **2006** Feb;20(2):137-51.

Malhotra V, Orci L, Glick BS, Block MR, Rothman JE. Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell*. **1988** Jul 15;54(2):221-7.

Mambetsariev N, Mirzapozova T, Mambetsariev B, Sammani S, Lennon FE, Garcia JG, Singleton PA. Hyaluronic Acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2010** Mar;30(3):483-90.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. **2001**;50(8):1844-1850.

Marel Mv, Adamek M, Gonzalez SF, Frost P, Rombout JH, Wiegertjes GF, Savelkoul HF, Steinhagen D. Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding. *Fish Shellfish Immunol*. **2012** Mar;32(3):494-501.

Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, Coukos G, Lambris JD. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol*. **2008** Nov;9(11):1225-35.

Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol*. **2011** Feb;11(2):81.

Mauri I, Roher N, MacKenzie S, Romero A, Manchado M, Balasch JC, Béjar J, Alvarez MC, Tort L. Molecular cloning and characterization of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead seabream (*Sparus aurata*) complement component C3. *Fish Shellfish Immunol*. **2011** Jun;30(6):1310-22.

McAllister CH, Facette M, Holt A, Good AG. Analysis of the enzymatic properties of a broad family of alanine aminotransferases. *PLoS One*. **2013**;8(2):e55032.

McNew JA, Parlato F, Fukuda R, Johnston RJ, Paz K, Paumet F, Söllner TH, Rothman JE. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*. **2000** Sep 14;407(6801):153-9.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. **2002** Apr 12;296(5566):298-300.

Melillo D, Varriale S, Giacomelli S, Natale L, Bargelloni L, Oreste U, Pinto MR, Coscia MR. Evolution of the complement system C3 gene in Antarctic teleosts. *Mol Immunol*. **2015** Aug;66(2):299-309.

Méndez E, Smith A, Figueiredo-Garutti ML, Planas JV, Navarro I, Gutiérrez J. Receptors for insulin-like growth factor-I (IGF-I) predominate over insulin receptors in skeletal muscle throughout the life cycle of brown trout, *Salmo trutta*. *Gen Comp Endocrinol*. **2001** May;122(2):148-57.

Meng F, Sun Y, Liu X, Wang J, Xu T, Wang R. Analysis of C3 suggests three periods of positive selection events and different evolutionary patterns between fish and mammals. *PLoS One*. **2012**;7(5):e37489.

Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante IV. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Biochim Biophys Acta*. **2000** Apr 25;1491(1-3):220-8.

Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante IV. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **2004a** Jun;138(2):145-53.

Metón I, Caseras A, Mediavilla D, Fernández F, Baanante IV. Molecular cloning of a cDNA encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from liver of *Sparus aurata*: nutritional regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta*. **1999a** Feb 16;1444(2):153-65.

Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F, Baanante IV. Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology*. **2006** Jul;147(7):3446-56.

Metón I, Egea M, Baanante IV. New insights into the regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Recent Research Developments in Biochemistry* (Pandalay SG). **2003a**;4(1):125-149.

Metón I, Egea M, Fernández F, Eraso MC, Baanante IV. The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Lett*. **2004b** May 21;566(1-3):251-4.

Metón I, Fernández F, Baanante IV. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. **2003b**;225(1-4):99-107.

Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F, Baanante IV. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr*. **1999b** Sep;82(3):223-32.

Mironov AA, Weidman P, Luini A. Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J Cell Biol*. **1997** Aug 11;138(3):481-4.

Misura KM, Bock JB, Gonzalez LC Jr, Scheller RH, Weis WI. Three-dimensional structure of the amino-terminal domain of syntaxin 6, a SNAP-25 C homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002** Jul 9;99(14):9184-9.

Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*. **2004** Apr;12(4):186-92.

Miyake Y, Iwasaki Y, Terada R, Okamaoto R, Ikeda H, Makino Y, Kobashi H, Takaguchi K, Sakaguchi K, Shiratori Y. Persistent elevation of serum alanine aminotransferase levels leads to poor survival and hepatocellular carcinoma development in type 1 autoimmune hepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. **2006**;24(8):1197-1205.

Miyake Y, Iwasaki Y, Terada R, Takagi S, Okamaoto R, Ikeda H, Sakai N, Makino Y, Kobashi H, Takaguchi K. Persistent normalization of serum alanine aminotransferase levels improves the prognosis of type 1 autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*. **2005**;43(6):951-957.

Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **2007** Mar;49(6):1108-21.

Miyazaki M, Rosenblum JS, Kasahara Y, Nakagawa I, Patricelli MP. Determination of enzymatic source of alanine aminotransferase activity in serum from dogs with liver injury. *J Pharmacol Toxicol Methods*. **2009** Nov-Dec;60(3):307-15.

Mommsen T, French C, Honochachka P. Sites and patterns of protein and aminoacid utilization during the spawning migration of salmon. *Can J Zool*. **1980**;58:1785-1799.

Mommsen TP, Plisetskaya E. Insulin in fish and agnathans: History, structure and metabolic regulation. *Rev Aquat Sci*. **1991**;4:225-259.

Mommsen TP, Walsh PJ, Moon TW. Gluconeogenesis in hepatocytes and kidney of Atlantic salmon. *Mol Physiol*. **1985**;8: 89-100.

Monami M, Bardini G, Lamanna C, Pala L, Cresci B, Francesconi P, Buiatti E, Rotella CM, Mannucci E. Liver enzymes and risk of diabetes and cardiovascular disease: results of the Firenze Bagno a Ripoli (FIBAR) study. *Metabolism*. **2008**;57(3):387-392.

Moon TW. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **2001** Jun;129(2-3):243-9.

Morata P, Vargas AM, Sánchez-Medina F, Garcia M, Cardenete G, Zamora S. Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B*. **1982**;71(1):65-70.

Moreira IS, Péres H, Couto A, Enes P, Oliva-Teles A. Temperature and dietary carbohydrate levels affects on performance and metabolic utilisation of diets in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*. **2008**;274(1):153-160.

Mukorah F, Razunguzwa B, Masola B. Stabilization of rat liver mitochondrial alanine aminotransferase with ethanol and trehalose. *Cryobiology*. **1998** Dec;37(4):300-8.

Muñiz M, Nuoffer C, Hauri HP, Riezman H. The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol*. **2000** Mar 6;148(5):925-30.

Murai T, Ogata H, Hirashima Y, Akiyama T, Nose T. Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout force-fed complete diets containing casein or crystalline amino acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **1987**;53:1847-1859.

Murai T, Ogata H. Changes in free amino acid levels in various tissues of common carp in response to insulin injection followed by force-feeding an amino acid diet. *J Nutr*. **1990** Jul;120(7):711-8.

N

Nagai M, Ikeda S. Carbohydrate metabolism in fish. I. Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glycogen and lipid contents in carp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*. **1971**;37(5):404-409.

Nagayama F, Ohshima H. Studies on the enzyme system of carbohydrates metabolism in fish. Properties of liver hexokinase. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*. **1974**;40:285-290.

Nakamura N, Yamazaki S, Sato K, Nakano A, Sakaguchi M, Mihara K. Identification of potential regulatory elements for the transport of Emp24p. *Mol Biol Cell*. **1998** Dec;9(12):3493-503.

Nakao M, Kajiya T, Sato Y, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Matsushita M, Nakata M, Fujita T, Yano T. Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*). *J Immunol*. **2006** Oct 15;177(8):5471-9.

Nakata T, Terada S, Hirokawa N. Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol.* **1998** Feb 9;140(3):659-74.

Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology.* **2005**;41(2):380-382.

Navarro I, Blasco J, Banos N, Gutierrez J. Effects of fasting and feeding on plasma amino acid levels in brown trout. *Fish Physiol. Biochem.* **1997**;16(4):303-309.

Navarro I, Gutiérrez J, Planas J. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* **1992** Jun;102(2):401-7.

Navarro I, Gutiérrez J. Fasting and starvation. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Volume 4, Metabolic Biochemistry* (Hochachka PW, Mommsen TP, eds.), Elsevier Science, Amsterdam. **1995**:393-434.

Navarro I, Rojas P, Cpailla E, Albalat A, Castillo J, Montserrat N, Codina M, Gutierrez J. Insights into insulin and glucagons responses in fish. *Fish Physiol. Biochem.* **2002**;27(3-4):205-216.

Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature.* **2000** Jun 29;405(6790):1017-24.

Nishimura N, Balch WE. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science.* **1997** Jul 25;277(5325):556-8.

Nishiura H, Shibuya Y, Matsubara S, Tanase S, Kambara T, Yamamoto T. Monocyte chemotactic factor in rheumatoid arthritis synovial tissue. Probably a cross-linked derivative of S19 ribosomal protein. *J Biol Chem.* **1996** Jan 12;271(2):878-82.

Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr.* **1999**;19:379-406.

Novick P, Ferro S, Schekman R. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell.* **1981** Aug;25(2):461-9.

O

O'Brien RM, Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev.* **1996** Oct;76(4):1109-61.

Odom EW, Vasta GR. Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*). *J Biol Chem.* **2006** Jan 20;281(3):1698-713.

Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell.* **2006** Aug 25;126(4):659-62.

Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K. MD-2 is necessary for the toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clin Diagn Lab Immunol.* **2003** May;10(3):405-10.

Okada M, Murakami Y, Miyamoto E. Glycation and inactivation of aspartate aminotransferase in diabetic rat tissues. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* **1997** Aug;43(4):463-9.

Okada M, Sogo A, Ohnishi N. Glycation reaction of aspartate aminotransferase by various carbohydrates in an *in vitro* system. *J Nutr Biochem.* **1994**;5:485-489.

Olynyk JK, Knuiman MW, Divitini ML, Davis TM, Beilby J, Hung J. Serum alanine aminotransferase, metabolic syndrome, and cardiovascular disease in an Australian population. *The American journal of gastroenterology*. **2009**;104(7):1715-1722.

Orci L, Ravazzola M, Meda P, Holcomb C, Moore HP, Hicke L, Schekman R. Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1991** Oct 1;88(19):8611-5.

Oshiumi H, Tsujita T, Shida K, Matsumoto M, Ikeo K, Seya T. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics*. **2003** Feb;54(11):791-800.

Osorio F, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity*. **2011** May 27;34(5):651-64.

P

Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. **1975** Aug 1;189(4200):347-58.

Palmer TN, Ryman BE. Studies on oral glucose intolerance in fish. *Journal of Fish Biology*. **1972**;4: 311–319.

Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Dev Comp Immunol*. **2011** Dec;35(12):1263-72.

Panserat S, Blin C, Médale F, Plagnes-Juan E, Brèque J, Krishnamoorthy J, Kaushik S. Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim Biophys Acta*. **2000a** Mar 6;1474(1):61-9.

Panserat S, Capilla E, Gutierrez J, Frappart PO, Vachot C, Plagnes-Juan E, Aguirre P, Brèque J, Kaushik S. Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **2001a** Feb;128(2):275-83.

Panserat S, Kaushik SJ. Régulation nutritionnelle du métabolisme glucidique chez les poissons : exemple de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), faible utilisatrice des glucides alimentaires. *INRAProd. Anim*. **2002**;15(2):109-117.

Panserat S, Médale F, Blin C, Brèque J, Vachot C, Plagnes-Juan E, Gomes E, Krishnamoorthy R, Kaushik S. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **2000b** May;278(5):R1164-70.

Panserat S, Médale F, Brèque J, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr Biochem*. **2000c** Jan;11(1):22-9.

Panserat S, Plagnes-Juan E, Brèque J, Kaushik S. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*. **2001b** Jan;204(Pt 2):359-65.

Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biochim Biophys Acta*. **2002** Nov 13;1579(1):35-42.

- Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*. **2001c** Jul;204(Pt 13):2351-60.
- Parisi MG, Cammarata M, Benenati G, Salerno G, Mangano V, Vizzini A, Parrinello N. A serum fucose-binding lectin (DIFBL) from adult *Dicentrarchus labrax* is expressed in larva and juvenile tissues and contained in eggs. *Cell Tissue Res*. **2010** Aug;341(2):279-88.
- Park J, Choe SS, Choi AH, Kim KH, Yoon MJ, Suganami T, Ogawa Y, Kim JB. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. *Diabetes*. **2006** Nov;55(11):2939-49.
- Park KC, Osborne JA, Tsoi SC, Brown LL, Johnson SC. Expressed sequence tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol*. **2005** May;18(5):393-415.
- Park SH, Heo NY, Park JH, Kim TO, Yang SY, Moon YS, Kim CH, Suk KT, Kim DJ, Lee HY. Obesity, insulin resistance, and the risk of an elevated alanine aminotransferase activity in the Korean adolescent population. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. **2012**;25(9-10):945-949.
- Parlati F, Varlamov O, Paz K, McNew JA, Hurtado D, Söllner TH, Rothman JE. Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002** Apr 16;99(8):5424-9.
- Párrizas M, Plisetskaya EM, Planas J, Gutiérrez J. Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen Comp Endocrinol*. **1995** Apr;98(1):16-25.
- Pearse BM. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol*. **1975** Sep 5;97(1):93-8.
- Pelegrín P, García-Castillo J, Mulero V, Meseguer J. Interleukin-1beta isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines. *Cytokine*. **2001** Oct 21;16(2):67-72.
- Pelham HR. Getting through the Golgi complex. *Trends Cell Biol*. **1998** Jan;8(1):45-9.
- Pendino GM, Mariano A, Surace P, Caserta CA, Fiorillo MT, Amante A, Bruno S, Mangano C, Polito I, Amato F. Prevalence and etiology of altered liver tests: A population-based survey in a Mediterranean town. *Hepatology*. **2005**;41(5):1151-1159.
- Peng LA, Schousboe A, Hertz L. Utilization of alpha-ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Res*. **1991** Jan;16(1):29-34.
- Peres H, Oliva-Teles A. Proteins and energy metabolism of european Seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles and estimation of maintenance requirements. *Fish Physiol Biochem*. **2006**;31(1):23-31.
- Peres H, Oliva-Teles A. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*. **2002**;205(3-4):287-299.
- Pérez-Cordón G, Estensoro I, Benedito-Palos L, Calduch-Giner JA, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish-parasite model. *Fish Shellfish Immunol*. **2014** Apr;37(2):201-8.
- Pérez-Jiménez A, Cardenete G, Hidalgo MC, García-Alcázar A, Abellán E, Morales AE. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiol Biochem*. **2012** Aug;38(4):1145-57.
- Pérez-Jiménez A, Guedes MJ, Morales AE, Oliva-Teles A. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture*. **2007**;265(1-4):325-335.

Perutz MF, Pope BJ, Owen D, Wanker EE, Scherzinger E. Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid beta-peptide of amyloid plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002** Apr 16;99(8):5596-600.

Petäjä J. Inflammation and coagulation. An overview. *Thromb Res*. **2011** Jan;127 Suppl 2:S34-7.

Pietretti D, Spaik HP, Falco A, Forlenza M, Wiegertjes GF. Accessory molecules for Toll-like receptors in Teleost fish. Identification of TLR4 interactor with leucine-rich repeats (TRIL). *Mol Immunol*. **2013** Dec;56(4):745-56.

Pietretti D, Wiegertjes GF. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies. *Dev Comp Immunol*. **2014** Apr;43(2):205-22.

Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*. **1992**;54:885-909.

Plisetskaya EM. Some of my not so favourite things about insulin and insulin-like growth factors in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*. **1998**;121:3-11.

Plouffe DA, Hanington PC, Walsh JG, Wilson EC, Belosevic M. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*. **2005** Jul;12(4):266-77.

Polakof S, Arjona FJ, Sangiao-Alvarellos S, Martín del Río MP, Mancera JM, Soengas JL. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J Comp Physiol B*. **2006** Jun;176(5):441-52.

Polakof S, Míguez JM, Soengas JL. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2007** Jun;147(2):363-74.

Polakof S, Panserat S, Soengas JL, Moon TW. Glucose metabolism in fish: a review. *J Comp Physiol B*. **2012** Dec;182(8):1015-45.

Polishchuk RS, Polishchuk EV, Marra P, Alberti S, Buccione R, Luini A, Mironov AA. Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J Cell Biol*. **2000** Jan 10;148(1):45-58.

Powell LW, George DK, McDonnell SM, Kowdley KV. Diagnosis of hemochromatosis. *Ann Intern Med*. **1998** Dec 1;129(11):925-31.

Powers J, Barlowe C. Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell*. **2002** Mar;13(3):880-91.

Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New England Journal of Medicine*. **2000**;342(17):1266-1271.

Q

Qiu L, Lin L, Yang K, Zhang H, Li J, Zou F, Jiang S. Molecular cloning and expression analysis of a F-type lectin gene from Japanese sea perch (*Lateolabrax japonicus*). *Mol Biol Rep*. **2011** Aug;38(6):3751-6.

Qu H, Ricklin D, Lambris JD. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Mol Immunol*. **2009** Dec;47(2-3):185-95.

R

Raffin JP, Izem L, Thebault MT. Amplification of myoadenylate deaminase during evolution. II. Purification and properties of the enzyme from two Elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* and *Raja clavata*. *Comp Biochem Physiol B*. **1993**;106(4):999-1007.

Rajamohan F, Nelms L, Joslin DL, Lu B, Reagan WJ, Lawton M. cDNA cloning, expression, purification, distribution, and characterization of biologically active canine alanine aminotransferase-1. *Protein Expr Purif*. **2006** Jul;48(1):81-9.

Rajendran KV, Zhang J, Liu S, Kucuktas H, Wang X, Liu H, Sha Z, Terhune J, Peatman E, Liu Z. Pathogen recognition receptors in channel catfish: I. Identification, phylogeny and expression of NOD-like receptors. *Dev Comp Immunol*. **2012a** May;37(1):77-86.

Rajendran KV, Zhang J, Liu S, Peatman E, Kucuktas H, Wang X, Liu H, Wood T, Terhune J, Liu Z. Pathogen recognition receptors in channel catfish: II. Identification, phylogeny and expression of retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs). *Dev Comp Immunol*. **2012b** Jul;37(3-4):381-9.

Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology*. **2005**;5(3):215-229.

Rémésy C, Demigné C, Aufrère J. Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets. *Biochem J*. **1978** Feb 15;170(2):321-9.

Ren HL, Wang KJ, Zhou HL, Yang M. Cloning and organisation analysis of a hepcidin-like gene and cDNA from Japan sea bass, *Lateolabrax japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*. **2006** Sep;21(3):221-7.

Reshkin SJ, Ahearn GA. Intestinal glycyl-L-phenylalanine and L-phenylalanine transport in a euryhaline teleost. *Am J Physiol*. **1991** Mar;260(3 Pt 2):R563-9.

Reshkin SJ, Vilella S, Cassano G, Ahearn GA, Storelli C. Basolateral amino acid and glucose transport by the intestine of the teleost, *Anguilla anguilla*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. **1988**;91(4):779-88.

Rice LM, Brunger AT. Crystal structure of the vesicular transport protein Sec17: implications for SNAP function in SNARE complex disassembly. *Mol Cell*. **1999** Jul;4(1):85-95.

Roberg KJ, Crotwell M, Espenshade P, Gimeno R, Kaiser CA. LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. **1999** May 17;145(4):659-72.

Ronnestad I, Fyhn HJ. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Reviews in Fisheries Science*. **1993**;1(3):239-259.

Ronnestad I, Groot EP, Fyhn HJ. Compartmental distribution of free amino acids and protein in developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Biology*. **1993**;116(3):349-354.

Rosen F, Harding HR, Milholland RJ, Nichol CA. Glucocorticoids and Transaminase Activity. VI. Comparison of the Adaptive Increases of Alanine- and Tyrosine-Alpha-Ketoglutarate Transaminases. *J Biol Chem*. **1963** Nov;238:3725-9.

Rosen F, Roberts NR, Budnick LE, Nichol CA. Corticosteroids and transaminase activity: the specificity of the glutamic-pyruvic transaminase response. *Endocrinology*. **1959** Aug;65(2):256-64.

Roth TF, Porter KR. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. L. *J Cell Biol*. **1964** Feb;20:313-32.

Rothman JE, Wieland FT. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. **1996** Apr 12;272(5259):227-34.

- Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*. **1994** Nov 3;372(6501):55-63.
- Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*. **2005**;128(1):24-32.
- Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology*. **2003** Jan;124(1):71-9.
- Ruhl CE, Everhart JE. Upper limits of normal for alanine aminotransferase activity in the United States population. *Hepatology*. **2012**;55(2):447-454.

S

- Sabapathy U, Teo LH. Some properties of the intestinal proteases of the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* (Park). *Fish Physiol Biochem*. **1995** Jun;14(3):215-21.
- Saier MH Jr, Jenkins WT. Alanine aminotransferase. I. Purification and properties. *J Biol Chem*. **1967a** Jan 10;242(1):91-100.
- Saier MH Jr, Jenkins WT. Alanine aminotransferase. II. The basis for substrate specificity. *J Biol Chem*. **1967b** Jan 10;242(1):101-8.
- Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito J-i, Watanabe H, Saito K, Takeda H. Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population. *Metabolism*. **2009**;58(8):1067-1075.
- Salazar-Mather TP, Hokeness KL. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol*. **2006**;303:29-46.
- Salerno G, Parisi MG, Parrinello D, Benenati G, Vizzini A, Vazzana M, Vasta GR, Cammarata M. F-type lectin from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): purification, cDNA cloning, tissue expression and localization, and opsonic activity. *Fish Shellfish Immunol*. **2009** Aug;27(2):143-53.
- Salgado MC, Metón I, Anemaet IG, Baanante IV. Activating transcription factor 4 mediates up-regulation of alanine aminotransferase 2 gene expression under metabolic stress. *Biochim Biophys Acta*. **2014**;1839(4):288-96.
- Salgado MC, Metón I, Anemaet IG, González JD, Fernández F, Baanante IV. Hepatocyte nuclear factor 4 α transactivates the mitochondrial alanine aminotransferase gene in the kidney of *Sparus aurata*. *Mar Biotechnol (NY)*. **2012** Feb;14(1):46-62.
- Salgado MC, Metón I, Egea M, Baanante IV. Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *J Mol Endocrinol*. **2004** Dec;33(3):783-95.
- Sánchez-Muros MJ, García-Rejón L, García-Salguero L, De la Higuera M, Lupiáñez JA. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int J Biochem Cell Biol*. **1998** Jan;30(1):55-63.
- Sangrador-Vegas A, Martin SA, O'Dea PG, Smith TJ. Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *Eur J Biochem*. **2000** Dec;267(24):7031-7.
- Satoh S, Sarker MSA, Satoh KI, Kiron V. Effects of dietary lipid and phosphorus levels on nitrogen and phosphorus excretion in young yellowtail *Seriola quinqueradiata*: A preliminary observation. *Fisheries Science*. **2004**;70(6):1082-1088.

- Savan R, Kono T, Igawa D, Sakai M. A novel tumor necrosis factor (TNF) gene present in tandem with the TNF-alpha gene on the same chromosome in teleosts. *Immunogenetics*. **2005** Apr;57(1-2):140-50.
- Savan R, Sakai M. Genomics of fish cytokines. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. **2006** Mar;1(1):89-101.
- Schekman R, Orci L. Coat proteins and vesicle budding. *Science*. **1996** Mar 15;271(5255):1526-33.
- Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ, Diamant M. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis*. **2007**;191(2):391-396.
- Schmoranzler J, Goulian M, Axelrod D, Simon SM. Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy. *J Cell Biol*. **2000** Apr 3;149(1):23-32.
- Schooling CM, Kelvin EA, Jones HE. Alanine transaminase has opposite associations with death from diabetes and ischemic heart disease in NHANES III. *Annals of epidemiology*. **2012**;22(11):789-798.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. **1990** Sep 21;249(4975):1429-31.
- Schwartz MK. Clinical aspects of aspartate and alanine aminotransferases. *Methods in enzymology*. **1971**;17:866-875.
- Segev N. Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci STKE*. **2001** Sep 18;2001(100):re11.
- Sen P, Gopalakrishnan R, Kothari H, Keshava S, Clark CA, Esmon CT, Pendurthi UR, Rao LV. Factor VIIa bound to endothelial cell protein C receptor activates protease activated receptor-1 and mediates cell signaling and barrier protection. *Blood*. **2011** Mar 17;117(11):3199-208.
- Seoane J, Trinh K, O'Doherty RM, Gómez-Foix AM, Lange AJ, Newgard CB, Guinovart JJ. Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. *J Biol Chem*. **1997** Oct 24;272(43):26972-7.
- Sepulcre MP, Alcaraz-Pérez F, López-Muñoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML, Mulero V. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J Immunol*. **2009** Feb 15;182(4):1836-45.
- Sepulcre MP, López-Castejón G, Meseguer J, Mulero V. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Mol Immunol*. **2007** Mar;44(8):2009-16.
- Sever S. Dynamin and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*. **2002** Aug;14(4):463-7.
- Shiau SY. Utilization of carbohydrates in warmwater fish—with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture*. **1997**;151(1-4):79-96.
- Shimoni Y, Kurihara T, Ravazzola M, Amherdt M, Orci L, Schekman R. Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. **2000** Nov 27;151(5):973-84.
- Sivaloganathan B, Walford J, Ip YK, Lam TJ. Free amino acids and energy metabolism in eggs and larvae of seabass, *Lates calcarifer*. *Marine Biology*. **1998**;131(4):695-702.
- Snell EE. Vitamin B6 and decarboxylation of histidine. *Ann N Y Acad Sci*. **1990**;585:1-12.
- Soengas JL, Polakof S, Chen X, Sangiao-Alvarellos S, Moon TW. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **2006** Sep;291(3):R810-21.

- Soengas JL, Strong EF, Fuentes J, Veira JA, Andrés MD. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol Biochem.* **1996** Dec;15(6):491-511.
- Sohocki MM, Sullivan LS, Harrison WR, Sodergren EJ, Elder FF, Weinstock G, Tanase S, Daiger SP. Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites. *Genomics.* **1997** Mar 1;40(2):247-52.
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* **1993** Mar 25;362(6418):318-24.
- Srivastava AS, Oohara I, Suzuki T, Shenouda S, Singh SN, Chauhan DP, Carrier E. Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology.* **2004**;137:197-207.
- Stafford JL, Ellestad KK, Magor KE, Belosevic M, Magor BG. A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. *Dev Comp Immunol.* **2003** Sep;27(8):685-98.
- Steffens W. Principles of fish nutrition. Ed. Halsted Press. New York, **1989**.
- Steinke D, Salzburger W, Braasch I, Meyer A. Many genes in fish have species-specific asymmetric rates of molecular evolution. *BMC Genomics.* **2006** Feb 8;7:20.
- Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev.* **2006** May;30(3):382-403.
- Stone D, Allan G, Anderson A. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Michell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquac Res.* **2003**;34(2):123-134.
- Suárez MD, Hidalgo MC, García Gallego M, Sanz A, De La Higuera M. Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology.* **1995**;111(3): 421-428.
- Suarez RK, Mommsen TP. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can. J. Zool.* **1987**;65:1869-1882.
- Sundby A, Hemre GI, Borrebaek B, Christophersen B, Blom AK. Insulin and glucagon family peptides in relation to activities of hepatic hexokinase and other enzymes in fed and starved Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol B.* **1991**;100(3):467-70.
- Sunyer JO, Tort L, Lambris JD. Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochem J.* **1997** Sep 15;326 (Pt 3):877-81.
- Sunyer JO, Zarkadis IK, Lambris JD. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol Today.* **1998** Nov;19(11):519-23.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* **1998** Sep 24;395(6700):347-53.
- Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol.* **1999** Feb;2(1):99-105.
- Swick RW, Barnstein PL, Stange JL. The metabolism of mitochondrial proteins. I. Distribution and characterization of the isozymes of alanine aminotransferase in rat liver. *J Biol Chem.* **1965** Aug;240:3334-40.

Swick RW, Barnstein PL, Stange JL. The metabolism of mitochondrial proteins. I. Distribution and characterization of the isozymes of alanine aminotransferase in rat liver. *J Biol Chem.* **1965** Aug;240:3334-40.

T

Tada N, Sakamoto T, Kagami A, Mochizuki K, Kurosaka K. Antimicrobial activity of lipoprotein particles containing apolipoprotein AI. *Mol Cell Biochem.* **1993** Feb 17;119(1-2):171-8.

Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, Inoue H, Kinoshita S, Okamoto Y, Sakaue H, Wataoka Y, Emi A, Senga Y, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Kasuga M. Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. *Diabetes.* **2010** Jul;59(7):1608-15.

Takeda Y, Ichihara A, Tanioka H, Inoue H. The biochemistry of animal cell, I. The effect of corticosteroids on leakage of enzymes from dispersed rat liver cells. *J Biol Chem.* **1964** Oct;239:3590-6.

Takeuchi T, Hernández M, Watanabe T. Nutritive Value of Gelatinized Corn Meal as a Carbohydrate Source to Grass Carp and Hybrid Tilapia *Oreochromis niloticus*×*O. aureus*. *Fisheries science.* **1994**;60(5):573-577.

Tanase S, Kojima H, Morino Y. Pyridoxal 5'-phosphate binding site of pig heart alanine aminotransferase. *Biochemistry.* **1979** Jul 10;18(14):3002-7.

Tang BL, Low SH, Hauri HP, Hong W. Segregation of ERGIC53 and the mammalian KDEL receptor upon exit from the 15 degrees C compartment. *Eur J Cell Biol.* **1995** Dec;68(4):398-410.

Tantikitti C, March BE. Dynamics of plasma free amino acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under variety of dietary conditions. *Fish Physiol Biochem.* **1995**;14:179-194.

Teerijoki H, Krasnov A, Gorodilov Y, Krishna S, Mölsä H. Rainbow trout glucose transporter (OnmyGLUT1): functional assessment in *Xenopus laevis* oocytes and expression in fish embryos. *J Exp Biol.* **2001** Aug;204(Pt 15):2667-73.

Teerijoki H, Krasnov A, Pitkänen TI, Mölsä H. Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim Biophys Acta.* **2000** Dec 1;1494(3):290-4.

Thulin P, Rafter I, Stockling K, Tomkiewicz C, Norjavaara E, Aggerbeck M, Hellmold H, Ehrenborg E, Andersson U, Cotgreave I, Glinghammar B. PPARalpha regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2008** Aug 15;231(1):1-9.

Tollin M, Bergman P, Svenberg T, Jörnvall H, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. *Peptides.* **2003** Apr;24(4):523-30.

Toomre D, Steyer JA, Keller P, Almers W, Simons K. Fusion of constitutive membrane traffic with the cell surface observed by evanescent wave microscopy. *J Cell Biol.* **2000** Apr 3;149(1):33-40.

Tranulis MA, Christophersen B, Blom AK, Borrebaek B. Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations. *Comp Biochem Physiol B.* **1991**;99(3):687-91.

Tranulis MA, Christophersen B, Borrebaek B. Glucokinase in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) brockmann bodies. *Comp Biochem Physiol.* **1997**;116(3):367-370.

Tranulis MA, Dregni O, Christophersen B, Krogdahl A, Borrebaek B. A glucokinase-like-enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **1996** May;114(1):35-9.

Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **2002** Jun;23(6):301-4.

Trinh KY, O'Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J Biol Chem.* **1998** Nov 20;273(47):31615-20.

U

Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, Martin B, Greene LE, Eisenberg E. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature.* **1995** Dec 7;378(6557):632-5.

V

van de Werve G, Lange A, Newgard C, Méchin MC, Li Y, Berteloot A. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur J Biochem.* **2000** Mar;267(6):1533-49.

van den Thillart G, van Raaij M. Endogenous fuels; noninvasive versus invasive. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Volume 4, Metabolic Biochemistry* (Hochachka PW, Mommsen TP, eds.). Elsevier Science, Amsterdam. **1995**:33– 63.

Van Muiswinkel WB. A history of fish immunology and vaccination I. The early days. *Fish Shellfish Immunol.* **2008** Oct;25(4):397-408.

van Vliet SJ, García-Vallejo JJ, van Kooyk Y. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol.* **2008** Oct;86(7):580-7.

van Waarde A, Henegouwen MDW. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.) pathway of aerobic and anaerobic glutamate oxidation in goldfish liver and muscle mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.* **1982**;72B(1):133–136.

van Waarde A. Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp Biochem Physiol B.* **1983**;74(4):675-84.

Vasta GR, Ahmed H, Bianchet MA, Fernández-Robledo JA, Amzel LM. Diversity in recognition of glycans by F-type lectins and galectins: molecular, structural, and biophysical aspects. *Ann N Y Acad Sci.* **2012** Apr;1253:E14-26.

Vasta GR, Lambris JD. Innate immunity in the Aegean: ancient pathways for today's survival. *Dev Comp Immunol.* **2002** Apr;26(3):217-25.

Vasta GR, Nita-Lazar M, Giomarelli B, Ahmed H, Du S, Cammarata M, Parrinello N, Bianchet MA, Amzel LM. Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: relevance to innate and adaptive immunity. *Dev Comp Immunol.* **2011** Dec;35(12):1388-99.

Vedavathi M, Girish KS, Kumar MK. Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. *Mol Cell Biochem.* **2004** Dec;267(1-2):13-23.

Veerkamp JH, van Kuppevelt TH, Maatman RG, Prinsen CF. Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid-binding proteins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **1993** Dec;49(6):887-906.

Venou B, Alexis M, Fountoulaki E, Nengas I, Apostolopoulou M, Castritsi-Cathariou I. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture*. **2003**;225(1-4):207-223.

Vergara JM, Robainà L, Izquierdo M, De la Higuera M. Protein Sparing Effect of Lipids in Diets for Fingerlings of Gilthead Sea Bream. *Fisheries Science*. **1996**;62(4):624-628.

Viegas I, Caballero-Solares A, Rito J, Giralt M, Pardal MA, Metón I, Jones JG, Baanante IV. Expressional regulation of key hepatic enzymes of intermediary metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during food deprivation and refeeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2014** Aug;174:38-44.

Viegas I, Rito J, González JD, Jarak I, Carvalho RA, Metón I, Pardal MA, Baanante IV, Jones JG. Effects of food-deprivation and refeeding on the regulation and sources of blood glucose appearance in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2013** Nov;166(3):399-405.

Viegas I, Rito J, Jarak I, Leston S, Carvalho RA, Metón I, Pardal MA, Baanante IV, Jones JG. Hepatic glycogen synthesis in farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) is dominated by indirect pathway fluxes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2012** Sep;163(1):22-9.

Vitved L, Holmskov U, Koch C, Teisner B, Hansen S, Salomonsen J, Skjødtt K. The homologue of mannose-binding lectin in the carp family *Cyprinidae* is expressed at high level in spleen, and the deduced primary structure predicts affinity for galactose. *Immunogenetics*. **2000** Sep;51(11):955-64.

Votsmeier C, Gallwitz D. An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J*. **2001** Dec 3;20(23):6742-50.

Vojarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. **2002** Jun;51(6):1889-95.

W

Walton MJ, Cowey CB. Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol*. **1977**; 57B(2):143-149.

Walton MJ. Metabolic effects of feeding a high protein/low carbohydrate diet as compared to a low protein/high carbohydrate diet to rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol Biochem*. **1986** Jan;1(1):7-15.

Wang C-C, Kao J-H. Alanine Aminotransferase, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease: A Missing Link&quest. *The American journal of gastroenterology*. **2010**;105(1):224-224.

Wang JH, Bose S, Kim GC, Hong SU, Kim JH, Kim JE, Kim H. *Flos Lonicera* ameliorates obesity and associated endotoxemia in rats through modulation of gut permeability and intestinal microbiota. *PLoS One*. **2014** Jan 24;9(1):e86117.

Wang Q, Bao B, Wang Y, Peatman E, Liu Z. Characterization of a NK-lysin antimicrobial peptide gene from channel catfish. *Fish Shellfish Immunol*. **2006a** Mar;20(3):419-26.

Wang Q, Wang Y, Xu P, Liu Z. NK-lysin of channel catfish: gene triplication, sequence variation, and expression analysis. *Mol Immunol*. **2006b** Apr;43(10):1676-86.

Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, Kirchhausen T, Albanesi JP, Roth MG, Yin HL. Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell*. **2003** Aug 8;114(3):299-310.

- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner TH, Rothman JE. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. **1998** Mar 20;92(6):759-72.
- Weihrauch D, Wilkie MP, Walsh PJ. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. *J Exp Biol*. **2009** Jun;212(Pt 11):1716-30.
- Welch S. Comparative studies on the human glutamate-pyruvate transaminase phenotypes - GPT 1, GPT 2-1, GPT 2. *Hum. Hered*. **1972**;22:190-197.
- Whyte SK. The innate immune response of finfish--a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol*. **2007** Dec;23(6):1127-51.
- Wickramasinghe S, Corridan B, Izaguirre J, Hasan R, Marjot D. Ethnic differences in the biological consequences of alcohol abuse: a comparison between south Asian and European males. *Alcohol and alcoholism*. **1995**;30(5):675-680.
- Wilkie MP. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *J Exp Zool*. **2002** Aug 1;293(3):284-301.
- Wilkie MP. Mechanisms of Ammonia Excretion Across Fish Gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. **1997**;118(1):39-50.
- Wilmanski JM, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol*. **2008** Jan;83(1):13-30.
- Wilson GL, Leiter EH. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol*. **1990**;156:27-54.
- Wilson RP, Poe WE. Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. *J Nutr*. **1987** Feb;117(2):280-5.
- Wilson RP. Amino Acids and Proteins. In: *Fish Nutrition* (Halver JE, Hardy RW, eds.). Elsevier Science, USA. **2002**:144-180.
- Wilson RP. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*. **1994**;124:67-80.
- Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol*. **2010** Oct 15;5(10):905-17.
- Wong KF, Luk JM, Cheng RH, Klickstein LB, Fan ST. Characterization of two novel LPS-binding sites in leukocyte integrin betaA domain. *FASEB J*. **2007** Oct;21(12):3231-9.
- Wood C. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: *Physiology of Fishes* (Ewans DH, ed). CRC Press Boca Raton. **1993**:379-425.
- Wright JR Jr, O'Hali W, Yang H, Han XX, Bonen A. GLUT-4 Deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *Gen Comp Endocrinol*. **1998** Jul;111(1):20-7.
- Wu XY, Xiang LX, Huang L, Jin Y, Shao JZ. Characterization, expression and evolution analysis of Toll-like receptor 1 gene in pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*). *Int J Immunogenet*. **2008** Jun;35(3):215-25.
- Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med*. **1994** Sep 1;180(3):1025-35.
- Wygrecka M, Markart P, Fink L, Guenther A, Preissner KT. Raised protein levels and altered cellular expression of factor VII activating protease (FSAP) in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax*. **2007** Oct;62(10):880-8.

Y

Yamamoto H, Aikawa T, Matsutaka H, Okuda T, Ishikawa E. Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats. *Am J Physiol.* **1974** Jun;226(6):1428-33.

Yang C, Su J. Molecular identification and expression analysis of Toll-like receptor 3 in common carp *Cyprinus carpio*. *J Fish Biol.* **2010** May;76(8):1926-39.

Yang L, Kombu RS, Kasumov T, Zhu SH, Cendrowski AV, David F, Anderson VE, Kelleher JK, Brunengraber H. Metabolomic and mass isotopomer analysis of liver gluconeogenesis and citric acid cycle. I. Interrelation between gluconeogenesis and cataplerosis; formation of methoxamates from aminooxyacetate and ketoacids. *J Biol Chem.* **2008** Aug 8;283(32):21978-87.

Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR, Gong DW. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics.* **2002** Mar;79(3):445-50.

Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L, Gong DW. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology.* **2009** Feb;49(2):598-607.

Yoshida A, Wang Y, Bae I, Cao MJ, Osatomi K, Hara K. Molecular cloning and tissue distribution of hyaluronan binding protein 2 (HABP2) in red sea bream *Pagrus major*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **2013** Aug;165(4):271-6.

Yu XQ, Kanost MR. Manduca sexta lipopolysaccharide-specific immunectin-2 protects larvae from bacterial infection. *Dev Comp Immunol.* **2003** Mar;27(3):189-96.

Yun JE, Kim SY, Kang H-C, Lee SJ, Kimm H, Jee SH. Alanine aminotransferase is associated with metabolic syndrome independently of insulin resistance. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society.* **2010**;75(4):964-969.

Z

Zhang H, Peatman E, Liu H, Niu D, Feng T, Kucuktas H, Waldbieser G, Chen L, Liu Z. Characterization of a mannose-binding lectin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Res Vet Sci.* **2012** Jun;92(3):408-13.

Zhang M, Hu YH, Sun L. Identification and molecular analysis of a novel C-type lectin from *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2010** Jul;29(1):82-8.

Zhang YA, Zou J, Chang CI, Secombes CJ. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Vet Immunol Immunopathol.* **2004** Oct;101(3-4):259-69.

Zhang Z, Wu RS, Mok HO, Wang Y, Poon WW, Cheng SH, Kong RY. Isolation, characterization and expression analysis of a hypoxia-responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Eur J Biochem.* **2003** Jul;270(14):3010-7.

Zhu LY, Nie L, Zhu G, Xiang LX, Shao JZ. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev Comp Immunol.* **2013** Jan-Feb;39(1-2):39-62.

Zhu S, Gao B. Evolutionary origin of β -defensins. *Dev Comp Immunol.* **2013** Jan-Feb;39(1-2):79-84.

Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Marçais G, Roberts M, Subramanian P, Yorke JA, Salzberg SL. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* **2009**;10(4):R42.

Zou J, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ. Molecular cloning of interleukin 1beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site. *Cytokine.* **1999** Aug;11(8):552-60.

Zou J, Tafalla C, Truckle J, Secombes CJ. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *J Immunol.* **2007** Sep 15;179(6):3859-71.

ANNEXOS

8. ANNEXOS

A.

Anemaet IG, González JD, Salgado MC, **Giralt M**, Fernández F, Baanante IV, Metón I. Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol*. **2010** Sep;45(3):119-32. doi: 10.1677/JME-10-0022. Epub 2010 Jun 23.

B.

Viegas I, Caballero-Solares A, Rito J, **Giralt M**, Pardal MA, Metón I, Jones JG, Baanante IV. Expressional regulation of key hepatic enzymes of intermediary metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during food deprivation and refeeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **2014** Aug;174:38-44. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.04.004. Epub 2014 Apr 18.

Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb

Ida G Anemaet, Juan Diego González, María C Salgado, Marina Giralt, Felipe Fernández¹, Isabel V Baanante and Isidoro Metón

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

¹Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

(Correspondence should be addressed to I Metón; Email: imeton@ub.edu)

Abstract

Alanine aminotransferase (Alt) provides a molecular link between carbohydrate and amino acid metabolism. In the cell context, the predominant Alt isozyme is located in the cytosol. To gain insight into the transcriptional regulation of the cytosolic *alt* gene (*calt*), we cloned and characterized the *calt* promoter from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Transient transfection of sea bass larvae cells with deleted *calt* promoter constructs and electrophoretic mobility shift assays allowed us to identify p300 and c-Myb as new factors in the transcriptional regulation of *calt* expression. Transfection studies carried out with an acetylase-deficient mutant p300 (p300DY) revealed that the acetyltransferase activity of p300 is essential for the p300-mediated transcriptional activation of *S. aurata calt*. We had previously found up-regulation of liver cAlt2, an alternatively spliced isoform of *calt*, under gluconeogenic conditions and in streptozotocin (STZ)-treated *S. aurata*. Quantitative RT-PCR assays showed that increased p300 and c-Myb mRNA levels in the liver of starved *S. aurata* contribute to enhancing the transcription of cAlt2. Consistently, the administration of insulin decreased both p300 and c-Myb expression. The mRNA levels of p300 and c-Myb were also analyzed in the liver of STZ-induced diabetic *S. aurata*. Treatment with STZ increased the expression of p300, whereas it decreased c-Myb. Our findings suggest an involvement of p300 and c-Myb in up-regulation of cAlt2 in the liver of *S. aurata* under starvation. In addition, these results provide evidence for a role of p300 in diabetes.

Journal of Molecular Endocrinology (2010) **45**, 119–132

Introduction

Alanine aminotransferase (Alt, glutamate pyruvate transaminase, EC 2.6.1.2) is a pyridoxal enzyme that catalyzes the reversible transamination between α -L-alanine and α -ketoglutarate to form pyruvate and L-glutamate. By mediating the conversion of these four major intermediate metabolites, Alt provides a molecular link between carbohydrate and amino acid metabolism.

Alt activity in serum is clinically used as a marker of liver integrity or hepatocellular damage; Alt activity is significantly raised in a variety of hepatic injury conditions, including hepatitis, cirrhosis, and drug hepatotoxicity (Dufour *et al.* 2000, Glinghammar *et al.* 2009). Increased Alt activity is observed in rat liver after high protein intake, fasting, and administration of cortisol, and it is also observed in diabetic animals (Rosen *et al.* 1959). Furthermore, β -adrenergic agonists, such as epinephrine, glucagon, and norepinephrine, induce hepatic Alt activity in rats (Begum & Datta 1992).

Recent studies have associated high levels of Alt activity with pathologies such as obesity, muscle diseases, type 1 diabetes, coronary atherosclerotic

disease, and metabolic syndrome (Nathwani *et al.* 2005, Wannamethee *et al.* 2005, West *et al.* 2006, Iacobellis *et al.* 2007, Schindhelm *et al.* 2007). In addition, a rise of serum Alt activity within the reference values in healthy populations is considered a marker for the development of insulin resistance and type 2 diabetes (Vozarova *et al.* 2002, Hanley *et al.* 2004, West *et al.* 2006, Sattar *et al.* 2007).

Two Alt isoforms, ALT1 and ALT2, each encoded by a different gene, have been cloned from humans and mice (Sohocki *et al.* 1997, Yang *et al.* 2002, Jadhao *et al.* 2004). Human *ALT1* gene was cloned based on the amino acid sequence of liver cytosolic ALT (cAlt; Ishiguro *et al.* 1991), and mapped to human chromosome 8q24.3 (Sohocki *et al.* 1997). Yang *et al.* (2002) cloned another human ALT isozyme, ALT2, and mapped this gene to chromosome 16q12.1. Mouse *Alt1* and *Alt2* genes were mapped to chromosomes 15 and 8 respectively (Jadhao *et al.* 2004). Western blotting indicates that human ALT1 is mainly expressed in liver, skeletal muscle, kidney, and, to a lesser extent, in heart, whereas ALT2 is mainly expressed in heart and skeletal muscle. Immunoprecipitation assays demonstrate that ALT1 is the

major isoform expressed in human liver and quantitatively the most important Alt isozyme contributing to basal circulating levels of Alt activity in humans (Lindblom *et al.* 2007).

The hepatic activity of Alt is considered a good indicator of protein utilization in fish (Fynn-Aikins *et al.* 1995, Sanchez-Muros *et al.* 1998, Metón *et al.* 1999). In the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), Alt activity decreases following starvation, and is more sensitive than aspartate aminotransferase to changes in diet composition and ration size (Metón *et al.* 1999, Fernández *et al.* 2007). We cloned and reported the subcellular localization of *S. aurata* liver cytosolic (cAlt), homologous to mammalian ALT1) and mitochondrial (mAlt, homologous to mammalian ALT2) Alt isoforms. Expression of mAlt as a C- or N-terminal fusion with the enhanced green fluorescent protein in CHO cells allowed us to demonstrate that the mAlt N-terminus contains a mitochondrial targeting signal that directs the protein into the mitochondria. The primary structure of mAlt was the first amino acid sequence reported for a mitochondrial Alt in animals (Metón *et al.* 2004). A recent study by Yang *et al.* (2009) has indicated that the rat liver ALT2 isoform is likely to contain an N-terminal mitochondrial targeting signal, and has showed by western blotting that ALT2 is present in mitochondrial fractions. In a recent report, we showed that the *S. aurata calt* gene generates two cytosolic transcripts by alternative splicing: cAlt1 and cAlt2. The kinetic characterization and *in vivo* analysis of cAlt1 and cAlt2 expression under various metabolic conditions indicate that the proteins exert distinct roles in the liver of *S. aurata*: cAlt2 expression occurs in liver under gluconeogenic conditions, while cAlt1 is predominant during postprandial utilization of dietary nutrients (Anemaet *et al.* 2008).

Present understanding of control of Alt expression at the transcriptional level is limited. Gray *et al.* (2007) reported a reduction of ALT1 mRNA levels in the liver of Krüppel-like factor 15-deficient mice. Transfection experiments showed that peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonist and fenofibric acid induce specifically the human *ALT1* promoter in Huh-7 cells, whereas the human *ALT2* promoter is unaffected. CHIP analyses confirmed the binding of PPAR α and PPAR γ to the -574 site in the proximal human *ALT1* promoter (Thulin *et al.* 2008).

Since up-regulation of cAlt2 actually occurs in the liver of streptozotocin (STZ)-induced diabetic *S. aurata* (Anemaet *et al.* 2008), and in order to unravel the basis that governs *calt* transcription, in the present study, we isolated and characterized the *S. aurata calt* promoter. We show that p300 and c-Myb transactivate the *calt* promoter, and provide evidence that p300 may be involved in the pathogenesis of diabetes.

Materials and methods

Experimental animals

Gilthead sea bream (*S. aurata*) fingerlings were obtained from Tinamenor SA (Cantabria, Spain). Fish were maintained in 260-L aquaria supplied with recirculating seawater at 20 °C as described (Fernández *et al.* 2007). Fish were weighed every week to adjust for the quantity of diet supplied for each experiment. Fish were fed daily (1000 h) at 2.5% body weight with a diet containing 46% protein, 9.3% carbohydrates, 22% lipids, 10.6% ash, 12.1% moisture, and 21.1 kJ/g gross energy. The effect of starvation on the expression of p300 and c-Myb was analyzed in the liver of fish deprived of food for 20 days and in fed fish. To study regulation of p300 and c-Myb expression by insulin and STZ, the animals were divided into three groups. Twenty-two hours before sampling, two groups of fish received an i.p. injection with vehicle (0.01 M sodium citrate, pH 4.5), and another group was i.p. injected with STZ (600 mg/kg fish; Sigma-Aldrich). Six hours before sampling, one group of fish previously treated with vehicle received an i.p. dose of bovine insulin (10 units/kg fish; Sigma-Aldrich). Fish were killed by cervical section. Tissue samples were dissected out, immediately frozen in liquid nitrogen, and kept at -80 °C till use. To avoid stress, fish were anesthetized with MS-222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester; 1:12 500) before handling. The experimental procedures met the guidelines of the Animal Use Committee of the Universitat de Barcelona.

Cloning of the 5'-flanking region of cALT promoter from *S. aurata* by chromosome walking

To isolate the 5'-flanking region of *calt* gene from *S. aurata*, two rounds of genome walking were performed with the Universal GenomeWalker Kit (Clontech). Four genomic libraries were obtained by blunt-end digestion of *S. aurata* genomic DNA with DraI, EcoRV, PvuII, and StuI (Metón *et al.* 2006). A primary PCR was performed on each library with the gene-specific primer IGAL0502 (Table 1) and the adaptor primer AP-1 provided by the kit. A nested PCR was performed on the primary PCR product, using the gene-specific primer IGAL0501 (Table 1) and the adaptor primer AP-2 provided by the kit. The longer amplification product, a single band of ~600 bp (named s496), was obtained from the StuI library, and purified using the High Pure PCR Purification Kit (Hoffmann-La Roche). According to the DNA sequence obtained by the first round of genome walking, we designed the gene-specific primers IGAL0405 and IGAL0305 (Table 1) to further isolate the 5'-flanking region of *calt* by PCR, following the same amplification conditions. The nested PCR carried out

Table 1 *Sparus aurata* calt-specific primers used in the present study

	Sequence 5'–3'	Maps to
Primers		
IGAL0305	CAGCTTTTGGAGAAATTAGATATTAACCTG	–417 to –445
IGAL0405	TTGGCCACATAAAGGATAGTTCAGC	–396 to –420
IGAL0501	GTTGTTTTCCGCCGCTGTACCCTCTGGACTG	172 to 141
IGAL0502	GTTCCGCCCTGGTGGGACATGTTG	217 to 193
IGAL0505	CCTTAAAAATGTAATTACCTGACAGG	–496 to –523
IGAL0605	CCGGTACCATCAAATGTCTTCCCAAGCCC	–2096 to –2075
IGAL1007	GGAAGCTTGTGTTTTTGTGTTGTTGTTGTTG	196 to 172
IGAL1101	GGGGTACCAGGCGTGGCGTGGCGGTTGGGTGGG	–57 to –33
IGAL1102	GGGGTACCAGGCGTGGCGTGGCGCGCGGGTGGGAATATGAGCAGC- ACGAG	–57 to –16
IGAL1103	GGGAATTCAGCCGCGCGAGCAGGAGTGC CGGGAAGG	–91 to –55
IGAL12F	CTTTCAGATATCAGTCCAGAGGGTGACAGCGCGGAAAACAACA- ACAACAACAACAACAACAACAACA	130 to 195
IGAL13R	AGCTTGTGTTTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTTCCGCCGCTGTC- ACCCTCTGGACTGATATCTGAAAGGTAC	195 to 130
IGAL3001	GGGAATTCAGCCAACCGCGAGCAAAAAGCGCGGAAGGCGTGGC- GTGG	–90 to –45
IGALHND	GGAAGCTTGAAGGAGAGGTTGAGGAGTG	+126 to +107
IGALSAC	GGGAGCTCCTGCCTATCACTTGCATT	–495 to –477
calt –91/–51	GAATTCAGCCAACCGCGAGCAGGAGTGC CGGGAAGGCGTG	–91 to –51
calt –66/–27	GTGCGCGGAAGGCGTGGCGTGGCGGTTGGGTGGGAATATGT	–66 to –27
calt –57/–27	AGGCGTGGCGTGGCGGTTGGGTGGGAATATGG	–57 to –27
calt –41/+6	TTGGGTGGGAATATGAGCAGCACGAGAGCGCGCGAGAGGCACAAC	–41 to +5
calt –91/–51mutp300	GAATTCAGCCAACCGCGAGCAAAAAGCGCGGAAGGCGTG	–91 to –51
calt –91/–59mutMyb1	GAATTCAGCCGCGCGAGCAGGAGTGC CGCGGG	–91 to –59
calt –57/–27mutMyb2	AGGCGTGGCGTGGCGCGCGGGTGGGAATATGG	–57 to –27

The following primers contain restriction sites (underlined): IGAL0605 (KpnI), IGAL1007 (HindIII), IGAL1101 (KpnI), IGAL1102 (KpnI), IGAL1103 (EcoRI), IGAL3001 (EcoRI), IGALHND (HindIII), and IGALSAC (SacI). IGAL12F and IGAL13R contain protruding ends resulting from restriction with HindIII and KpnI respectively (underlined). Bold and double underlined letters indicate site-directed mutations in primers IGAL1102, IGAL1103, IGAL3001, calt –91/–51mutp300, calt –91/–59mutMyb1, and calt –57/–27mutMyb2. For double-stranded oligonucleotides calt –91/–51, calt –66/–27, calt –57/–27, calt –41/+6 and calt –91/–51mutp300, calt –91/–59mutMyb1, and calt –57/–27mutMyb2 used in gel shift experiments, only the forward primers are shown. Mapping positions for IGAL0501, IGAL0502, IGAL1007, IGAL12F, and IGAL13R are calculated from *S. aurata* cAlt2 cDNA. For other primers, mapping positions are calculated from *S. aurata* calt gene relative to the transcription start site.

on the EcoRV library gave rise to a band of ~1600 bp (s1603). The DNA fragments s496 and s1603 were ligated into pGEM-T Easy (Promega) to generate pGEM496 and pGEM1603 respectively. Two independent clones were fully sequenced on both strands, following the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Construction of reporter gene plasmids

The reporter construct pGalt496 was generated by PCR using pGEM496 as a template and oligonucleotides IGALSAC (with a 5'-anchor sequence containing a SacI site; Table 1) and IGALHND (with a 5'-anchor sequence containing a HindIII site; Table 1). The PCR product was digested with SacI/HindIII and ligated into the promoterless luciferase reporter plasmid pGL3-Basic (Promega), previously restricted with the same enzymes. The pGalt2096 construct was originated by ligation of s1603 fragment into pGalt496. To this end, a PCR using pGEM1603 as a template and the

primer pair IGAL0505/IGAL0605 (Table 1) was performed to add a 5'-KpnI anchor to the s1603 fragment. The resulting product was filled-in with Klenow enzyme, digested with KpnI, and ligated into pGalt496, previously digested with SacI, filled-in with Klenow, and restricted with KpnI. The reporter constructs pGalt399, pGalt173, pGalt89, pGalt12, and pGalt2096Δ89–11 were produced by chewing back, fill-in, and self-ligation of pGalt2096 after digestion with MisI/KpnI, Pfl23II/KpnI, EcoRI/KpnI, Paul/KpnI, and EcoRI/PauI respectively. To obtain the pGalt57 reporter construct, a PCR was performed using oligonucleotides IGAL1101/IGALHND and pGalt2096 as a template. The PCR product was digested with KpnI/HindIII and ligated to the main fragment resulting from digestion of pGalt2096 with the same enzymes. The pGalt173mutp300 construct was generated by PCR with the primer pair IGAL3001/GLprimer2 (Promega) using pGalt173 as a template. The amplified product was digested with EcoRI/HindIII and ligated to the longer DNA fragment obtained after restriction of pGalt173 with the

same enzymes. The reporter construct pGalt173mut-Myb1 was obtained by PCR, using the primer pair IGAL1103/IGALHND and pGalt2096 as a template. The PCR product was digested with EcoRI/HindIII and ligated to the main fragment resulting from restriction of pGalt173 with the same enzymes. To generate pGalt57mutMyb2, a PCR was performed with the primer pair IGAL1102/IGALHND and pGalt2096 as a template. The PCR product was restricted with KpnI/HindIII and ligated to the main fragment resulting from digestion of pGalt2096 with the same enzymes. All constructs were verified by cycle sequencing.

Cell transfection and luciferase assay

Sea bass larvae (SBL) cells (Castric 1984) were grown at 20 °C in Modified Eagle's Medium (MEM), supplemented with 10% FCS, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml STZ. Transfection experiments on SBL cells grown at 50–60% confluence were performed with FuGENE6 Transfection Reagent (Hoffmann-La Roche) on 6-well plates. Cells were transfected with 0.8 µg of the reporter construct and, when necessary, 100 ng of expression plasmids encoding p300, p300DY, or c-Myb. To correct for variations in transfection efficiency, 200 ng pCMVβ was included in each transfection. To ensure equal DNA amounts, empty plasmids were added in each transfection. The cells were harvested 48 h later, washed in PBS, and incubated for 15 min in 300 µl of cell culture lysis reagent (Promega). After removal of cell debris by centrifugation at 10 000 g for 15 s, luciferase activity was measured in 5 µl of the supernatant after the addition of 25 µl of luciferase assay reagent (Promega). Peak light emission was recorded on a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). β-Galactosidase activity in the clear lysate was measured as previously described (Metón *et al.* 2006). Expression plasmids encoding rat p300 (pCMV-p300), a mutant form of p300 lacking endogenous acetyltransferase activity (pCMV-p300DY; Ito *et al.* 2001), and mouse c-Myb (pCMV-cMyb; Oelgeschläger *et al.* 1995) were kindly provided by Dr D Haro (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain), Dr Tso-Pang Yao (Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke University, USA), and Dr Bernard Lüscher (Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany) respectively.

Electrophoretic mobility shift assay

Double-stranded oligonucleotides used in gel shift experiments were (only the forward oligonucleotide is shown) p300-cons (5'-CGCACGCGGCAGGGAG-TGAGTGGTAGTGCC-3'), Myb-cons (5'-GGTAACGG-TTCCCAACGGCGGTTGGGGTAACGGTTGGT-3'),

calt-91/-51, calt-66/-27, calt-57/-27, calt-41/+6, calt-91/-51mutp300, which contains a mutated p300 response element, and calt-91/-59mutMyb1 and calt-57/-27mutMyb2, both containing mutated c-Myb putative sites (Table 1). After 30 min of incubation at 37 °C in the presence of terminal transferase (Hoffmann-La Roche) in a 20 µl reaction, 200 pmol of the double-stranded oligonucleotides were 3' end labeled with digoxigenin-11-ddUTP. The reaction was stopped by adding 2 µl of 0.2 M EDTA. Binding reactions were carried out in a total volume of 20 µl containing 100 mM HEPES, pH 7.6, 5 mM EDTA, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM dithiothreitol (DTT), 1% Tween 20, 150 mM KCl, 1 µg of non-specific competitor poly [d(I-C)] (Hoffmann-La Roche), nuclear extracts of SBL cells overexpressing p300 or c-Myb, and the labeled probe. The DNA-protein complexes were electrophoresed at 4 °C on 5% polyacrylamide gel, with 0.5× Tris-borate-EDTA as buffer. DNA was then transferred by contact blotting (2 h at room temperature) to Nytran membranes (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA). DNA was cross-linked to membranes by u.v. irradiation for 3 min. Labeled probes were immunodetected with anti-digoxigenin conjugated with alkaline phosphatase (Hoffmann-La Roche), with CDP-Star (Hoffmann-La Roche) as a chemiluminescent substrate. Membranes were exposed to Hyperfilm ECL (Amersham). For competition experiments, SBL nuclear extracts were pre-incubated for 30 min with a 5- and 20-fold molar excess of unlabeled double-stranded p300-cons or Myb-cons oligonucleotides. For supershift assays, nuclear proteins extracted from p300- or c-Myb-overexpressing SBL cells were incubated in the presence of anti-p300 or anti-c-Myb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 30 min at room temperature before the addition of the probe.

Nuclear extracts

Nuclear extracts were prepared from SBL cells. Cells were grown to near confluence, washed, and scraped into 1.5 ml of cold PBS. All the following steps were performed at 4 °C. The cells were pelleted by centrifugation for 10 s at 1000 g and resuspended in 400 µl of buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). Following incubation for 10 min, cells were vortexed for 10 s. Samples were centrifuged for 10 s, and the pellet was resuspended in 20 µl of cold buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM PMSF) and incubated for 20 min for high salt extraction. Cell debris was removed by centrifugation for 2 min. The supernatant fraction was aliquoted and stored at -80 °C.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from *S. aurata* liver by the Total Quick RNA Cells and Tissues kit (Talent, Trieste, Italy). Five micrograms of total RNA were reverse transcribed by incubation with 5× First Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM DTT, 0.5 mM dNTPs, 6.25 ng/μl random hexamers, 40 U/μl rRNasin (Promega), and 200 U/μl M-MLV RT (Invitrogen) for 1 h at 37 °C. The cDNA product was used for subsequent real-time quantitative PCR. The mRNA levels of p300 and c-Myb were determined in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using 0.4 μM of each primer, 10 μl of SYBR Green (Applied Biosystems), and 1.6 μl of the diluted cDNA mixture in a final volume of 20 μl. Primer pairs used were IMP303 (5'-GAAC-CAGGTGATGAATGGCTCC-3')/IMP304 (5'-CTTGTT-CATCGCTCCAGGTTGC-3') for p300; and MG0907 (5'-CGTTGGTCCGTGATTGCTAA-3')/MG0908 (5'-CT-CGTAGATGATTCGGTCTC-3') for c-Myb. Oligonucleotides MC17 (5'-CGTCCACCGCAAATGCTTC-3') and MC18 (5'-GTTGTTGGCGTTGGTTGG-3') were used to amplify β-actin from all the samples on each plate as a housekeeping gene to normalize expression levels of targets between different samples and to monitor assay reproducibility. Variations in gene expression were calculated by the standard $\Delta\Delta C_t$ method. Oligonucleotides IMP303, IMP304, MG0907, MG0908, MC17, and MC18 were designed from *S. aurata* p300, c-Myb, and β-actin cDNA fragments (GenBank accession numbers GU441458, FJ797059 and X89920).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-factor ANOVA using a computer program (StatView, SAS Institute, Cary, NC, USA). Differences were determined by Fisher's protected least significant difference multiple range test.

Results

Cloning of the 5'-flanking region of *S. aurata calt* gene

To clone and characterize the promoter region of *calt* gene from *S. aurata*, chromosome walking was performed on genomic DNA isolated from this species. To this end, *calt*-specific oligonucleotides were designed from the previously cloned *S. aurata* cAlt2 cDNA (Anemaet *et al.* 2008). A first round of genome walking resulted in the specific amplification of a single fragment of ~600 bp (here named s496) from the StuI library, which corresponds to positions -496/+139 relative to the previously determined transcription start site (Metón *et al.* 2004). The s496 fragment was isolated and cloned into pGEM-T Easy to generate pGEM496. On sequencing, this fragment was completely homologous with the 139 bases at the 5' end of *S. aurata* cAlt2 cDNA (Anemaet *et al.* 2008).

A second round of chromosome walking on *S. aurata* genomic DNA was performed, using primers designed from the s496 fragment, to further isolate the 5'-flanking *calt* region. The longer amplification product, an ~1600 bp single fragment (s1603), was obtained from the EcoRV library. This fragment was isolated and ligated into pGEM-T Easy to generate pGEM1603. After sequencing, this fragment showed complete homology with the 51 bases at the 5' end of the product obtained by the first round of chromosome walking. Altogether, two consecutive rounds of chromosome walking allowed us to isolate 2235 bp from the 5'-flanking region of *S. aurata calt*. This fragment comprises positions -2096 to +139 relative to the transcription start site: its nucleotide sequence was submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank Databases under the accession number DQ114991 (Fig. 1).

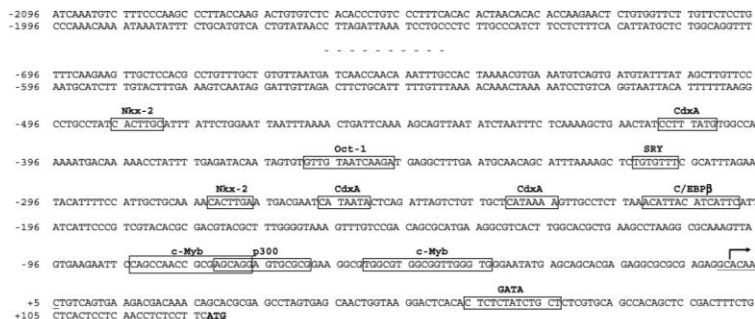


Figure 1 Sequence analysis of the 5'-flanking region of the *S. aurata calt* gene. The sequence upstream from the transcription start site, isolated by chromosome walking, is shown in capital letters. Putative binding sites for transcription factors in s496 fragment are boxed. The transcription start site is indicated by an arrow. The Inr-like element is underlined. The translation start codon for cAlt2 is in bold and double-underlined.

Identification of a functional *S. aurata calt* promoter

To determine whether the isolated genomic DNA-flanking region of *calt* gene contains a functional promoter, nucleotide positions -2096 to $+126$ relative to the transcription start site were subcloned in the promoterless pGL3-Basic plasmid, upstream from the luciferase reporter gene (pGalt2096). The recombinant plasmid pGalt2096 was transiently cotransfected into SBL cells together with a LacZ-containing plasmid (pCMV β) as an internal control for transfection efficiency. The cell lysate was assayed for luciferase and β -galactosidase activities 48 h after transfection. This construct yielded a more than 80-fold increase in luciferase activity over the promoterless vector, pGL3-Basic (Fig. 2). This result indicates that a core functional promoter for basal transcription is contained within the 2096 nucleotides upstream from the transcription start site.

To examine the promoter functional regions involved in modulation of basal *calt* expression in *S. aurata*, sequential 5'-deletion analysis of the promoter fragment was performed. Deletion fragments, with 5' ends ranging from -2096 to -89 and 3' ends at $+126$ (lacking the cAlt2 ATG start codon to prevent any false negative results due to the expression of a bicistronic message), were fused to the luciferase reporter gene and transfected into SBL cells. The longest 5' construct (pGalt2096) gave a more than 80-fold increase in luciferase activity over pGL3-Basic. Sequential 5'-deletion of pGalt2096 revealed reduced promoter activity. Decreased promoter activity was observed using the construct containing the promoter region spanning -89 to $+126$ (pGalt89), which showed induction

40 times greater than the promoterless pGL3-Basic did. No activity was found when the smallest construct (pGalt12; -12 to $+126$) was used. Moreover, when compared to pGalt2096, promoter activity decreased twofold due to deletion of the region encompassing the nucleotide positions -89 to -11 (pGalt2096 Δ 89–11). These results confirmed that the minimal core promoter of the *S. aurata calt* gene is located in the region within 89 bp upstream from the transcriptional start, and suggest that *cis*-acting elements may be located in this area.

Transactivation of *calt* promoter by p300 and c-Myb

In silico analysis of *calt* promoter with TFSEARCH (Heinemeyer *et al.* 1998) revealed several putative transcription factor-binding sites in the proximal promoter region (Fig. 1). Amongst the potential transcription factors were sites for p300 and c-Myb. Cotransfection of SBL cells with the pGalt2096 construct in the presence of a p300 expression plasmid resulted in a more than 23-fold increase in *calt* promoter activity. p300 is a nuclear phosphoprotein that acts as a transcriptional coactivator. p300 promotes gene transcription by bridging between DNA-binding transcription factors and the basal machinery, by providing a scaffold for integrating transcription factors, and by modifying transcription factors and chromatin through acetylation (Kalkhoven 2004, Ghosh & Varga 2007). Reporter constructs containing 5'-deletion of the promoter fragment up to 89 nucleotides upstream from the transcription start site displayed similar p300-mediated enhanced *calt*

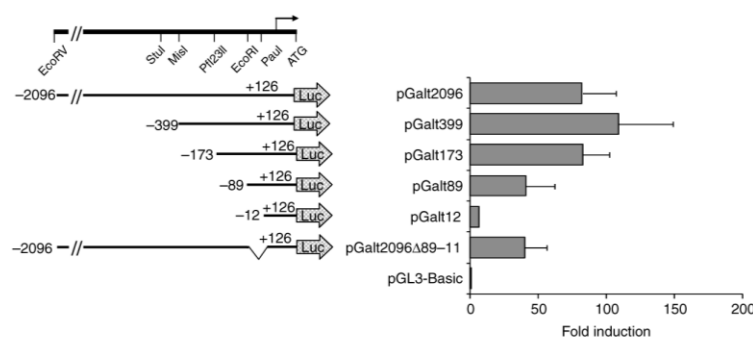


Figure 2 Deletion analysis of the 5'-flanking region of *S. aurata calt* in SBL cells. The top left part represents the genomic organization of the 5'-flanking region of *S. aurata calt*. Relevant restriction sites and the translation start codon for cAlt2 are indicated. Nucleotide numbering starts with $+1$ corresponding to the transcription start site, which is indicated by an arrow. Fragments of the *S. aurata calt* promoter with varying 5' ends and an identical 3' end ($+126$) were fused to the luciferase reporter gene in pGL3-Basic vector. SBL cells were transfected with the reporter constructs pGalt2096, pGalt399, pGalt173, pGalt89, pGalt12, pGalt2096 Δ 89–11, or pGL3-Basic, along with pCMV β (lacZ) to normalize for transfection efficiency. Luciferase activity is expressed as a fold increase over promoterless reporter plasmid pGL3-Basic. Results shown are the mean \pm s.d. from at least three independent experiments performed in duplicate.

promoter activity in SBL cells. In contrast, no enhancement of the promoter activity was detected when the shortest construct (pGalt12) was used. Since p300 can interact simultaneously with the basal transcription machinery and with one or more upstream transcription factors (Chan & La Thangue 2001, Kalkhoven 2004), our findings suggested that a *cis* element located within 89 bp upstream from the transcription start site, here named the p300 response element, may be responsible for the p300-mediated transactivation of *calt* promoter. Consistently, no transactivation by p300 was observed when cotransfected with the pGalt2096Δ89–11 reporter construct, which lacks the region within 89 bp upstream from the transcriptional start (Fig. 3A).

Putative c-Myb-binding sites were located within nucleotide positions –85 to –68 and –52 to –35 relative to the transcription start site of *S. aurata calt* and, therefore, close to the p300 response element (–73 to –60). Among other transcription factors, p300 is a well-established coactivator of c-Myb through acetylation of the latter (Tomita *et al.* 2000, Sandberg *et al.* 2005). To address the role of c-Myb in *calt* expression, we performed transfection experiments on SBL cells. Cotransfection of a plasmid encoding c-Myb together with the pGalt2096 construct resulted in a more than threefold increase in *calt* promoter activity (Fig. 3B). Reporter constructs pGalt173 and pGalt89 displayed similar *calt* promoter transactivation after cotransfection with c-Myb. No enhancement of the promoter activity was detected when the shortest construct (pGalt12) was used. Furthermore, no transactivation by c-Myb was observed when cotransfected with pGalt2096Δ89–11 reporter construct, which lacks the region within 89 bp upstream from the transcriptional start. These results suggest that c-Myb may transactivate the *S. aurata calt* promoter by acting via at least one response element located within 89 bp upstream from the transcriptional start. Cotransfection of SBL cells with expression plasmids encoding p300 and c-Myb caused additive effects on the reporter activity of pGalt89 or longer constructs (Fig. 3C).

Although the *S. aurata calt* and human *ALTI* promoter sequences share a low general homology, *in silico* analysis of human *ALTI* with TFSEARCH (Heinemeyer *et al.* 1998) revealed the presence of putative binding sites for p300 and c-Myb close to the transcription start site (data not presented), similarly as for the *S. aurata* gene.

p300 is part of a complex that binds to the *calt* promoter

The shortest reporter construct that showed p300-mediated transactivation (pGalt89) contains a putative p300 response element at positions –73 to –60

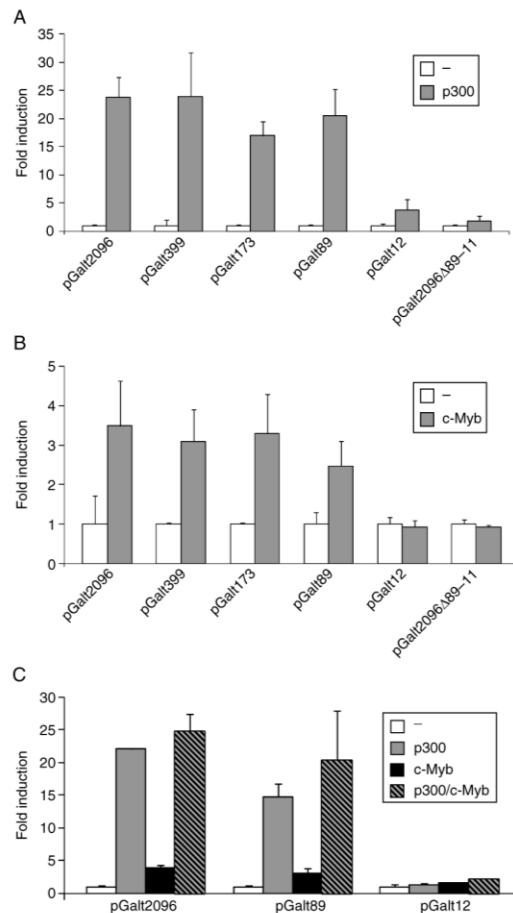


Figure 3 Effect of p300 and c-Myb on *S. aurata calt* promoter transcription in SBL cells. The cells were transfected with the promoter constructs pGalt2096, pGalt399, pGalt173, pGalt89, pGalt12, or pGalt2096Δ89–11, with or without expression plasmids encoding p300 (A) or c-Myb (B). (C) SBL cells were transfected with the promoter constructs pGalt2096, pGalt89, or pGalt12, with or without expression plasmids encoding p300 and c-Myb. The promoter activity of the constructs alone was set at 1. The data represent the mean \pm s.d. values of three independent duplicate experiments.

relative to the transcription start site. To analyze whether p300 is part of a protein complex that indeed binds to the putative p300 response element at positions –73 to –60, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments were performed. When *calt*–91/–51 (harboring the putative p300 response element) was used as a probe and nuclear extracts were prepared from SBL cells overexpressing p300, one major shifted band was observed. A DNA–protein complex with the same mobility was seen when a consensus p300 probe was used (p300-cons). The shifted band disappeared in competition assays

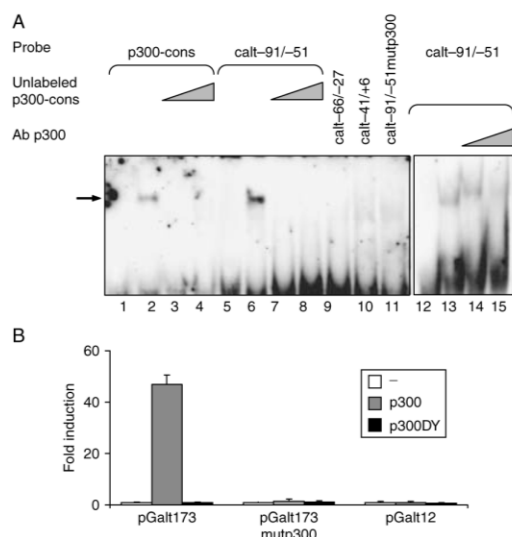


Figure 4 Effect of mutating the p300 response element on *S. aurata calt* promoter binding and transcription in SBL cells. (A) The left part of the figure shows an electrophoretic mobility shift assay of a competition analysis, using nuclear extracts of SBL cells overexpressing p300 incubated with labeled oligonucleotides p300-cons (lanes 1–4) or calt–91/–51 (lanes 5–8). Lanes 1 and 5 contained no nuclear extract. Lanes 2 and 6 correspond to binding of nuclear extracts to labeled probes without competitor. Lanes 3, 4, 7, and 8 represent competition with 5- and 20-fold molar excess of unlabeled double-stranded competitor (p300-cons). Lanes 9, 10, and 11 show nuclear extracts of p300-overexpressing SBL cells incubated with probes calt–66/–27, calt–41/+6, and calt–91/–51mutp300 respectively. The right part of the figure shows a supershift assay using nuclear extracts of p300-overexpressing SBL cells incubated with labeled oligonucleotide calt–91/–51 in the absence (lanes 12–13) or presence of 2 μ g (lanes 14) and 8 μ g (lanes 15) of antibody against p300. Lane 12 contained no nuclear extract. DNA–protein complexes are indicated by an arrow. (B) SBL cells were transfected with pGalt173, pGalt173mutp300, or pGalt12, with or without expression plasmids encoding p300 or p300DY. The promoter activity of the constructs alone was set at 1. The data represent the mean \pm s.d. values of three independent duplicate experiments.

performed with 5- and 20-fold molar excess of unlabeled p300-cons (Fig. 4A). No shifted band could be detected when using calt–66/–27 (partial deletion of p300 consensus-like sequence) and calt–41/+6 (absence of p300 consensus-like sequence) probes.

To test whether mutations in the putative p300 site could abolish formation of the DNA–protein complex, we performed bandshift assays using nuclear extracts of SBL cells overexpressing p300 and a labeled probe harboring positions –91 to –52 of the *calt* gene in which the p300 box was mutated (calt–91/–51mutp300). As shown in Fig. 4A, the complex shifted using p300-cons and calt–91/–51 probes disappeared when the calt–91/–51mutp300 probe was used. In addition, a supershift assay was performed

with antibodies against p300. As shown in Fig. 4A, a supershift band was observed when 2 μ g of the antibody were used. A higher concentration of antibody (8 μ g) blocked the binding of p300 to the probe. Taken together, these data confirm that p300 is part of a complex that binds to the p300 response element at positions –73 to –60 of *calt* gene.

Mutating the p300 response element abolishes transactivation by p300

To generate a reporter construct with a mutated p300 response element (pGalt173mutp300), the same mutations described for the double-stranded oligonucleotide calt–91/–51mutp300 used in bandshift assays were introduced into the promoter construct pGalt173. Cotransfection experiments with pGalt173mutp300 and the p300 expression vector were performed in SBL cells to analyze the level of transactivation due to the wild-type or the mutant reporter construct. p300 did not enhance the transcription of the construct harboring the mutated p300 response element (Fig. 4B). This finding allowed us to hypothesize that the p300 response element at positions –73 to –60, relative to the transcriptional start of *S. aurata calt* promoter, is responsible for transactivation by p300.

Histone acetyltransferase activity of p300 is essential for transcriptional activation of *calt* gene

p300 couples transcription factor recognition to chromatin remodeling through acetylating histones and non-histone proteins, such as a number of transcription factors (Das *et al.* 2009, Marmorstein & Trievel 2009). This brought us to the question of whether p300-mediated acetylation plays a role in p300 transactivation of the *calt* promoter. A point mutant version of p300, p300DY (Ito *et al.* 2001), which lacks histone acetyltransferase (HAT) activity, was cotransfected with *calt* promoter constructs in SBL cells. p300DY did not activate any of the reporter constructs transactivated by wild-type p300, such as pGalt173 (Fig. 4B). These results indicate that the HAT domain of p300 is essential for p300-induced *calt* transactivation.

c-Myb binds to c-Myb consensus elements of *calt* promoter

Two putative c-Myb-binding-like sites are located in the proximal promoter region of *cALT*; one site partially overlaps the p300 response element (–85 to –68) and another element is located downstream (–52 to –35). To investigate whether c-Myb binds to either one or both putative c-Myb response elements, EMSA

experiments were performed. Competition analysis performed in the presence of 5- and 20-fold molar excess of unlabeled consensus c-Myb probe (Myb-cons), using probes calt-91/-51 (harboring the upstream response element for c-Myb), calt-57/-27 (harboring the downstream response element for c-Myb), and nuclear extracts obtained from SBL cells overexpressing c-Myb, resulted in the disappearance of one major shifted band (Fig. 5A). These data suggest that c-Myb can bind to both c-Myb boxes, located at nucleotides -85 to -68 (upstream site) and -52 to -35 (downstream site) relative to the transcriptional start in the *S. aurata* calt promoter.

Bandshift assays were performed to analyze whether introduction of mutations in the putative upstream and downstream c-Myb sites abolished formation of the

DNA-transcription factor complexes. To this end, nuclear extracts of SBL cells overexpressing c-Myb and labeled probes harboring mutated upstream (calt-91/-51mutMyb1) and downstream (calt-57/-27mutMub2) c-Myb boxes were used. As shown in Fig. 5A, the shifted complex disappeared when the calt-91/-51mutMyb1 and calt-57/-27mutMub2 probes were used. Supershift assays carried out with 2 μ g-specific antibodies against c-Myb blocked the binding of c-Myb to calt-91/-51 and calt-57/-27 probes. From these data, we hypothesized that c-Myb might bind to both the upstream and the downstream c-Myb sites located at positions -85 to -68 and -73 to -60 of calt gene.

Mutating the downstream c-Myb box abolishes transactivation by c-Myb

To further distinguish whether the upstream and downstream c-Myb boxes contribute equally to the c-Myb-dependent transactivation of the calt promoter, we generated the reporter construct pGalt57, which lacks the upstream c-Myb element, but retains the downstream box. Cotransfection of SBL cells with pGalt57 gave similar c-Myb-dependent transactivating rates as reporter constructs harboring both upstream and downstream sites, such as pGalt173 (Fig. 5B). These results suggest that the upstream c-Myb box (-85 to -68) is not functional. As expected, since pGalt57 lacks the p300 response element, p300 had no effect on the reporter activity of pGalt57. The fact that c-Myb was still able to activate the transcription of pGalt57 revealed that this effect was a separate event not related to the p300 response element located at positions -73 to -60.

Two reporter constructs were designed to carry mutated c-Myb upstream and downstream sites: pGalt173mutMyb1, which contains an upstream c-Myb site with the mutations that were introduced in the double-stranded oligonucleotide calt-91/-59mutMyb1 used in bandshift assays; and pGalt57mutMyb2, which contains a downstream c-Myb site with the mutations that were introduced in the double-stranded oligonucleotide calt-57/-27mutMyb2. SBL cells were cotransfected with the c-Myb expression vector and pGalt173mutMyb1 or pGalt57mutMyb2 to compare the level of transactivation due to the wild-type or the mutant reporter constructs. Similar transactivation values were observed using pGalt173mutMyb1, pGalt173, or pGalt57, which is consistent with the suggestion that the upstream box is not responsible for the transactivating effect of c-Myb. In contrast, c-Myb did not activate the transcription of the construct harboring the mutated downstream c-Myb box (pGalt57mutMyb2, Fig. 5B). This finding led us to conclude that the c-Myb box located at positions -52

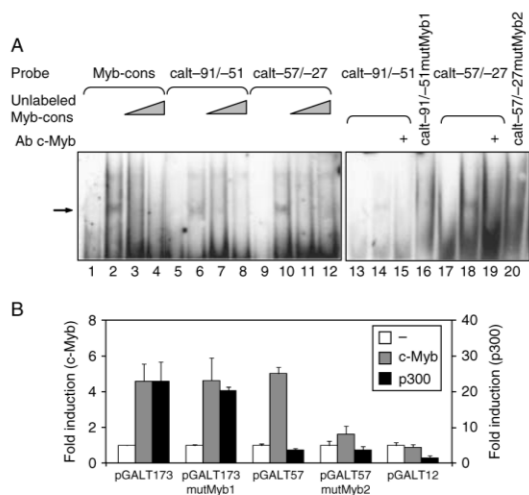


Figure 5 Effect of mutating the c-Myb response element on *S. aurata* calt promoter binding and transcription in SBL cells. (A) The left part of the figure shows an electrophoretic mobility shift assay of a competition analysis using nuclear extracts of SBL cells overexpressing c-Myb incubated with labeled oligonucleotides Myb-cons (lanes 1–4), calt-91/-51 (lanes 5–8), or calt-57/-27 (lanes 9–12). Lanes 1, 5, and 9 contained no nuclear extract. Lanes 2, 6, and 10 show binding of nuclear extracts to labeled probes without competitor. Lanes 3, 4, 7, 8, 11, and 12 correspond to competition with 5- and 20-fold molar excess of unlabeled double-stranded competitor (Myb-cons). The right part of the figure includes a supershift assay using nuclear extracts of c-Myb-overexpressing SBL cells incubated with labeled oligonucleotides calt-91/-51 and calt-57/-27 in the absence (lanes 13–14 and 17–18) or presence of 2 μ g (lanes 15 and 19) of antibody against c-Myb. Lanes 13 and 17 contained no nuclear extract. Lanes 16 and 20 show nuclear extracts of c-Myb-overexpressing SBL cells incubated with probes calt-91/-51mutMyb1 and calt-57/-27mutMyb2 respectively. DNA-protein complexes are indicated by an arrow. (B) SBL cells were transfected with pGalt173, pGalt173mutMyb1, pGalt57, pGalt57mutMyb2, or pGalt12, with or without expression plasmids encoding c-Myb or p300. The promoter activity of the constructs alone was set at 1. The data represent the mean \pm s.d. values of three independent duplicate experiments.

to -35, relative to the transcriptional start of the *S. aurata calt* promoter, is responsible for the transactivating effect of c-Myb.

Nutritional and hormonal regulation of p300 and c-Myb expression in liver of *S. aurata*

Having established transactivation of the *calt* promoter by p300 and c-Myb, we next asked whether the expression of p300 and c-Myb is controlled by nutritional and hormonal regulation in the liver of *S. aurata*. We showed elsewhere that alternative splicing of *calt* gene in *S. aurata* generates two isoforms: cAlt1 and cAlt2. Specifically, the hepatic expression of *S. aurata* cAlt2 increased under gluconeogenic conditions, such as starvation and STZ-induced diabetes (Anemaet *et al.* 2008).

Quantitative RT-PCR assays showed that starvation similarly affected the expression of p300 and c-Myb. Both p300 and c-Myb mRNA levels significantly increased 1.3- and 1.4-fold respectively in the liver of 20-day-starved *S. aurata* (Fig. 6A). The administration of insulin did not cause significant changes in the expression of p300 6 h after the treatment, although a

tendency to decrease to about 80% of the values in control animals was observed. A significant 55% decrease in c-Myb mRNA levels was found in the liver 6 h after insulin administration (Fig. 6B). STZ is a glucosamine-nitrosourea derivative widely used to generate diabetic animal models through β cell necrosis (Junod *et al.* 1969, Like & Rossini 1976, Wilson & Leiter 1990). As it is the characteristic of the diabetogenic action of STZ, significant hyperglycemia (175.8 ± 53.6 mg/dl, mean \pm s.d., $n=4$ vs 94.3 ± 2.7 mg/dl, mean \pm s.d., $n=4$ in control animals; $P<0.05$) followed 22 h after i.p. administration of 600 mg/kg STZ to *S. aurata*. The administration of STZ significantly up-regulated p300 1.5-fold in the liver of 22-h-treated animals. However, STZ promoted a decrease in c-Myb expression to about 25% of the levels in control fish (Fig. 6B).

Discussion

The liver plays important roles in regulating blood levels of amino acids and synthesizing glucose from excess amino acids. In this tissue, Alt has an essential function in intermediary metabolism to obtain energy and to provide gluconeogenic substrates. To assess the transcriptional regulation of *calt* gene in *S. aurata*, we addressed cloning and characterization of the *calt* promoter. The genomic fragment isolated is the first *calt* gene promoter reported for animals other than humans, and it allowed us to identify two functional *cis* elements involved in transactivation by p300 and c-Myb in the proximal region of the *calt* promoter.

The *S. aurata calt* promoter does not contain a TATA box. However, it includes an initiator (Inr)-like element that overlaps the transcription start site. The functionality of the putative promoter region of fish *calt* was tested by transient transfection of SBL cells with fusion constructs of the isolated genomic fragment to the luciferase reporter gene. Sequential 5'-deletions of the 2235 bp fragment and analysis of promoter activity after transfection of SBL cells with the deleted constructs allowed us to conclude that the promoter region within 89 bp upstream from the transcription start site is essential for transcriptional basal activity of *calt* and constitutes the core functional promoter of this gene.

p300 and CBP have emerged as transcriptional coactivator proteins that interact with and modulate the activity of a wide array of transcription factors bound at upstream activator elements (Shiama 1997). Transient transfection experiments and EMSA analysis demonstrated that p300 confers an activating signal on the *calt* promoter. This is achieved by forming part of a complex that binds to a p300 response element located between -73 and -60 bp upstream from the transcription start site of the *S. aurata* liver *calt* gene

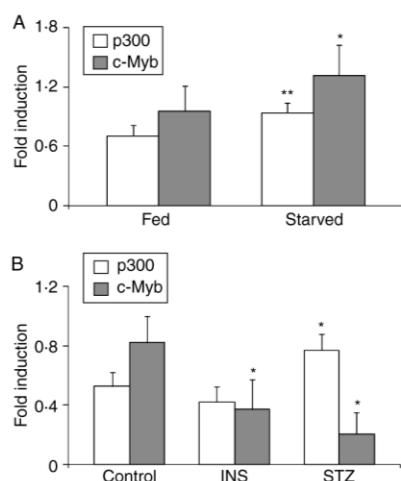


Figure 6 Effect of starvation, insulin, and streptozotocin on p300 and c-Myb mRNA levels in liver of *S. aurata*. (A) Quantitative RT-PCR assays of p300 and c-Myb mRNA levels performed on total RNA isolated from liver of fed and 20-day-starved fish. The mRNA levels of p300 and c-Myb relative to β -actin mRNA are expressed as mean \pm s.d. of four fish. Statistical significance related to fed animals is indicated as follows: * $P<0.05$; ** $P<0.01$. (B) Quantitative RT-PCR assays carried out on total RNA isolated from liver of fish after treatment with vehicle (control; 0.01 M sodium citrate, pH 4.5), insulin (INS; 10 U/kg fish; 6 h), or streptozotocin (STZ; 600 mg/kg fish; 22 h). The mRNA levels of p300 and c-Myb relative to β -actin mRNA are expressed as mean \pm s.d. of four animals. Statistical significance related to control animals is indicated as follows: * $P<0.05$.

promoter. Recruitment of proteins with HAT activity, such as p300, to the Inr element of the *calt* promoter may provide an open DNA configuration precisely at the site of transcription initiation. Histone acetylation in the proximal *calt* promoter region probably makes chromatin more accessible to other transcription factors and the basal transcriptional machinery. Targeting of p300 to the Inr element might enable the recruitment of TFIID to the *calt* promoter, as suggested for other TATA-less Inr-containing promoters (Abraham *et al.* 1993, Swope *et al.* 1996).

Apart from acetylating histones, p300 has been shown to acetylate several transcription factors in a regulated manner and is recruited to the various promoters in response to several stimuli. Many of the p300 mutations identified in tumors actually result in the loss of acetyltransferase activity (Gayther *et al.* 2000), suggesting that the ability of p300 to acetylate one or more cell proteins may be critical for their functions in growth control. Since an acetyltransferase-deficient point mutant of p300 (p300DY) failed to induce the acetylation of the tumor suppressor p53, Ito *et al.* (2001) concluded that binding between p53 and p300 is necessary for p300-mediated p53 acetylation. Transfection experiments in SBL cells using p300DY show that an acetylase-deficient mutant p300 was unable to induce *calt* promoter activity, indicating that the acetyltransferase activity of p300 is essential for the p300-mediated transcriptional activation of *S. aurata calt*.

Our findings suggest that p300 may induce *calt* promoter activity by acetylating histones, to promote a transcriptionally favorable structure of the nucleosome at the transcriptional start, and transcription factors such as c-Myb. The c-Myb gene encodes a proto-oncogene that leads to viral myeloblastosis in avian species (Beug *et al.* 1982). The role of c-Myb as a transcription factor has been extensively studied in hematopoietic stem cells. However, the expression of c-Myb seems to be required in a number of other tissues (Ramsay 2005). The transcriptional activity of c-Myb and other transcription factors is regulated through binding the KIX domain of p300 (Kasper *et al.* 2002, Kauppi *et al.* 2008). Two putative c-Myb boxes were found in the *S. aurata calt* promoter at positions -85 to -68 and -52 to -35 relative to the transcriptional start. Although EMSA assays suggested that c-Myb can bind both sites, site-directed mutagenesis revealed that the downstream element (positions -52 to -35) was the only functional one and responsible for c-Myb-dependent transactivation of the *calt* promoter. Since c-Myb was still able to activate the transcription of *calt* promoter reporter constructs lacking the p300 response element, we can conclude that the c-Myb-dependent transactivation of *calt* occurred irrespective of the p300 response element located at

positions -73 to -60. However, it is well known that the DNA-binding activity of c-Myb is increased by p300-mediated acetylation (Tomita *et al.* 2000). Furthermore, replacement of c-Myb-acetylated residues (lysines) by arginine dramatically decreases the transactivating capacity of c-Myb (Sano & Ishii 2001). Thus, p300-mediated acetylation of c-Myb could enhance the binding of c-Myb to the *S. aurata calt* promoter. Conceivably, p300-mediated acetylation of c-Myb at lysine residues neutralizes the positive charge and results in a conformational change, which, in turn, may increase the DNA-binding activity of c-Myb and thus the transcriptional activity of *calt*.

Previously, we showed that the hepatic mRNA levels of *S. aurata* cAlt1 and cAlt2 depend largely on nutritional and hormonal status. Long-term starvation increases cAlt2 mRNA levels in the liver of *S. aurata*, whereas short-term refeeding and administration of insulin down-regulate cAlt2 expression. These conditions lead to opposite effects on the mRNA levels of cAlt1. Consistent with stimulation of cAlt2 in conditions associated with increased gluconeogenesis, STZ-treated fish present a marked increase in the hepatic expression of cAlt2. These findings led us to hypothesize that increased cAlt2 expression can be responsible for the serum elevation of Alt activity levels in animals under conditions related to insulin resistance and development of type 2 diabetes (Anemaet *et al.* 2008). To understand the molecular mechanism that governs *calt* gene transcription, we analyzed the expression of p300 and c-Myb in the liver of starved and insulin- and STZ-treated *S. aurata*. In agreement with cAlt2 expression, the mRNA levels of p300 and c-Myb increased in starved animals and decreased in fish liver after the administration of insulin. It remains uncertain whether the suppressing effect of insulin on cAlt2 expression results from a direct or indirect pathway. As it has been described in mammals, we cannot rule out an indirect action of insulin on *calt* expression through inhibition of gluconeogenic substrates release from muscle and adipose tissue, rather than direct hepatic insulin effects. Hence, hyperglycemia has been shown to potentiate the indirect actions of insulin (Fisher & Kahn 2003). This may well account for down-regulation of cAlt2 expression in the liver of *S. aurata* following the administration of glucose or insulin (Anemaet *et al.* 2008).

Based on the data given, both p300 and c-Myb are likely to contribute to increased cAlt2 expression in starved fish. Interestingly, and in a similar way as for cAlt2, up-regulation of p300 expression was also observed in STZ-induced diabetic *S. aurata*. In this regard, p300 is recognized as an important element in the pathogenesis of various diseases (Kalkhoven 2004), and there is increasing evidence that links p300 with diabetes (Chen *et al.* 2010). Consistent with our

findings, increased p300 mRNA levels have been found in the heart of STZ-induced diabetic mice (Kaur *et al.* 2006), leading the authors to conclude that p300 may play an important role in glucose- and diabetes-induced fibronectin synthesis. Moreover, curcumin decreases diabetes-induced oxidative stress in the kidney through reversion of p300 up-regulation in STZ-treated rats (Chiu *et al.* 2009). Indeed, it has been suggested that abnormal interactions between mutant transcription factors and p300 contribute to the pathogenesis of diabetes (Eeckhoutte *et al.* 2001, Fajans *et al.* 2001, Ban *et al.* 2002, Stanojevic *et al.* 2004, Fernandez-Zapico *et al.* 2009). The transcriptional regulation of *calt* expression in *S. aurata* does not necessarily apply to human *ALTI*. However, since a p300 putative response element is present in the human *ALTI* promoter, further research is needed to explore the relationship between the expression of p300, ALT, and diabetes in humans.

In conclusion, besides characterization for the first time of an *alt* promoter in animals other than humans, the results of the present study suggest a contribution of p300 and c-Myb to up-regulation of *cAlt2* expression in the liver of *S. aurata* subjected to starvation. Our findings also argue for a role of p300 in up-regulation of *cAlt2* in STZ-induced diabetic fish. Upcoming efforts will be addressed to unravel the specific mechanisms that govern alternative splicing of *calt* gene and *cAlt1* transcription.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the MCYT (Spain) grants BIO2006-01857 and BIO2009-07589. I G Anemaet and J D González were recipients of FI-IQUC (Generalitat de Catalunya, Spain) and FPU (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain) fellowships.

Author contribution statement

I G Anemaet isolated the *calt* promoter, obtained reporter constructs, and performed transfection and EMSA studies. J D González, M C Salgado, and M Giralte developed the quantitative RT-PCR analysis. F Fernández, I V Baanante, I Metón, I G Anemaet, J D González, and M C Salgado performed fish treatments and obtained the samples. I Metón, F Fernández, and I V Baanante designed the experiments. I G Anemaet, I Metón, and I V Baanante analyzed the data and wrote the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Dr D Haro (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain), Dr Tso-Pang Yao (Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke

University, USA), and Dr Bernard Lüscher (Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany) for providing the p300, p300DY, and c-Myb expression vectors respectively.

References

- Abraham SE, Lobo S, Yaciuk P, Wang HG & Moran E 1993 p300, and p300-associated proteins, are components of TATA-binding protein (TBP) complexes. *Oncogene* **8** 1639–1647.
- Anemaet IG, Metón I, Salgado MC, Fernández F & Baanante IV 2008 A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40** 2833–2844.
- Ban N, Yamada Y, Someya Y, Miyawaki K, Ihara Y, Hosokawa M, Toyokuni S, Tsuda K & Seino Y 2002 Hepatocyte nuclear factor-1alpha recruits the transcriptional co-activator p300 on the GLUT2 gene promoter. *Diabetes* **51** 1409–1418.
- Begum NA & Datta AG 1992 Effect of adrenergic agonists and antagonists on alanine amino transferase, fructose-1:6-bisphosphatase and glucose production in hepatocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **113** 93–103.
- Beug H, Hayman MJ & Graf T 1982 Myeloblasts transformed by the avian acute leukemia virus E26 are hormone-dependent for growth and for the expression of a putative myb-containing protein, p135 E26. *EMBO Journal* **1** 1069–1073.
- Castric J 1984 Obtention et étude de quelques caractéristiques d'une lignée cellulaire du bar, *Morone labrax* (Linné). Mémoire. Faculté des Sciences de Brest, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Chan HM & La Thangue NB 2001 p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of Cell Science* **114** 2363–2373.
- Chen S, Feng B, George B, Chakrabarti R, Chen M & Chakrabarti S 2010 Transcriptional co-activator p300 regulates glucose induced gene expression in the endothelial cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **298** E127–E137.
- Chiu J, Khan ZA, Farhangkhoe H & Chakrabarti S 2009 Curcumin prevents diabetes-associated abnormalities in the kidneys by inhibiting p300 and nuclear factor-kappaB. *Nutrition* **25** 964–972.
- Das C, Lucia MS, Hansen KC & Tyler JK 2009 CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459** 113–117.
- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS & Seeff LB 2000 Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clinical Chemistry* **46** 2050–2068.
- Eeckhoutte J, Formstecher P & Laine B 2001 Maturity-onset diabetes of the young type 1 (MODY1)-associated mutations R154X and E276Q in hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) gene impair recruitment of p300, a key transcriptional co-activator. *Molecular Endocrinology* **15** 1200–1210.
- Fajans SS, Bell GI & Polonsky KS 2001 Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *New England Journal of Medicine* **345** 971–980.
- Fernández F, Miquel AG, Cordoba M, Varas M, Metón I, Caseras A & Baanante IV 2007 Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **343** 1–10.
- Fernandez-Zapico ME, van Velkinburgh JC, Gutierrez-Aguilar R, Neve B, Froguel P, Urrutia R & Stein R 2009 MODY7 gene, KLF11, is a novel p300-dependent regulator of Pdx-1 (MODY4) transcription in pancreatic islet beta cells. *Journal of Biological Chemistry* **284** 36482–36490.

- Fisher SJ & Kahn CR 2003 Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *Journal of Clinical Investigation* **111** 463–468.
- Fynn-Aikins K, Hughes SG & Vandenberg GW 1995 Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology* **111** 163–170.
- Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Soutter HM *et al.* 2000 Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nature Genetics* **24** 300–303.
- Ghosh AK & Varga J 2007 The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. *Journal of Cellular Physiology* **213** 663–671.
- Glinghammar B, Rafter I, Lindstrom AK, Hedberg JJ, Andersson HB, Lindblom P, Berg AL & Cotgreave I 2009 Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *International Journal of Molecular Medicine* **23** 621–631.
- Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong EG, Fisch S, Haldar S, Cline GW, Kim JK, Peroni OD, Kahn BB *et al.* 2007 Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. *Cell Metabolism* **5** 305–312.
- Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Kempf J, Zinman B & Haffner SM 2004 Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* **53** 2623–2632.
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA *et al.* 1998 Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Research* **26** 362–367.
- Iacobellis G, Moschetta A, Buzzetti R, Ribaudo MC, Baroni MG & Leonetti F 2007 Aminotransferase activity in morbid and uncomplicated obesity: predictive role of fasting insulin. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases* **17** 442–447.
- Ishiguro M, Takio K, Suzuki M, Oyama R, Matsuzawa T & Titani K 1991 Complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT) determined by a combination of conventional and mass spectral methods. *Biochemistry* **30** 10451–10457.
- Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E & Yao TP 2001 p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO Journal* **20** 1331–1340.
- Jadhao SB, Yang RZ, Lin Q, Hu H, Anania FA, Shuldiner AR & Gong DW 2004 Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology* **39** 1297–1302.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W & Renold AE 1969 Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation* **48** 2129–2139.
- Kalkhoven E 2004 CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochemical Pharmacology* **68** 1145–1155.
- Kasper LH, Boussouar F, Ney PA, Jackson CW, Reh J, van Deursen JM & Brindle PK 2002 A transcription-factor-binding surface of coactivator p300 is required for haematopoiesis. *Nature* **419** 738–743.
- Kauppi M, Murphy JM, de Graaf CA, Hyland CD, Greig KT, Metcalf D, Hilton AA, Nicola NA, Kile BT, Hilton DJ *et al.* 2008 Point mutation in the gene encoding p300 suppresses thrombocytopenia in Mpl^{-/-} mice. *Blood* **112** 3148–3153.
- Kaur H, Chen S, Xin X, Chiu J, Khan ZA & Chakrabarti S 2006 Diabetes-induced extracellular matrix protein expression is mediated by transcription coactivator p300. *Diabetes* **55** 3104–3111.
- Like AA & Rossini AA 1976 Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* **193** 415–417.
- Lindblom P, Rafter I, Copley C, Andersson U, Hedberg JJ, Berg AL, Samuelsson A, Hellmold H, Cotgreave I & Glinghammar B 2007 Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum – differential tissue expression using novel antibodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **466** 66–77.
- Marmorstein R & Trievel RC 2009 Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochimica et Biophysica Acta* **1789** 58–68.
- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Cantó E, Fernández F & Baanante IV 1999 Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* **82** 223–232.
- Metón I, Egea M, Fernández F, Eraso MC & Baanante IV 2004 The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Letters* **566** 251–254.
- Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F & Baanante IV 2006 Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* **147** 3446–3456.
- Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB & Kaplowitz N 2005 Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* **41** 380–382.
- Oelgeschläger M, Krieg J, Luscher-Firzlaff JM & Luscher B 1995 Casein kinase II phosphorylation site mutations in c-Myb affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M. *Molecular and Cellular Biology* **15** 5966–5974.
- Ramsay RG 2005 c-Myb a stem-progenitor cell regulator in multiple tissue compartments. *Growth Factors* **23** 253–261.
- Rosen F, Roberts NR & Nichol CA 1959 Glucocorticosteroids and transaminase activity. I. Increased activity of glutamicpyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **234** 476–480.
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Garcia-Salguero L, de la Higuera M & Lupianez JA 1998 Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30** 55–63.
- Sandberg ML, Sutton SE, Pletcher MT, Wiltshire T, Tarantino LM, Hogenesch JB & Cooke MP 2005 c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Developmental Cell* **8** 153–166.
- Sano Y & Ishii S 2001 Increased affinity of c-Myb for CREB-binding protein (CBP) after CBP-induced acetylation. *Journal of Biological Chemistry* **276** 3674–3682.
- Sattar N, McConnachie A, Ford I, Gaw A, Cleland SJ, Forouhi NG, McFarlane P, Shepherd J, Cobbe S & Packard C 2007 Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes* **56** 984–991.
- Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ & Diamant M 2007 Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* **191** 391–396.
- Shiama N 1997 The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends in Cell Biology* **7** 230–236.
- Sohocki MM, Sullivan LS, Harrison WR, Sodergren EJ, Elder FF, Weinstock G, Tanase S & Daiger SP 1997 Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites. *Genomics* **40** 247–252.
- Stanojevic V, Habener JF & Thomas MK 2004 Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300. *Endocrinology* **145** 2918–2928.

- Swope DL, Mueller CL & Chrvia JC 1996 CREB-binding protein activates transcription through multiple domains. *Journal of Biological Chemistry* **271** 28138–28145.
- Thulin P, Rafter I, Stockling K, Tomkiewicz C, Norjavaara E, Aggerbeck M, Hellmold H, Ehrenborg E, Andersson U, Cotgreave I *et al.* 2008 PPARalpha regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **231** 1–9.
- Tomita A, Towatari M, Tsuzuki S, Hayakawa F, Kosugi H, Tamai K, Miyazaki T, Kinoshita T & Saito H 2000 c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene* **19** 444–451.
- Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C & Tataranni PA 2002 High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* **51** 1889–1895.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L & Whincup PH 2005 Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* **28** 2913–2918.
- West J, Brouil J, Gazis A, Jackson L, Mansell P, Bennett A & Aithal GP 2006 Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *QJM* **99** 871–876.
- Wilson GL & Leiter EH 1990 Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **156** 27–54.
- Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR & Gong DW 2002 cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* **79** 445–450.
- Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L & Gong DW 2009 Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology* **49** 598–607.

Received in final form 16 June 2010

Accepted 22 June 2010

Made available online as an Accepted Preprint 23 June 2010



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpa

Expressional regulation of key hepatic enzymes of intermediary metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during food deprivation and refeeding



Ivan Viegas^{a,b,*}, Albert Caballero-Solares^c, João Rito^{a,b}, Marina Giralt^d, Miguel A. Pardal^b, Isidoro Metón^d, John G. Jones^a, Isabel V. Baanante^d

^a CNC — Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Largo Marquês de Pombal, 3004-517 Coimbra, Portugal

^b CFE — Center for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martins de Freitas 3000-456 Coimbra, Portugal

^c Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^d Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2013

Received in revised form 4 April 2014

Accepted 7 April 2014

Available online 18 April 2014

Keywords:

Alanine aminotransferase

Pyruvate kinase

Pentose phosphate pathway

Dicentrarchus labrax

Refeeding

Food deprivation

Lipogenesis

ABSTRACT

We hypothesized that the analysis of mRNA level and activity of key enzymes in amino acid and carbohydrate metabolism in a feeding/fasting/refeeding setting could improve our understanding of how a carnivorous fish, like the European seabass (*Dicentrarchus labrax*), responds to changes in dietary intake at the hepatic level. To this end cDNA fragments encoding genes for cytosolic and mitochondrial alanine aminotransferase (cALT; mALT), pyruvate kinase (PK), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) were cloned and sequenced. Measurement of mRNA levels through quantitative real-time PCR performed in livers of fasted seabass revealed a significant increase in cALT (8.5-fold induction) while promoting a drastic 45-fold down-regulation of PK in relation to the levels found in fed seabass. These observations were corroborated by enzyme activity meaning that during food deprivation an increase in the capacity of pyruvate generation happened via alanine to offset the reduction in pyruvate derived via glycolysis. After a 3-day refeeding period cALT returned to control levels while PK was not able to rebound. No alterations were detected in the expression levels of G6PDH while 6PGDH was revealed to be more sensitive specially to fasting, as confirmed by a significant 5.7-fold decrease in mRNA levels with no recovery after refeeding. Our results indicate that in early stages of refeeding, the liver prioritized the restoration of systemic normoglycemia and replenishment of hepatic glycogen. In a later stage, once regular feeding is re-established, dietary fuel may then be channeled to glycolysis and de novo lipogenesis.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aquaculture is highly dependent on capture fisheries to provide fishmeal required to produce high-protein feeds (Tacon and Metian, 2008), especially for carnivorous fish (Oliva-Teles, 2000; Kaushik and Seiliez, 2010). Thus, the development of well-suited and cost-effective feeds has become a matter of high importance to the sustainability and profitability of the sector. Our understanding of how carnivorous fish, such as the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.), metabolize different dietary nutrients came to some extent from determining the activity of key enzymes involved in carbohydrate and amino acid metabolism. This was done either by subjecting fish to different dietary compositions (Dias et al., 2004; Enes et al., 2006; Moreira et al., 2008) or

to feeding/fasting/refeeding protocols (Pérez-Jiménez et al., 2007; Viegas et al., 2013). Studies with fed/fasted/refed fish have often helped to clarify the underlying alterations in hepatic intermediary metabolism in each setting and in its in-between transitions. Besides, in aquaculture similar refeeding maneuvers are associated with a phase of accelerated growth, known as compensatory growth (Ali et al., 2003). The physiological mechanisms behind this process are still unclear in seabass (Dupont-Prinet et al., 2010; Türkmen et al., 2012).

Transamination reactions play an important role in amino acid metabolism and among the transaminases, aspartate aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1) and alanine aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) are the most representative (Cowey and Walton, 1989). The latter, by catalyzing the exchange of alanine with pyruvate and ammonium ion, is considered to be one of the most responsive to changes in dietary protein utilization (Metón et al., 1999; Gaye-Siessegger et al., 2006; Pérez-Jiménez et al., 2007; González et al., 2012). In fish, alanine is an important metabolite whose energy can be obtained either directly by

* Corresponding author at: Center for Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra, 3001-401 Coimbra, Portugal.

E-mail address: iviegas@ci.uc.pt (I. Viegas).

oxidation of the carbon skeleton (Pereira et al., 1995) or indirectly after conversion to glucose through gluconeogenesis (French et al., 1981). Besides, it has been used as probe for muscle growth in tracer studies (Gasier et al., 2009) and as indicator to assess the effects of food deprivation in muscle and liver in metabolomic studies (Kullgren et al., 2010). Since the equilibrium constant of ALT is approximately 1.0, the direction of alanine-pyruvate exchange is highly influenced by glycolytic production of pyruvate via pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40). PK is one of the key control enzymes of glycolysis, and its expression and activity is highly sensitive to cellular energy charge and glycolytic flux. The activity of PK along with 6-phosphofructo 1-kinase (PFK-1; EC 2.7.1.11) serves primarily to increase the equilibrium constant of the glycolytic pathway and to commit the carbon skeletons to pyruvate production. However, in other carnivorous fish, PK mRNA was unresponsive after refeeding at the peak of postprandial absorption (8 h) (Skiba-Cassy et al., 2013) while activity levels recover only after 8 days of refeeding (Metón et al., 2003; Soengas et al., 2006; Furné et al., 2012; Pérez-Jiménez et al., 2012). This suggests that a long-term stimulation by food intake is required in order to metabolize excess glucose toward pyruvate production. By addressing how the interconversion of alanine and pyruvate is related to the status of PK/PFK-1 gene expression and activity could provide insight into the hepatic regulation during fasting and consequent refeeding.

Aside from glycolysis, the other principal fate of glucose carbons is metabolism via the pentose phosphate pathway (PPP) (Dias et al., 1998). The PPP is a principal provider of NADPH for biosynthetic pathways such as lipogenesis and for regeneration of reduced glutathione, as well as 5-carbon precursors for nucleotide biosynthesis. The oxidative branch of the PPP, involving glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH; EC 1.1.1.49) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH; EC 1.1.1.43), is highly regulated and reflects the cellular demand for NADPH and/or nucleotide and lipid biosynthesis (Sandén et al. 2003). Thus, as for ALT and PK, the mRNA levels and activity of these enzymes should be sensitive to nutritional and growth states. This set of enzymes has often been used to assess the effects of food deprivation and refeeding in seabass (Pérez-Jiménez et al., 2007; Viegas et al., 2013) and other species (Metón et al., 1999; Furné et al., 2012; Pérez-Jiménez et al., 2012). Despite the valuable information withdrawn from these enzymes' activity, the nutritional regulation of their gene expression at transcriptional level still remains to be addressed in seabass. Given this, we hypothesized that an integrated analysis of mRNA levels and activities for the ALT, PK, G6PDH and 6PGDH enzymes would provide a sensitive biomarker of nutrient availability in seabass. To test this hypothesis, we isolated cDNA fragments from *D. labrax* liver encoding ALT, PK and G6PDH and 6PGDH in order to design specific molecular probes to measure expression at mRNA level, while the corresponding enzymatic activities were also assayed. These

measurements were performed in cDNA from livers of seabass reared under three different conditions: regular feeding, fasting (21 days) and fasting (21 days) followed by refeeding (3 days).

2. Material & methods

2.1. Fish sampling and handling

Farmed European seabass (*D. labrax* L.) were maintained as previously described (Viegas et al., 2012). Briefly, a total of 18 fish provided by a local farm were transported to the lab, and distributed in 200 L tanks supplied with aerated filtered seawater from a recirculation system equipped with a central filtering unit and a UV unit ($n = 6$ per tank; initial mean length of 28.0 ± 1.7 cm and initial mean body weight of 218.0 ± 43.0 g). The system was maintained at 18°C and 30‰ salinity throughout the experiment. After acclimation, fish from one of the tanks were provided with a commercial diet (the same used in the farm: Dourasoja Ultra 5, SORGAL, S.A.; 44% crude protein, 18% crude fat, 2.2% starch, 9.2% ash, 5 mm standard pellet; 20 kJ g^{-1} dry weight gross energy) once a day with ration of 2% mean body weight per day. Fish in the remaining two tanks were fasted for 21 days. After this period fish from one of those tanks were provided with food again, once a day with the same commercial diet for 3 days. Regularly fed fish and refed fish were provided with last meal 24 h before sacrifice. Fish were anesthetized in saltwater containing 0.1 g L^{-1} of MS-222, and sampled for blood from the caudal vein with heparinized syringes. After sacrifice by cervical section, the liver was excised, weighed, freeze-clamped in liquid N_2 , ground and stored at -80°C until further analysis.

2.2. Total RNA extraction and reverse transcription (RT)

Total mRNA was isolated from frozen liver samples using the Speedtools Total RNA Extraction Kit (Biotools, Spain). The RNA obtained served as template for RT-PCR. RNA was spectrophotometrically quantified using a NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) and quality was determined using the ratio of absorbance at 260 and 280 nm. Single strand cDNA templates for PCR amplification were synthesized from $1 \mu\text{g}$ of total RNA by incubation with M-MLV RT (Promega, Spain) at 37°C for 1 h, according to the supplier's instructions.

2.3. RT-PCR analysis

The pairs of oligonucleotides and expected length of bands generated in the amplification by RT-PCR for the different enzymes are presented in Table 1. The oligonucleotides were designed from highly conserved regions in the nucleotide sequences published in GenBank for each of

Table 1
Primer pairs used for the partial cDNA cloning by RT-PCR and expected band extension.

Gene		RT-PCR	Expected band extension (bp)
		Primer sequence (5'–3')	
Amino acid metabolism			
cALT	Forward	GCTGACTGTTGACACCATGAAC ^a	792
	Reverse	CAGCCCTCTGCGTACACATTATCCTG ^b	
mALT	Forward	AACATGTCGCTACAAGGATG ^c	1028
	Reverse	CAGCCCTCTGCGTACACATTATCCTG ^b	
Glycolysis			
PK	Forward	GATGCTGGAGAGTATGGTGACCACCG	347
	Reverse	GCCTCTCGAGATCGAGTGCAT	
Pentose phosphate pathway			
G6PDH	Forward	GAGATGGTGCAGAACCTCATGG	725
	Reverse	CCACAGAAGACATCCAGGATGAG	
6PGDH	Forward	GGGGACATGCAGCTGATCTGTGAGGC	727
	Reverse	GTCTGTACCCGTCATAGAAGGA	

^aIMAL10, ^bIMAL07 and ^cshorter version of IMAL23 from Metón et al. (2004).

the enzymes, aligning whenever possible sequences from fish species such as zebrafish *Danio rerio*, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, flounder *Platichthys flesus*, common carp *Cyprinus carpio*, and gilthead seabream *Sparus aurata*. The sequences were aligned using EMBL-EBI ClustalW2 – Multiple Sequence Alignment Tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) for comparing homologies and oligonucleotides were designed with Oligo Explorer 1.2 Software (Gene Link). For mALT and cALT, oligonucleotides were designed according to previous studies in gilthead seabream *S. aurata* (Metón et al., 2004). RT-PCR mixtures (30 µL total volume) consisted of 3 µL of single-strand cDNA product, 3 µL of 10× PCR buffer, 200 µM dNTPs, 0.5 µM of oligonucleotides (forward and reverse), and 1 U of Expand High Fidelity PCR System (Roche). The amplification reaction was conducted through 39 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing for 30 s at 55 °C and DNA synthesis at 72 °C for 2 min, followed by a final extension step of 5 min. The PCR products were separated electrophoretically on 1% agarose gel alongside a 1 kbp ladder (Biotools). Bands of appropriate size were excised, purified using High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche), ligated into pGEM-T Easy plasmid (Promega), transformed by thermic shock in DH5α competent cells and selected colonies were allowed to grow overnight in LB/ampicillin broth at 37 °C. Recombinant plasmid DNA was isolated using GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) and sequenced with ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems®). Identity of insert sequences were verified using BLASTx against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) public databases and aligned among different cDNA clones. The new *D. labrax* obtained sequences were introduced in the GenBank from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (length of the fragment and accession numbers for each enzyme are listed in Table 2).

2.4. qRT-PCR analysis

Specific oligonucleotides for quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) were designed with Oligo Explorer 1.2 (Gene Link) (Table 2). Linearity and efficiency of amplification on qRT-PCR for the chosen oligonucleotides were tested by generating standard curves with consecutive dilutions of a cDNA test sample. PCR product from a non-diluted cDNA sample and a blank (with milliQ water instead of cDNA) were separated electrophoretically on 2% agarose gel alongside GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas) for length confirmation and to discard secondary bands.

Extraction of mRNA and subsequent synthesis of single strand cDNA templates were performed as mentioned above from frozen liver

samples. The reaction product was diluted 10× in milliQ water and real-time quantitative PCR was performed in a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) using 0.4 µM of each oligonucleotide, 10 µL of Power SYBR® Green (Applied Biosystems®) and 1.6 µL of diluted cDNA. The temperature cycle protocol for amplification was: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles with 95 °C for 15 s and 62 °C for 1 min. Ribosomal subunit 18 (18S) from *D. labrax* was chosen as the reference gene to normalize expression levels of targets between different samples. Among the reference (housekeeping) genes tested, 18S did not reveal changes in expression levels between experimental conditions studied and presented the lowest standard deviation within conditions. Variations in gene expression and n-fold induction were calculated relative to fed fish using the standard $\Delta\Delta Ct$ method including the efficiencies for the experimental gene and 18S. Specific details for each amplified transcript such as oligonucleotides used, length of bands generated and GenBank accession numbers are listed in Table 2.

2.5. Enzyme activities

The assays to determine enzyme activities were carried out as previously described (Metón et al., 1999), with minor modifications. Crude extracts were obtained by mixing the powdered frozen liver in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 mM EDTA acid, 50 mM NaF, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM 1,4-dithiothreitol and 250 mM sucrose (1/5, w/v), followed by homogenization using a PTA-7 Polytron mixer (Kinematica GmbH, Switzerland; position 3, 30 s), and centrifugation at 15,800 g for 40 min at 4 °C. PK activity was assayed in a final volume of 250 µL of final volume containing 70 mM glycylglycine pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.15 mM NADH, 2.8 mM phosphoenolpyruvate, 21 U/mL lactate dehydrogenase and 4 µL of crude extract. The reaction was triggered after addition of 2.5 mM ADP. PFK-1 activity was assayed in a final volume of 200 µL containing 100 mM Tris HCl pH 8.25, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.15 mM NADH, 4 mM ammonium sulfate, 12 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM fructose 6-phosphate, 30 mM glucose 6-phosphate, 0.675 U/mL fructose bisphosphate aldolase, 5 U/mL triose-phosphate isomerase, 2 U/mL glycerol-3-phosphate dehydrogenase and 4 µL crude extract. The reaction was triggered after addition of 10 mM ATP. G6PDH activity was assayed in a final volume of 200 µL of final volume containing 77.5 mM imidazole-HCl pH 7.7, 5 mM MgCl₂, 1 mM NADP and 1 mM glucose 6-phosphate and 4 µL of crude extract. 6PGDH activity was assayed in a final volume of 200 µL of final volume containing 82.7 mM imidazole-HCl pH 7.7, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP, 2 mM 6-

Table 2

Primer pairs used to assess mRNA levels by quantitative real-time RT-PCR analysis, length of amplified fragments total length of the sequence and respective GenBank accession numbers.

Gene	Quantitative real time RT-PCR				
	Primer sequence (5'–3')	Length of sequence (bp)	Length of amplified fragment (bp)	GenBank accession no.	
Housekeeping gene					
18S	Forward Reverse	ACGGACGAAAGCGAAAGCA GGAACTACGACGGTATCTGATC	406	91	AM419038
Amino acid metabolism					
cALT	Forward Reverse	TGAAGGAGGGGTCAAGAAA AGGGTAAGAACAAGAGCCA	559	123	JX073702
mALT	Forward Reverse	GCAGCAATCACTTCTTCCG AATGCGGCGTCTACTTTT	465	106	JX073703
Glycolysis					
PK	Forward Reverse	CAAGTGGAAAGCCGCAAGGC GGTCAACCCTGGCAACCATCA	347	83	KF857578
Pentose phosphate pathway					
G6PDH	Forward Reverse	TGGAACAGGGACAGCGTGG GAGCATCTGGAGCAAGTGGTT	497	132	JX073705
6PGDH	Forward Reverse	CGGTGACAAGGCTCGGTTT CGAACTCTTTGGCTCCTGC	410	110	JX073706

phosphogluconate and 4 μ l of crude extract. ALT and AST activity were assayed both in cytosolic (cALT/cAST) and mitochondrial (mALT/mAST) fractions. Mitochondrial fraction was prepared as described by Metón et al. (2004) at 4 °C, from powdered frozen liver in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 200 mM mannitol and 70 mM sucrose) (1/5, w/v), followed by homogenization using a Dounce homogenizer, and centrifugation at 500 g for 10 min to remove nuclear and cell debris. The mitochondrial fraction was pelleted by centrifugation at 9000 g for 20 min. The resulting supernatant contained the cytosolic fraction. The pellet was yet washed twice with buffer A followed by another centrifugation at 9000 g for 20 min. Mitochondria were resuspended and disrupted in buffer A prepared without mannitol and sucrose. Activity for ALT and AST were determined with a commercial kit (Cromatest, Linear Chemicals, Spain). All enzymatic assays were carried out at 30 °C and followed at 340 nm. The total protein content in liver crude extracts was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Spain) at 30 °C using bovine serum albumin as a standard and followed at 600 nm. All assays were adapted for automated measurement using a Cobas Mira S spectrophotometric analyzer (Hoffman-La Roche, Switzerland). Enzyme activities were expressed per mg of soluble protein (specific activity). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme necessary to transform 1 μ mol of substrate per min.

2.6. Statistical analysis

Normality (Kolmogorov–Smirnov's test) and homogeneity of variance (Bartlett's test) were verified prior to the analysis. Log transformation was performed during the statistical analysis if Bartlett's test was >0.05 . Analysis of variance (ANOVA) was used to test the statistical differences between nutritional conditions. A posteriori Tukey's test was performed when significant differences were found (differences were considered statistically significant at $P < 0.05$).

3. Results

Blood glucose and hepatic glycogen levels (data not shown) plummeted after fasting and the refeeding period allowed full recovery to levels found in fed fish (blood glucose in mM: $10.7 \pm 6.3/4.8 \pm 1.2/9.3 \pm 1.4$; hepatic glycogen in g 100 g^{-1} liver: $3.0 \pm 0.9/0.7 \pm 0.4/3.5 \pm 0.4$, for fed/fasted/refed fish, respectively) as previously reported (Viegas et al., 2013).

A 599 bp cDNA fragment encoding cALT was isolated from the liver of *D. labrax* by RT-PCR. The nucleotide sequence shared an 89% identity with *S. aurata* cALT messenger (GenBank accession no. AY206502). To isolate a cDNA fragment of *D. labrax* mALT, a forward oligonucleotide was designed from a portion exclusively found in the *S. aurata* mitochondrial ALT gene (Metón et al., 2004). The obtained nucleotide

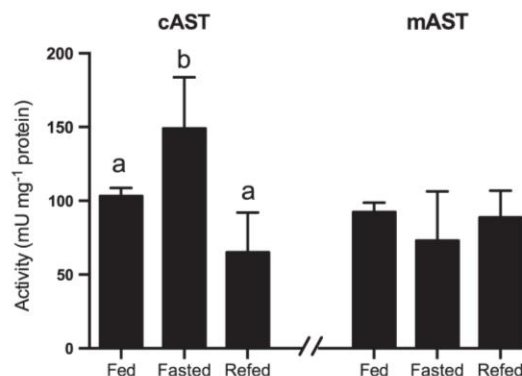


Fig. 2. Effects of feeding, fasting (21 days), and refeeding (21 days fasting, 3 days refeeding) on specific activity (black bars; in mU mg^{-1} protein) of cAST (left) and mAST (right) in liver of *D. labrax*. Mean values \pm S.D. ($n = 6$) are presented. Significant differences between conditions are indicated by different letters (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

sequence of 465 bp was 94% identical to its homolog fragment in *S. aurata* mALT (GenBank accession no. AY206503). Protein identity between *D. labrax* ALT isoforms was 70%. Availability of cALT and mALT *D. labrax* cDNA sequences allowed us to address the effect of nutritional status on the hepatic expression of both genes at transcriptional level. qRT-PCR showed that fasting promoted a significant increase in the mRNA levels of cALT (an 8.5-fold induction) while return to control values was established after a 3-day refeeding period. The nutritional status did not affect mALT mRNA levels. ALT activity was assayed in both cytosolic and mitochondrial liver extracts (Fig. 1) and corroborated the results obtained at mRNA level for both genes. Although mALT mRNA levels and activity showed no differences among the different feeding conditions, the cALT:mALT activity ratio decreased after refeeding (19:1 for fed fish; 16:1 for fasted fish; 9:1 for refed fish). Activity for cAST and mAST was also assayed and a similar trend to that observed for cALT and mALT activity, respectively, was obtained (Fig. 2).

A cDNA sequence of 347 bp encoding glycolytic enzyme PK was isolated and cloned from *D. labrax* liver. This fragment was $\sim 73\%$ identical to *Takifugu rubripes* (GenBank accession no. AB074495), *Salmo salar* (NM_001141703) and *Oreochromis niloticus* (XM_003443869). qRT-PCR performed on cDNA from livers of fasted *D. labrax* showed a drastic 45-fold down-regulation of PK mRNA levels in relation to control and this condition was maintained after a 3-day refeeding period. These observations were consistent with enzyme activity which revealed significantly higher values for PK in fed fish compared to fasted and refed fish (Fig. 3). Activity values determined for the other glycolytic enzyme, PFK-1 (Fig. 3), revealed a similar decrease to PK during fasting. The 3-

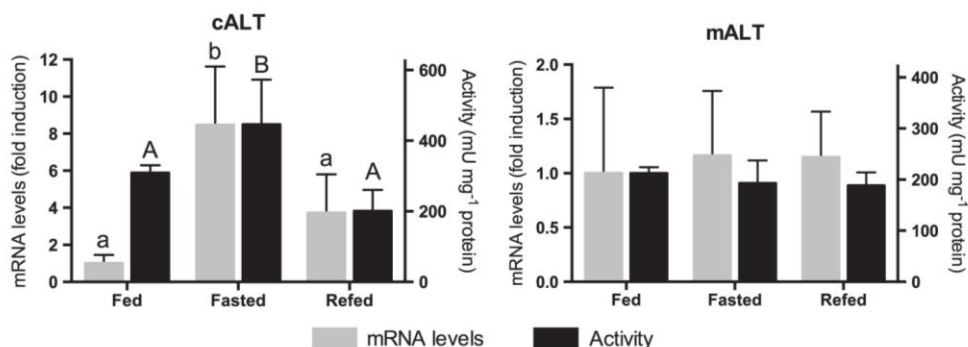


Fig. 1. Effects of feeding, fasting (21 days), and refeeding (21 days fasting, 3 days refeeding) on mRNA levels (gray bars; in arbitrary units) and specific activity (black bars; in mU mg^{-1} protein) of cALT (left) and mALT (right) in liver of *D. labrax*. Mean values \pm S.D. ($n = 6$) are presented. Significant differences between conditions are indicated by different lower case letters for mRNA levels and by different upper case letters for activity (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

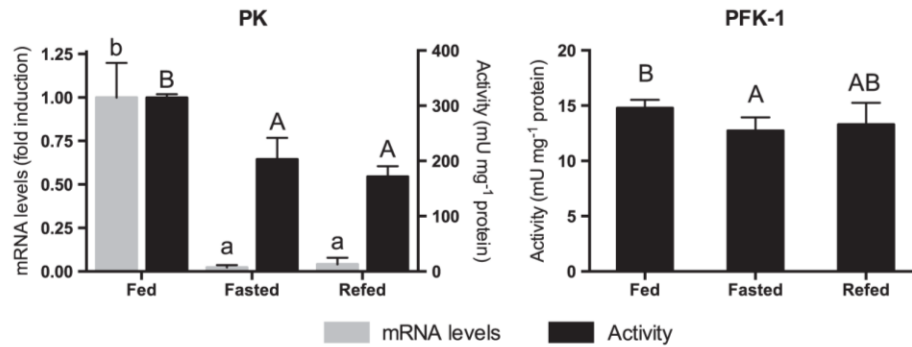


Fig. 3. Effects of feeding, fasting (21 days), and refeeding (21 days fasting, 3 days refeeding) on mRNA levels (gray bars; in arbitrary units) and specific activity (black bars; in mU mg⁻¹ protein) of PK (left) and PFK-1 (right – specific activity only) in liver of *D. labrax*. Mean values \pm S.D. (n = 6) are presented. Significant differences between conditions are indicated by different lower case letters for mRNA levels and by different upper case letters for activity (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

day refeeding period however, was comparatively more effective in triggering a response as confirmed by the partial recovery to levels found in fed fish.

To analyze gene expression at mRNA level, cDNA encoding *D. labrax* G6PDH and 6PGDH were isolated (497 bp and 410 bp, respectively) and sequenced. The conditions studied in this report did not allow us to detect mRNA changes of G6PDH, while 6PGDH was revealed to be more sensitive specially to fasting, as confirmed by a significant 5.7-fold decrease in mRNA levels. This down-regulation was slightly alleviated by refeeding but with no statistical significance which was in agreement with the observed activity for this enzyme. Both G6PDH and 6PGDH responded similarly in terms of enzyme activity with significantly higher values in the fed state than in the fasted state. The 3-day refeeding period was not sufficient to recover control values for both activities (Fig. 4).

4. Discussion

The liver is the main site for amino acid transamination where ALT and AST are quantitatively the most important aminotransferases in teleost fish. Their activity is correlated with scenarios of enhanced gluconeogenesis (Cowey and Walton, 1989), a major pathway for utilization of amino acids. The response of ALT to starvation does not follow a clear pattern between different fish species (Metón et al., 1999; Furné et al., 2012; Pérez-Jiménez et al., 2012). Moreover, its correlation with dietary protein content and its coordination with other transaminases such as AST for the supply of gluconeogenic precursors, may contribute to variable responses even within the same species as it seems to be the case of seabass (Pérez-Jiménez et al., 2007). Our findings differ from those of Pérez-Jiménez et al. (2007) that reported different responses for both ALT and AST in seabass fed a high- and a low- protein

diet (49% and 41% crude protein, respectively) after a 9-day fasting period. These observations revealed that the behavior of ALT and AST to regular feeding was dependent on protein content. The influence of the past nutritional history (different levels of dietary protein) on the observed metabolic responsiveness to refeeding after a fasting period was also evident. Our findings, using an intermediate level of crude protein (44%), revealed that cALT responded to a 21-day fasting period with a significant increase in both mRNA levels and activity. After refeeding, ALT returned to the levels found in fed fish. During fasting, net flux through cALT lies in the direction of alanine to pyruvate thereby providing carbon for both oxidative and anaplerotic tricarboxylic acid (TCA) cycle fluxes that sustain energy generation and gluconeogenesis, respectively (Mommensen, 1986). Increased cALT activity under these conditions may represent an increase in the capacity of pyruvate generation from alanine in order to offset the reduction in pyruvate derived via glycolysis, as indicated by the observed decrease in expression and activity of PK during fasting. The opposite setting also seems to confirm such assessment. *S. aurata* subjected to a diet supplemented with amino-oxyacetate (an inhibitor of pyridoxal phosphate-dependent transaminases) balanced the decrease in ALT activity with a significant increase in PK activity (González et al., 2012). In contrast to cALT, none of the conditions induced significant changes in mALT expression or activity. Its contribution to total ALT activity was found to be residual as in *S. aurata* (Metón et al., 2004), hence its effect on the net flux between alanine and pyruvate under different nutritional states was considered to be insignificant, reinforcing the premise that mRNA and activity of mALT are not sensitive indicators of nutritional status for carnivorous saltwater fish.

It was previously demonstrated that plasma glucose was highly sensitive to fasting/refeeding conditions in seabass (Viegas et al., 2013) so

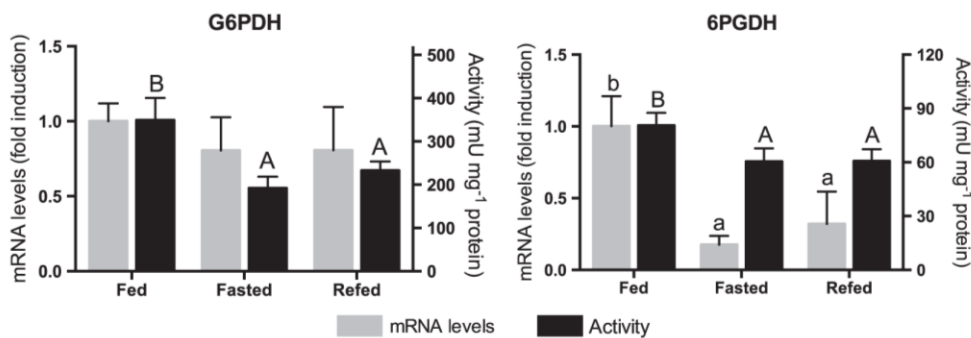


Fig. 4. Effects of feeding, food deprivation (21 days), and refeeding (21 days fasting, 3 days refeeding) on mRNA levels (gray bars; in arbitrary units) and specific activity (black bars; in mU mg⁻¹ protein) of G6PDH (left) and 6PGDH (right) in liver of *D. labrax*. Mean values \pm S.D. (n = 6) are presented. Significant differences between conditions are indicated by different lower case letters for mRNA levels and by different upper case letters for activity (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

that after a 21-day fasting period there was a significant decrease in glycemia to about half of that observed in fed fish. In the present study glycolytic enzymes like PK and PFK-1 fell significantly along with glycemia, as expected. The slight decrease in glucokinase (GK; EC 2.7.1.2) coupled to the lack of up-regulation of gluconeogenic enzymes like glucose 6-phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) was also consistent with these observations (Viegas et al., 2013). This pattern has also been reported in some fish species such as the common dentex *Dentex dentex* (Pérez-Jiménez et al., 2012), *S. aurata* (Bonamusa et al., 1992; Metón et al., 1999) and *O. mykiss* (Furné et al., 2012) despite some other cases where fasting caused no alterations in PK activity (Soengas et al., 2006) or mRNA levels (Panserat et al., 2001; Kirchner et al., 2003). Alanine is a strong allosteric inhibitor of hepatic PK (Fenton and Hutchinson, 2009; González et al., 2012), so increased levels of cALT could also have contributed to the decrease observed in PK activity. The restoration of PK activity to control levels after refeeding takes longer than the 3-day refeeding interval of our study as reported for other fish species (Metón et al., 2003; Furné et al., 2012; Pérez-Jiménez et al., 2012; Skiba-Cassy et al., 2013). Yet, surprisingly, dietary input after food deprivation affects differently glycolytic enzymes. GK is very responsive to refeeding as reported for this experiment (Viegas et al., 2013), and other studies with *D. labrax* (Pérez-Jiménez et al., 2007) and other fish species (Soengas et al., 2006; Skiba-Cassy et al., 2009). This highlights the importance of rapidly phosphorylating exogenous (dietary) glucose to glucose 6-phosphate (G6P) since it is a key branchpoint metabolite for glycolysis, glycogen synthesis, and PPP. It has also been hypothesized that after refeeding, the overshoot in GK associated with the lack of inhibition of the gluconeogenic enzyme G6Pase may be the result of futile glucose-G6P cycling (Kamalam et al., 2012; Skiba-Cassy et al., 2013; Viegas et al., 2013), an argument previously raised while using stable isotopes (Viegas et al., 2011). Contrary to GK, PFK-1 and PK, located downstream of G6P in the glycolytic pathway, seem to be poorly regulated by short-term refeeding in seabass. This is consistent with the findings for *O. mykiss* (Skiba-Cassy et al., 2009; Dai et al., 2013) and *D. rerio* (Seilliez et al., 2013) further supporting the argument of upstream glycolysis futile cycling. Methodologies on how to resolve this have been recently developed using labeled glucose (Martins et al., 2013; Nunes et al., 2013). The low control coefficients of these enzymes in fish glycolytic metabolism are not well understood, but may also involve post-translational regulation, as suggested for *O. mykiss* (Panserat et al., 2001; Skiba-Cassy et al., 2009), *S. aurata* (Mediavilla et al., 2008) and *D. rerio* (Dai et al., 2013). Nutrient availability was expected to favor glycolysis over gluconeogenesis during the early stages of refeeding, nevertheless in this setting the liver seemed to prioritize the restoration of systemic normoglycemia and replenishment of the hepatic glycogen pool. It has been demonstrated through the use of stable isotopes that gluconeogenesis is the main contributor to blood glucose production in refed seabass (Viegas et al., 2013), while hepatic glycogen replenishment is supported mainly via the gluconeogenic or so-called "indirect" pathway (Viegas et al., 2012). These observations are consistent with a reduced role of glycolysis and the weak correlation of hepatic PK and PFK-1 expression and activities with the fasting to feeding transition.

The decreased hepatic activity level of *D. labrax* G6PDH and 6PGDH after fasting was consistent with observations in other species (Metón et al., 2003; Morales et al., 2004; Pérez-Jiménez et al., 2012) reflecting the downregulation of biosynthetic and growth activities and its corresponding reduction in demand for NADPH and nucleotide precursors. However, as previously reported for G6PDH activity in fasted fish (Sangiao-Alvarellos et al., 2005; Ibarz et al., 2007; Furné et al., 2012), we observed that G6PDH mRNA levels remained unchanged in every condition possibly indicating an active role in cellular equilibrium, for example, on maintaining the redox state of the hepatocytes (Morales et al., 2004). The decrease in cALT activity after refeeding could lead to increased alanine which has been proven to modulate the oxidative part of the PPP, significantly increasing G6PDH activity in primary

cultures of Atlantic salmon *Salmo salar* hepatocytes (Sandén et al., 2003). However the lack of rebound of G6PDH and 6PGDH after refeeding with a high-protein diet supports the role of the PPP as NADPH-generating system rather than a component of nutrient conversion into lipids (Barroso et al., 1998). A study with 2-day fasted *O. mykiss*, where refeeding was followed through 8 time-points within 24 h after meal seemed to support this assumption (Mennigen et al., 2012). Despite the significant increase observed in the expression of various genes involved in hepatic lipid metabolism (e.g. SREBP1c, FAS, and ACLY), G6PDH expression remained unaltered. Interestingly, after refeeding seabass with a high-protein diet (49% crude protein), Pérez-Jiménez et al. (2007) reported full recovery of G6PDH activity after 1 day, something that was not observed using a lower protein diet (41% crude protein; same study) or with the diet used in the present work (44% crude protein) even after 3 days of refeeding. Although different protein/lipid ratios may explain such discrepancy, the mRNA levels confirmed to some extent the obtained activities suggesting that de novo lipogenesis occurs in a later phase of the recovery.

In this study we report for the first time partial sequences and nutritional variations on mRNA levels for cALT, mALT, PK, G6PDH and 6PGDH in seabass. This enabled a more comprehensive analysis of how this species copes with food deprivation and consequent refeeding. In conclusion, the counterbalance between cALT and PK during fasting, both at activity and mRNA level, ensure a steady supply of pyruvate to the TCA cycle. cALT also participated by increasing its activity during fasting and supplying metabolic intermediates for gluconeogenesis. After a 3-day refeeding period rather than rebooting lipogenesis and enhancing downstream glycolysis, the liver prioritizes the production of glucose 6-phosphate (via GK) for glycogen replenishment (Viegas et al., 2013). At this point, the fasting–refeeding transition in seabass could be further clarified by assessing the expression of genes involved in TCA cycle to confirm the oxidation of endogenous vs. dietary substrates and assessing the expression of genes involved in lipogenesis to narrow the discrepancies described for the role of the PPP.

Acknowledgments

The authors are thankful to Eng. Canas and D. Graciete for providing the fish for this study. The authors acknowledge financial support from the *Fundação para a Ciência e a Tecnologia* (FCT, Portugal) in the form of a Ph.D. Fellowship to I.V. (SFRH/BD/41976/2007), a Research Grant to J.G.J. (PTDC/EBB-BIO/098111/2008), and Pluriannual support of the Center for Neurosciences and Cell Biology (PEst-C/SAU/LA0001/2011). The authors also acknowledge financial support in the form of research grants from MCI (Spain) (BIO2009-07589) and MEC (Spain) (AGL2012-33305).

References

- Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish Fish.* 4, 147–190.
- Barroso, J.B., Peragón, J., Contreras-Jurado, C., García-Salguero, L., Corpas, F.J., Esteban, F.J., Peinado, M.A., De La Higuera, M., Lupiáñez, J.A., 1998. Impact of starvation–refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH–production systems. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274, R1578–R1587.
- Bonamusa, I., García de Frutos, P., Fernández, F., Baanante, I.V., 1992. Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1, 113–125.
- Cowey, C., Walton, M., 1989. Intermediary metabolism. In: John, E. (Ed.), *Fish Nutrition*, Second edition. Academic Press, New York, pp. 259–329.
- Dai, W., Panserat, S., Mennigen, J., Terrier, F., Dias, K., Seilliez, I., Skiba-Cassy, S., 2013. Post-prandial regulation of hepatic glucokinase and lipogenesis requires the activation of TORC1 signaling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 216, 4483–4492.
- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169–186.
- Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., Conceição, L.E.C., Gomes, E.F., Dinis, M.T., 2004. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquac. Res.* 35, 1122–1130.

- Dupont-Prinet, A., Chatain, B., Grima, L., Vandeputte, M., Claireaux, G., McKenzie, D.J., 2010. Physiological mechanisms underlying a trade-off between growth rate and tolerance of feed deprivation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Exp. Biol.* 213, 1143–1152.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2006. Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 145, 73–81.
- Fenton, A.W., Hutchinson, M., 2009. The pH dependence of the allosteric response of human liver pyruvate kinase to fructose-1,6-bisphosphate, ATP, and alanine. *Arch. Biochem. Biophys.* 484, 16–23.
- French, C.J., Mommsen, T.P., Hochachka, P.W., 1981. Amino acid utilisation in isolated hepatocytes from rainbow trout. *Eur. J. Biochem.* 113, 311–317.
- Furné, M., Morales, A., Trenzado, C., García-Gallego, M., Carmen Hidalgo, M., Domezain, A., Sanz Rus, A., 2012. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.* 182, 63–76.
- Gasier, H.G., Previs, S.F., Pohlencz, C., Fluckey, J.D., Gatlin, D.M., Buentello, J.A., 2009. A novel approach for assessing protein synthesis in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 154, 235–238.
- Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Becker, K., 2006. Effect of dietary protein/carbohydrate ratio on activities of hepatic enzymes involved in the amino acid metabolism of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Fish Physiol. Biochem.* 32, 275–282.
- González, J.D., Caballero, A., Viegas, I., Metón, I., Jones, J.G., Barra, J., Fernández, F., Baanante, I.V., 2012. Effects of alanine aminotransferase inhibition on the intermediary metabolism in *Sparus aurata* through dietary amino-oxycetate supplementation. *Br. J. Nutr.* 107, 1747–1756.
- Ibarz, A., Beltrán, M., Fernández-Borrás, J., Gallardo, M.A., Sánchez, J., Blasco, J., 2007. Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262, 470–480.
- Kamalam, B.S., Medale, F., Kaushik, S., Polakof, S., Skiba-Cassy, S., Panserat, S., 2012. Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *J. Exp. Biol.* 215, 2567–2578.
- Kaushik, S.J., Seiliez, I., 2010. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquac. Res.* 41, 322–332.
- Kirchner, S., Kaushik, S., Panserat, S., 2003. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 133, 2561–2564.
- Kullgren, A., Samuelsson, L.M., Larsson, D.G.J., Björnsson, B.T., Bergman, E.J., 2010. A metabolomics approach to elucidate effects of food deprivation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R1440–R1448.
- Martins, F.O., Rito, J., Jarak, I., Viegas, I., Pardal, M.A., Macedo, M.P., Jones, J.G., 2013. Disposition of [U-2H7]glucose into hepatic glycogen in rat and in seabass. *Comp. Biochem. Physiol. A* 166, 316–322.
- Mediavilla, D., Metón, I., Baanante, I.V., 2008. Purification and kinetic characterization of 6-phosphofructo-1-kinase from the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Biochem.* 144, 235–244.
- Mennigen, J.A., Panserat, S., Larquier, M., Plagnes-Juan, E., Medale, F., Seiliez, I., Skiba-Cassy, S., 2012. Postprandial regulation of hepatic microRNAs predicted to target the insulin pathway in rainbow trout. *PLoS ONE* 7, e38604.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, M., Fernández, F., Baanante, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 82, 223–232.
- Metón, I., Fernández, F., Baanante, I.V., 2003. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225, 99–107.
- Metón, I., Egea, M., Fernández, F., Eraso, M.C., Baanante, I.V., 2004. The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Lett.* 566, 251–254.
- Mommsen, T.P., 1986. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. *Can. J. Zool.* 64, 1110–1115.
- Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Carmen Hidalgo, M., Abellón, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 139, 153–161.
- Moreira, I.S., Peres, H., Couto, A., Enes, P., Oliva-Teles, A., 2008. Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 274, 153–160.
- Nunes, P.M., Jarak, I., Heerschap, A., Jones, J.G., 2013. Resolving futile glucose cycling and glycogenolytic contributions to plasma glucose levels following a glucose load. *Magn. Reson. Med.* 71, 1368–1373.
- Oliva-Teles, A., 2000. Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquac. Int.* 8, 477–492.
- Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 2351–2360.
- Pereira, C., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1995. In vitro hepatocyte metabolism of alanine and glucose and the response to insulin in fed and fasted rainbow trout. *J. Exp. Zool.* 271, 425–431.
- Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E., Oliva-Teles, A., 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture* 265, 325–335.
- Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Hidalgo, M., García-Alcázar, A., Abellón, E., Morales, A., 2012. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1145–1157.
- Sanden, M., Froyland, L., Hemre, G.-I., 2003. Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and malic enzyme activity by glucose and alanine in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. hepatocytes. *Aquaculture* 221, 469–480.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Láiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín Del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2005. Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 303, 761–775.
- Seiliez, I., Médale, F., Aguirre, P., Larquier, M., Lanneretonne, L., Alami-Durante, H., Panserat, S., Skiba-Cassy, S., 2013. Postprandial regulation of growth- and metabolism-related factors in zebrafish. *Zebrafish* 10, 237–248.
- Skiba-Cassy, S., Lansard, M., Panserat, S., Médale, F., 2009. Rainbow trout genetically selected for greater muscle fat content display increased activation of liver TOR signaling and lipogenic gene expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1421–R1429.
- Skiba-Cassy, S., Panserat, S., Larquier, M., Dias, K., Surget, A., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., Seiliez, I., 2013. Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate:protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 109, 1359–1372.
- Soengas, J.L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S., Moon, T.W., 2006. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R810–R821.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146–158.
- Türkmen, S., Eroldoğan, O.T., Yılmaz, H.A., Ölçülü, A., Inan, G.A.K., Erçen, Z., Tekelioğlu, N., 2012. Compensatory growth response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under cycled starvation and restricted feeding rate. *Aquac. Res.* 43, 1643–1650.
- Viegas, I., Mendes, V.M., Leston, S., Jarak, I., Carvalho, R.A., Pardal, M.A., Manadas, B., Jones, J.G., 2011. Analysis of glucose metabolism in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using deuterated water. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 160, 341–347.
- Viegas, I., Rito, J., Jarak, I., Leston, S., Carvalho, R.A., Metón, I., Pardal, M.A., Baanante, I.V., Jones, J.G., 2012. Hepatic glycogen synthesis in farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) is dominated by indirect pathway fluxes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 163, 22–29.
- Viegas, I., Rito, J., González, J.D., Jarak, I., Carvalho, R.A., Metón, I., Pardal, M.A., Baanante, I.V., Jones, J.G., 2013. Effects of food-deprivation and refeeding on the regulation and sources of blood glucose appearance in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 166, 399–405.

